

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Microbiología

HOSPITAL UNIVERSITARIO

VIRGEN DE LAS NIEVES

Servicio de Microbiología



TESIS DOCTORAL

**APLICACIÓN DE LA CITOCENTRIFUGACIÓN EN
EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE LAS INFECCIONES
BACTERIANAS DE LÍQUIDOS ESTÉRILES**

Jesús Damián Turiño Luque

2007

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	6
I.1. EL USO DEL EXAMEN MICROSCÓPICO EN MICROBIOLOGÍA.-	7
I.1.1. LA TINCIÓN DE GRAM.-	7
I.2. MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN.-.....	10
I.2.1. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA.-.....	10
I.2.2. PRINCIPIO DE LA CITOCENTRIFUGACIÓN.-.....	12
I.2.3. HISTORIA DE LA CITOCENTRÍFUGA.-	13
I.3. INFECCIONES DE LÍQUIDOS ORGÁNICOS ESTÉRILES.-	14
I.3.1. LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO.-.....	15
I.3.1.1. Características fisiopatológicas del líquido cefalorraquídeo.....	15
I.3.1.2. Características clínico-epidemiológicas de la meningitis.	15
I.3.1.3. Etiología de las meningitis bacterianas agudas.	16
I.3.2. LÍQUIDO PERITONEAL.-	17
I.3.2.1. Características fisiopatológicas del líquido peritoneal.....	17
I.3.2.2. Clasificación de las peritonitis infecciosas.....	18
I.3.2.3. Etiología de las peritonitis.....	18
I.3.3. LÍQUIDO ARTICULAR.-	19
I.3.3.1. Características fisiopatológicas del líquido articular.	19
I.3.3.2. Características clínico-epidemiológicas de la artritis infecciosa.....	20
I.3.3.3. Etiología de las artritis infecciosas.....	21
I.3.4. LÍQUIDO PLEURAL.-	22
I.3.4.1. Características fisiopatológicas del líquido pleural.....	22
I.3.4.2. Características clínico-epidemiológicas del empiema.	23

I.3.4.3. Etiología de los empiemas.....	24
I.4. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES	
BACTERIANAS DE LÍQUIDOS ESTÉRILES.-	24
I.4.1. CULTIVO.-	25
I.4.2. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS.-	26
I.4.3. PRUEBAS DE DETECCIÓN DE DNA.-	26
I.4.4. TINCIÓN DE GRAM.-	27
OBJETIVOS	30
MATERIAL Y MÉTODO	32
III.1. MUESTRAS OBJETO DEL ESTUDIO.-	33
III.2. DESCRIPCIÓN DEL CENTRO.-	33
III.3. PERIODO DE ESTUDIO.-	34
III.4. BASE DE DATOS.-	34
III.5. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS MUESTRAS.-	35
III.5.1. EXAMEN DIRECTO.-	35
III.5.1.1. Recuento celular en cámara.	35
III.5.1.2. Estudio de los portaobjetos.....	35
III.5.2. CULTIVO DE LA MUESTRA.-	38
III.5.3. DESCRIPCIÓN DE LA CITOCENTRÍFUGA (Cytospin 4).-	41
III.5.3.1. Componentes básicos.	41
III.5.3.2. Panel de control.	42
III.5.3.3. Fundamento.	42
III.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.-	44

III.7. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DISCORDANTES.-	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
IV.1. LÍQUIDOS CEFALORRAQUÍDEOS.-	47
IV.1.1. TINCIÓN DE GRAM Y RESULTADO DEL CULTIVO.-.....	49
IV.1.2. TINCIÓN DE GRAM Y MICROORGANISMOS AISLADOS.-.....	53
IV.1.3. EFECTO DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LA TINCIÓN DE GRAM.-	57
IV.1.4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DISCORDANTES.-	61
IV.2. LÍQUIDOS ASCÍTICOS y/o PERITONEALES.-.....	71
IV.2.1. TINCIÓN DE GRAM Y RESULTADO DEL CULTIVO.-.....	71
IV.2.2. TINCIÓN DE GRAM Y MICROORGANISMOS AISLADOS.-.....	74
IV.2.3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DISCORDANTES.-.....	76
IV.3. LÍQUIDOS ARTICULARES, SINOVIALES y PERIPROTÉSICOS.-	80
IV.3.1. TINCIÓN DE GRAM Y RESULTADO DEL CULTIVO.-.....	80
IV.3.2. TINCIÓN DE GRAM Y MICROORGANISMOS AISLADOS.-.....	82
IV.3.3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DISCORDANTES.-.....	83
IV.4. LÍQUIDOS PLEURALES.-	86
IV.4.1. TINCIÓN DE GRAM Y RESULTADO DEL CULTIVO.-.....	86
IV.4.2. TINCIÓN DE GRAM Y MICROORGANISMOS AISLADOS.-.....	88
IV.4.3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DISCORDANTES.-	90
IV.5. ASPECTOS CUALITATIVOS DE LA CITOCENTRIFUGACIÓN.-	98
CONCLUSIONES.....	102
APÉNDICE I.....	104

A.I. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-MICROBIOLÓGICAS DE LAS MUESTRAS ESTUDIADAS.-.....	105
A.I.1. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.-	105
A.II. LÍQUIDOS CEFALORRAQUÍDEOS.-	106
A.II.1. Distribución de las muestras por Servicio de procedencia.	106
A.II.2. Distribución de las muestras por sospecha diagnóstica.	107
A.II.3. Relación Servicio de procedencia y microorganismos aislados.	109
A.II.4. Relación entre sospecha diagnóstica y microorganismos aislados.	111
A.III. LÍQUIDOS ASCÍTICOS y/o PERITONEALES.-	114
A.III.1. Distribución de las muestras por Servicio de procedencia.	114
A.III.2. Distribución de las muestras por sospecha diagnóstica.	115
A.III.3. Relación Servicio de procedencia y microorganismos aislados.	116
A.III.4. Relación entre sospecha diagnóstica y microorganismos aislados.	117
A.IV. LÍQUIDOS ARTICULARES, SINOVIALES y PERIPROTÉSICOS.-	118
A.IV.1. Distribución de las muestras por Servicio de procedencia.	118
A.IV.2. Distribución de las muestras por sospecha diagnóstica.	118
A.IV.3. Relación Servicio de procedencia y microorganismos aislados.	119
A.V. LÍQUIDOS PLEURALES.-	121
A.V.1. Distribución de las muestras por Servicio de procedencia.	121
A.V.2. Distribución de las muestras por sospecha diagnóstica.	122
A.V.3. Relación Servicio de procedencia y microorganismos aislados.	123
A.V.4. Relación entre sospecha diagnóstica y microorganismos aislados.	124
BIBLIOGRAFÍA	125

INTRODUCCIÓN

I.1. EL USO DEL EXAMEN MICROSCÓPICO EN MICROBIOLOGÍA.-

El microscopio ha constituido el principal instrumento del microbiólogo desde que Anthony Van Leeuwenhoek (1632-1723) construyó uno con suficiente capacidad de aumento para observar organismos microscópicos. En la actualidad los microbiólogos siguen esforzándose por mejorar el examen microscópico directo de las muestras clínicas, principalmente con el uso de tinciones. El objetivo es poder ofrecer al médico que maneja al paciente, un diagnóstico de sospecha precoz que permita instaurarle, en aproximadamente 1 hora, un tratamiento adecuado en espera del resultado del cultivo. Además sirve de guía para emplear un medio de cultivo apropiado y como control de calidad del resultado obtenido en dicho medio (**Koneman 1997**). El estudio de los portaobjetos teñidos mediante la tinción de Gram sigue siendo actualmente una herramienta fundamental en el diagnóstico rápido del proceso infeccioso.

I.1.1. LA TINCIÓN DE GRAM.-

Descubierta por Hans Christian Gram en 1884, en la actualidad es la modificación realizada por Hucker en 1921 la más utilizada para el examen microscópico directo de muestras y subcultivos (**York³ 2005; Koneman 1997**).

Es una tinción sencilla, fiable y útil que informa sobre la calidad de la muestra y orienta al médico en la elección del antibiótico según si la infección está causada por un microorganismo Gram positivo o Gram negativo y si se trata de un coco o un bacilo (**Gill 2005; Chapin 2003**).

Esta técnica diferencia los microorganismos según sus propiedades tintoriales y su morfología. En base a las primeras distinguiremos entre microorganismos Gram positivos o Gram negativos según la composición de su pared celular (Ilustración 1).

Las especies Gram positivas tienen una capa de peptidoglicano y ácido teicoico (Ilustración 1); estos no se afectan por la acción del decolorante orgánico (por ejemplo alcohol o mezclas de alcohol con acetona), reteniendo la tinción inicial del cristal de violeta (violeta de genciana) y aparecen al microscopio de color violeta o azul intenso siempre que su pared celular no se haya visto alterada por el envejecimiento de la propia bacteria, la presencia de agentes antimicrobianos (**York³ 2005; Brooks 2005; Höltje 2000; Koneman 1997**).

Las especies Gram negativas tienen una monocapa de peptidoglicano sujeta a una bicapa asimétrica de lipopolisacáridos-fosfolípidos en la membrana externa con proteínas intercaladas; esta membrana externa es alterada por el decolorante orgánico, permitiendo al complejo cristal de violeta-yodo salir y ser reemplazado por la safranina, u otro colorante, que tiñe de color rojo o rosado a estas bacterias (**York³ 2005; Brooks 2005; Höltje 2000; Koneman 1997**); su principal inconveniente es que son difíciles de observar, especialmente si su concentración es escasa, hay células inflamatorias o restos celulares en la muestra (**Lauer 1981**).

Es importante tener en cuenta la posibilidad de detectar en la tinción de Gram artefactos que simulen microorganismos, como puede ocurrir con componentes naturales de la safranina (**Ackerman 2007; Chapin 2003**), así como la variabilidad tintorial que presentan ciertos microorganismos (por ejemplo *Streptococcus pneumoniae* que ocasionalmente se tiñe como Gram negativo o *Acinetobacter* spp que en ocasiones puede adquirir características Gram positivas) (**Soxman 2007**).

La tinción de Gram también diferencia la morfología del microorganismo. Así, los cocos Gram positivos en racimo son estafilococos, mientras que cuando forman cadenas son estreptococos. Los diplococos lanceolados Gram positivos, y más tratándose de muestras respiratorias, son propios de *S. pneumoniae*, pero si se presentan con forma arriñonada y tinción de Gram negativa pensaremos en *Neisseria* spp. Las formas bacilares con tinción de

Gram negativa incluyen las *Enterobacteriaceae*, bacilos no fermentadores, *Haemophilus* spp y una amplia variedad de otras especies. Si los bacilos alargados tienen una tinción de Gram positiva pensaremos en *Bacillus* o *Clostridium* spp, pero si el tamaño es pequeño nos orienta hacia *Listeria* spp o corinebacterias (York³ 2005; Friedly 1985).

Las esporas no son teñidas por esta técnica pudiendo pasar desapercibidas, así como *Legionella* spp que es difícilmente visualizada, precisando de tinciones específicas para su detección o de métodos tintoriales alternativos (por ejemplo Wirtz-Conklin o Warthin-Starry respectivamente) (Chapin 2003; Stout 2003).

La tinción de Gram se puede emplear en otro tipo de microorganismos no bacterianos (trichomonas, trofozoitos de *T. gondii*...) ayudándonos a su identificación (Koneman 1997).

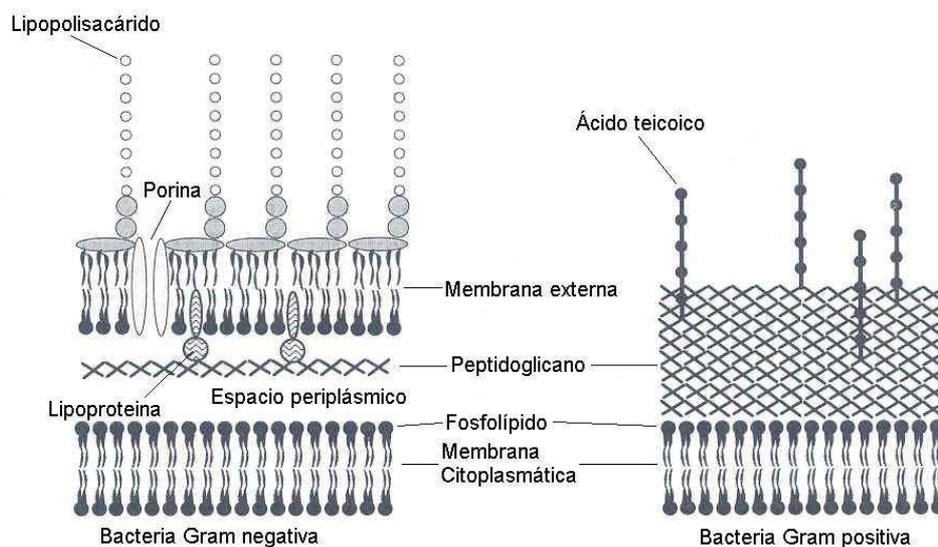


Ilustración 1. Estructura de la pared bacteriana (Modificado de Höltje 2000).

I.2. MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN.-

I.2.1. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA.-

Una única gota de muestra colocada en el portaobjetos es suficiente para la realización de la tinción de Gram (**Shanholtzer 1982**) sin embargo, muchas de las infecciones ocurridas en líquidos estériles cuentan con bajos recuentos bacterianos y por ello se recomienda la utilización de algún método de concentración (**York³ 2004**).

Desde que Quinke introdujo en 1891 el método de extracción del líquido cefalorraquídeo (LCR) por punción lumbar, los clínicos se vieron enfrentados con dos dificultades: lograr el enriquecimiento celular de un líquido pobre en elementos figurados y conseguir una calidad morfológica de las células que permitiera una buena diferenciación (**Dufresne 1971**).

La opción más sencilla de enriquecimiento consiste en depositar múltiples gotas del líquido a estudiar sobre la misma superficie es decir, una sobre otra, esperando a que la primera se seque antes de dispensar la siguiente (**Shanholtzer 1982**).

Sin embargo, la mayoría de los métodos se han basado en la sedimentación por acción de la gravedad. El problema a resolver era conseguir que ésta se produjera antes de iniciarse la degeneración celular (**Dufresne 1971**). Por esta razón se idearon una serie de técnicas para optimizar la sedimentación y la morfología celular:

- a) **Cámara de sedimentación**: creada por Sayk en 1954, su principal característica es acelerar regularmente la sedimentación de los elementos figurados. Consiste en poner en contacto una columna de LCR con un portaobjeto, sobre el cual se coloca un papel de filtro agujereado en el centro. El LCR difunde por capilaridad y gracias a un sistema de palanca que comprime fuertemente el papel de filtro

contra el portaobjeto, se aumenta la presión capilar. En el portaobjeto quedan retenidas el 50-60% de las células, la duración de la sedimentación oscilaba entre 30 y 40 minutos por mililitro **(Sayk 1954)**.

- b) **Filtración en membrana de Millipore®**: creada por Seal en 1956 se basa en la filtración bajo una aspiración débil a través de una membrana cuyos poros tienen un tamaño preciso y uniforme. Dos ventajas: las células se recogen sobre el filtro en una proporción próxima al 100% y el líquido filtrado no se pierde, pudiendo ser utilizado para posteriores análisis bioquímicos o serológicos **(Seal 1956)**.

- c) **Cámara de aspiración**: ideado por Eneström en 1963, la fuerza motriz reside en la diferencia de presión. Constituida por un bloque de plexiglás en el que se han excavado dos cámaras concéntricas y comunicadas entre sí por el espacio capilar que queda entre su base y el portaobjeto. Este método tiene la ventaja de que no expone nunca a las células del LCR a presiones superiores a la presión hidrostática inicial y permite resedimentar un LCR muy pobre en células sobre el mismo portaobjeto o a la inversa **(Eneström 1965)**.

- d) **Captura en red de fibrina**: en 1963 Simon y Schroeer presentan una técnica diferente a las anteriores. En ella se produce la captura de las células en una malla de fibrina que obtenía una excelente calidad en la diferenciación celular, un enriquecimiento máximo, de forma rápida y sencilla **(Simon 1963)**.

- e) **Centrifugación**: permite ganar tiempo **(Dufresne 1971)**. Según Eneström, a 3.500 rpm un linfocito tarda 8 segundos en descender a lo largo de una columna de LCR de 4 cm de altura **(Eneström 1965)**, el problema son las alteraciones que produce en la morfología celular **(Dufresne 1971)**.

I.2.2. PRINCIPIO DE LA CITOCENTRIFUGACIÓN.-

El principio de la citocentrifugación, con Cytospin, se basa en que en una suspensión las células son más densas que el fluido, bajo la fuerza centrífuga, la célula será proyectada a través de la cámara hacia el portaobjetos. El fluido será absorbido por el filtro colocado entre la cámara y el portaobjetos por efecto de la capilaridad **(Cytospin 4)**.

La citocentrífuga usa unos contenedores donde se coloca la muestra y se monta con un portaobjetos y un filtro, introduciéndose el conjunto en la citocentrífuga. Durante la centrifugación, el filtro absorbe el sobrenadante, mientras que células y microorganismos son proyectados a través de un orificio presente en el filtro y depositados en forma de capa continua en un área circular de 6 mm de diámetro sobre el portaobjetos. La disposición de la muestra en un área pequeña es una característica particularmente ventajosa que permite un análisis del portaobjeto más rápido, mejorando su resultado **(Chapin 2003)**.

En definitiva, su función consiste en: “depositar directamente una capa de células en un portaobjetos a partir de su suspensión en un líquido cualquiera y bajo las máximas condiciones de seguridad” **(Cytospin 4)**.

La concentración de bacterias mediante centrifugación convencional es más efectiva cuando se dispone de un gran volumen de muestra. Sin embargo, en los laboratorios clínicos este suele ser escaso y la preparación de un portaobjetos altamente concentrado no es posible con métodos convencionales. Con la citocentrifugación se puede obtener un incremento de dos logaritmos en la sensibilidad de la tinción de Gram usando 0,5 mL de muestra, comparable a la concentración de 100 mL de LCR en 1 mL por técnicas de concentración tradicionales **(Shanholtzer 1982)**.

I.2.3. HISTORIA DE LA CITOCENTRÍFUGA.-

Desde su introducción en el medio hospitalario en los años 70, múltiples trabajos han sido desarrollados para conocer sus aplicaciones. Inicialmente se utilizó para el estudio de la citomorfología del LCR en pacientes con procesos neoformativos de órgano sólido como leucemias agudas y linfomas no Hodgkin **(Woodruff 1985; Gordon 1980)**.

En 1982 se aplicó por primera vez la citocentrifugación en el área de la Microbiología cuando Shanholtzer y colaboradores estudiaron tinciones de Gram concentradas mediante citocentrifugación a partir de LCR y otros fluidos corporales estériles. Inicialmente aplicaron la técnica sobre muestras de LCR almacenado al que añadieron en el laboratorio concentraciones conocidas de microorganismos (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), obteniendo tres portaobjetos: de muestra sin concentrar, tras centrifugación clásica de la muestra y tras citocentrifugación, comparándolo con el resultado del cultivo de dichas muestras. En esta fase hallaron un incremento en la sensibilidad de la tinción de Gram de los LCR de 2 log comparando con las tinciones sometidas a centrifugación normal. Posteriormente repitieron el estudio sobre un total de 80 muestras clínicas de diferentes orígenes (25 líquidos sinoviales, 14 peritoneales, 12 LCR...), detectando que las muestras sometidas a citocentrifugación mostraban mayor número de bacterias por campo y una mejor morfología leucocitaria que las procesadas por centrifugación normal o sin concentrar **(Shanholtzer 1982)**.

En Bacteriología se ha empleado la citocentrifugación principalmente en el estudio de: infecciones de catéteres centrales **(Rushforth 1993)**, infecciones por *Chlamydia trachomatis* **(Van Der Pol 2001; Newhall 1999; Chan 1994)**, en líquidos corporales estériles **(Chapin-Robertson 1992)** y en neumonías asociadas a ventilación mecánica **(Mimoz 2000)**.

En el trabajo de Chapin-Robertson y colaboradores comparan por primera vez las tinciones de portaobjetos obtenidos por dos técnicas: la centrifugación

de alta velocidad (11.000 rpm ó 10.000 x g durante 5 minutos sobre un volumen máximo de 1 mL) y la citocentrifugación (2.000 rpm ó 350 x g durante 8 minutos, sobre 0,5 mL de muestra), y en ambos casos frente al cultivo. Estudiaron 350 líquidos estériles divididos en: 132 LCR, 80 peritoneales, 17 amnióticos y una miscelánea de otros 121 (ascíticos, pleurales, bilis, abscesos, nefrostomía, pericárdicos, articulares o líquido de diálisis). En este trabajo todas las muestras fueron inicialmente centrifugadas a 2.000 rpm (350 x g) durante 8 minutos antes de ser sometidas a uno de los dos sistemas de concentración. El resultado final del estudio encontró que la cuantificación de microorganismos del portaobjetos obtenidos por citocentrifugación tenía mejor correlación con el cultivo que el obtenido por centrifugación de alta velocidad, excepto en los LCR (**Chapin-Robertson 1992**).

Sin embargo la aplicación más frecuente de la citocentrífuga en el diagnóstico microbiológico sigue siendo en el campo de la Virología, empleándose en la preparación de muestras celulares para aplicación de técnicas de inmunofluorescencia en el diagnóstico de infecciones por virus respiratorios (**Landry 2003; Barenfanger 2000**), virus de la familia Herpesviridae (**Landry 1997; De Souza 1990**) y Citomegalovirus, entre otros (**Gerna 1998; Martin 1986**).

I.3. INFECCIONES DE LÍQUIDOS ORGÁNICOS ESTÉRILES.-

En general suelen ser graves y en muchos casos conllevan importantes secuelas, además de por estas características destacar por su gran incidencia en la población las infecciones de líquidos cefalorraquídeos, peritoneales, pleurales y articulares.

I.3.1. LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO.-

I.3.1.1. Características fisiopatológicas del líquido cefalorraquídeo.

Con un volumen aproximado de 150 mL, rellena las regiones en que el hueso no se adapta al sistema nervioso que recubre. Es producido en los plexos coroideos del SNC, pudiendo considerarse un dializado de plasma. Regresa a la circulación sistémica a través de las vellosidades aracnoideas. En condiciones normales, presenta un aspecto transparente, con una viscosidad comparable a la del agua (**Kjeldsberg 1988**). Obtenido mediante punción lumbar o a partir de drenajes ventriculares, su estudio ofrece el diagnóstico definitivo de la meningitis bacteriana (**Sáez-Llorens 2003**).

El recuento normal de leucocitos en LCR a partir del primer mes de vida oscila entre 0 y 5/mm³, pudiendo elevarse en neonatos hasta 32/mm³ (**Tunkel¹ 2005; Kjeldsberg 1988; Bonadio 1992; Greenlee 1990**). En meningitis bacterianas sin tratamiento el recuento está elevado, entre 1.000 y 5.000/mm³ (rango oscila entre menos de 100 o más de 10.000/mm³). Los neutrófilos son predominantes, aunque un 10% de los pacientes presentan predominio linfocitario, más frecuente en meningitis por bacilos Gram negativos y *Listeria monocytogenes* (**Tunkel³ 2005**). Su sensibilidad es cercana al 100% cuando los recuentos son superiores a 5 leucocitos/mm³, aunque su especificidad es baja (**Marton 1986**).

I.3.1.2. Características clínico-epidemiológicas de la meningitis.

Los procesos meníngeos agudos constituyen una enfermedad muy importante de distribución mundial (**Tunkel³ 2005**) y una seria amenaza para la vida del paciente (**Dunbar 1998**). Causados por un amplio grupo de agentes infecciosos (virus, bacterias, hongos, espiroquetas y protozoos) como no infecciosos (**Tunkel¹ 2005**); hasta hace poco tiempo, la meningitis bacteriana era una infección temida porque mataba rápidamente, siendo muchas de sus

víctimas niños y dejando en un 25% de los casos secuelas como daño cerebral permanente, retraso mental o sordera (**Schuchat 1997**).

Puede definirse como un síndrome caracterizado por el establecimiento de síntomas meníngeos en el transcurso de horas hasta varios días, siendo la cefalea el síntoma precoz predominante seguido de confusión, estupor o coma. El examen clínico revela pocos hallazgos focales en las fases precoces, aunque son frecuentes los signos de irritación meníngea (**Tunkel³ 2005**).

Clásicamente se caracterizan por fiebre, cefalea y alteración del estado mental (delirio, estupor, coma...), si bien no están presentes en todos los pacientes (**Tunkel³ 2005; Durand 1993**) acompañados a veces por náuseas, vómitos, fotofobia, rigidez de nuca (sensibilidad diagnóstica del 30%), signos de Kernig o Brudzinski (sensibilidad diagnóstica del 5% para cada uno) careciendo de suficiente precisión diagnóstica en la discriminación clínica. Ocasionalmente el primer signo es una convulsión (**Sáez-Llorens 2003; Thomas 2002**). La ausencia de estos hallazgos no es suficiente para descartar el proceso meníngeo agudo, pues la sintomatología depende de la patogénesis de la infección, la virulencia del agente causal, área afectada y la edad del paciente (**Tunkel¹ 2005; Tunkel³ 2005; Sáez-Llorens 2003**).

I.3.1.3. Etiología de las meningitis bacterianas agudas.

Los agentes etiológicos de las meningitis bacterianas agudas están relacionados con la edad del paciente, el origen de la enfermedad (comunitaria o nosocomial) y la existencia de factores predisponentes (**Tunkel³ 2005; Thomson 2003**).

Si bien antes de la introducción de la vacuna frente *Haemophilus influenzae* tipo b, los tres agentes etiológicos más frecuentes eran *H. influenzae*, *Neisseria meningitidis* y *S. pneumoniae* (responsables de más del 80% de los casos); en la actualidad son *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *L. monocytogenes* los principales agentes causales (**Tunkel³ 2005; Schuchat**

1997). Otros patógenos habituales son: *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus*, bacilos Gram negativos (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* y otros bacilos Gram negativos no fermentadores) (**Tunkel³ 2005; Thomson 2003**).

Un grupo especial de meningitis son las producidas en pacientes con sistemas de drenaje de líquido cefalorraquídeo, siendo la infección su principal complicación (**Meredith 1997**). Entendemos por infección del sistema de drenaje ventrículo peritoneal (IDVP) la presencia de signos o síntomas clínicos de infección con un cultivo positivo del LCR (**Lan 2003**).

Su etiología en un 80% de los casos corresponde a un único microorganismo, siendo los estafilococos responsables de más de las dos terceras partes, principalmente *Staphylococcus epidermidis* (32% al 65%) y *S. aureus* (12% al 29%). Las especies Gram negativas más aisladas son *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus* spp, y *P. aeruginosa*, habiéndose descrito infecciones por *Acinetobacter* spp de origen nosocomial (**Tunkel² 2005; Wang 2004; Thomson 2003; Kralinsky 2000; Unhanand 1993; Mayhall 1984**). Recientemente ha aumentado la prevalencia de infecciones por anaerobios, especialmente *Propionibacterium* spp (**Kaufman 2005**).

I.3.2. LÍQUIDO PERITONEAL.-

I.3.2.1. Características fisiopatológicas del líquido peritoneal.

Su aspecto normal es transparente, de color amarillo pálido y escaso (menos de 50 mL). Su estudio microbiológico permite el diagnóstico etiológico de la peritonitis infecciosa (**Hoefs 1990; Kjeldsberg 1988**).

La paracentesis diagnóstica es un test importante en la valoración inicial del paciente con ascitis pero, si bien una paracentesis positiva es significativa, cuando es negativa carece de utilidad (**Hoefs 1990**).

Un recuento de polimorfonucleares neutrófilos mayor a 250 células/mm³ se considera diagnóstico de peritonitis primaria, constituyendo el principal elemento diagnóstico de sospecha de infección en paciente con ascitis (**Solà 2002; Mowat 2001**). En peritonitis asociada a diálisis peritoneal el recuento de leucocitos suele ser mayor de 100/mm³ y en el 85% de los casos es mayor de 500/mm³ con predominio de neutrófilos.

I.3.2.2. Clasificación de las peritonitis infecciosas.

- a. **Primaria o peritonitis bacteriana espontánea (PBE)**: producida en ausencia de un foco intraperitoneal o de tejidos adyacentes, la bacteria alcanza el líquido ascítico por vía hematógena o, quizás, por el paso directo a través de la pared intestinal (**Levison 2005; Mowat 2001; Bar-Meir 1976**).
- b. **Secundaria**: existe un proceso intra-abdominal evidente (rotura apendicular, perforación úlcera péptica). Generalmente se obtiene un cultivo polimicrobiano (**Mowat 2001; Nathens 1998**).
- c. **Peritonitis secundaria a diálisis peritoneal**: es una de las principales complicaciones asociada a esta terapéutica (**Sewell 1982**), generalmente producida por la contaminación del catéter por microorganismos de la piel (**Rubin 1980**) o por patógenos entéricos (**Fenton 1981**). Existe una alta incidencia de peritonitis en portadores nasales de *S. aureus* (**Sewell 1982**).

I.3.2.3. Etiología de las peritonitis.

Las peritonitis bacterianas espontáneas son producidas por enterobacterias, principalmente *E. coli* y *K. pneumoniae*; en segundo lugar se encuentran los estreptococos (más frecuentemente *S. pneumoniae*); un 1% de los casos se produce por anaerobios y *S. aureus* es aislado excepcionalmente (**Runyon 1990; Hoefs 1985; Correia 1975**). En niños los microorganismos

más frecuentes son los bacilos Gram negativos (principalmente *E. coli*) y estafilococos **(McDougal 1975)**.

La etiología de las peritonitis secundarias depende de la víscera afectada, estando descritos como principales agentes *E. coli*, *Enterococcus* spp. y *B. fragilis*, siendo los aislamientos de *S. aureus* infrecuentes **(Levison 2005; Nathens 1998)**.

En peritonitis asociadas a diálisis peritoneal del 60 al 80% de los aislamientos son Gram positivos, principalmente *S. epidermidis* (del 17% al 53% según diferentes autores), seguido por *S. aureus*, *Streptococcus* spp. y difteroides **(Zelenitsky 2000; West 1986; Sewell 1982; Rubin 1980)**; los Gram negativos se aíslan en el 15 al 30% de los casos, siendo *E. coli* el más frecuente, seguido por *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. y *Pseudomonas* spp. **(Levison 2005)**; menos frecuentes son: *Acinetobacter* spp., *C. albicans* y bacterias anaerobias **(Zelenitsky 2000; Kraus 1983; Vas 1983; Arfania 1981)**.

I.3.3. LÍQUIDO ARTICULAR.-

I.3.3.1. Características fisiopatológicas del líquido articular.

Producido por diálisis del plasma a través de la membrana sinovial y por secreción de un complejo de ácido hialurónico-proteína por dicha membrana. A este ultrafiltrado se añaden pequeñas cantidades de proteínas de mayor peso molecular (fibrinógeno, β /C-globulina...), siendo su aspecto normal transparente y de color amarillo pálido. Su función es proporcionar lubricación y nutrientes al cartílago sinovial **(Kjeldsberg 1988)**.

En la mayoría de las infecciones articulares los líquidos son purulentos (recuentos superiores a 50.000 leucocitos/mm³, con predominio polimorfonuclear) **(Goldenberg 1998)**. Sin embargo procesos inflamatorios no

bacterianos, como artritis cristalinas o artritis reactivas, pueden tener recuentos superiores a ese nivel (**Shmerling 1990**).

El estudio microbiológico del líquido articular obtenido por artrocentesis permite el diagnóstico definitivo de la artritis infecciosa para pautar la terapia antibiótica adecuada (**Bouza Santiago 2006; Ohi 2005; Nade 2003; Shirliff 2002; Goldenberg 1998**).

I.3.3.2. Características clínico-epidemiológicas de la artritis infecciosa.

La artritis infecciosa puede estar originada por una amplia diversidad de microorganismos siendo la bacteriana, piogénica, supurativa, purulenta, pioartrosis o artritis séptica, la más frecuente e importante. Debe ser considerada una urgencia médica por su rápida y potencial destrucción de la articulación con pérdida irreversible de la funcionalidad (**Ohi 2005; Nade 2003; Shirliff 2002; Gupta 2001**).

Las artritis bacterianas no gonocócicas presentan bruscamente una articulación caliente, inflamada y dolorosa, ocasionalmente eritema y limitación de la movilidad. La fiebre elevada, los escalofríos o la rigidez son raros, excepto en niños pequeños (**Nade 2003**). La principal articulación afectada es la rodilla (50%), seguida de hombro, muñeca y codo (**Ohi 2005; Nade 2003; Goldenberg 1998**). La cadera se afecta principalmente en niños. En estos es más frecuente la infección sobre articulación nativa, mientras que en adultos es más frecuente sobre articulaciones protésicas o con material de osteosíntesis (**Kaandorp¹ 1997**).

En las formas gonocócicas es típica la triada de lesiones cutáneas, tenosinovitis y oligoartritis o poliartritis asimétrica, frecuentemente migratorias (principalmente rodillas, muñecas, codos y tobillos). Es frecuente la fiebre moderada, los escalofríos y síntomas o signos de infección urogenital (**Bardin 2003; Wise 1994**).

La incidencia anual se sitúa entre 5,7 y 10 casos por cada 100.000 habitantes/año (**Nade 2003; Weston 1999; Kaandorp¹ 1997; Morgan 1996**), aumentando ésta en pacientes con enfermedad crónica articular, como artritis reumatoide o prótesis articulares donde alcanza cifras de entre 28 y 70 casos por cada 100.000 habitantes, siendo la complicación más importante de la artritis reumatoide y su principal causa de incapacidad por afectación articular (**Ohl 2005; Weston 1999; Gardner 1990**).

En los últimos años se ha producido un incremento del uso de prótesis articulares (**Zimmerli 2004**). Ello ha generado nichos para los organismos patogénicos causantes de las artritis sépticas, siendo la colocación y sustitución de prótesis articulares la causa aislada más frecuente de infección articular (**Shirliff 2002**). Entre el 1% y el 5% de las prótesis se infectan, proceso con alta morbilidad e incluso mortalidad (**Brause 2005**).

La introducción de los antibióticos cambió la historia natural de la artritis séptica (**Nade 2003**) pero, a pesar de los antimicrobianos más efectivos y los mejores métodos de drenaje su evolución no han cambiado mucho en las últimas décadas (**Goldenberg 1998**). La tasa de mortalidad por artritis bacterianas en adultos oscila entorno al 10% y el 30%, derivada de bacteriemias transitorias o crónicas que causan dichas artritis (**Shirliff 2002; Weston 1999; Kaandorp² 1997**). La morbilidad es considerable con pérdida de funcionalidad hasta en el 50% de los pacientes (**Goldenberg 1985**). Por todo ello, el diagnóstico precoz y el inicio del tratamiento antibiótico adecuado son de máxima importancia para limitar la morbilidad del proceso (**Shirliff 2002**).

I.3.3.3. Etiología de las artritis infecciosas.

S. aureus es el agente etiológico más frecuente de las artritis sépticas en todos los grupos de edad, tanto en formas monoarticulares como poliarticulares (37% al 65% de los casos según la articulación afectada). *Streptococcus pyogenes* es el segundo agente etiológico en frecuencia (8% al 16%) y uno de los más importantes en adultos con factores de riesgo asociados (artritis

reumatoide, diabetes mellitus, procesos malignos y anormalidades o infecciones del tracto genitourinario o gastrointestinal) (**Nade 2003; Ross² 2003; Weston 1999; Goldenberg 1998; Ryan 1997; Kaandorp¹ 1997; Morgan 1996; Gardner 1990**).

Los estafilococos coagulasa negativa son responsables del 15% al 37,5% (según la articulación afectada) de las infecciones asociadas a prótesis articulares, principalmente *S. epidermidis* (**Lentino 2003; Gupta 2001**).

H. influenzae es el principal agente etiológico de las artritis en niños menores de dos años junto a *S. aureus*, pero su incidencia ha disminuido en niños mayores de esta edad tras la vacunación generalizada. Es frecuente obtener hemocultivos y cultivo del líquido sinovial positivos (**Murphy 2005; Kaandorp¹ 1997; Bowerman 1997**).

El aislamiento de bacilos Gram negativos oscila entre el 5% y el 19%, más frecuente en niños, ancianos, inmunodeprimidos y usuarios de drogas por vía parenteral, en estos últimos especialmente *P. aeruginosa* sobre articulaciones con estructura fibrocartilaginosa (esternoclavicular, esternocondral, sacroilíaca o sínfisis púbica) (**Ross¹ 2003; Goldenberg 1998; Ryan 1997**).

Neisseria gonorrhoeae es causa de artritis bacteriana en adultos jóvenes y adolescentes (**Bardin 2003; Goldenberg 1998**).

I.3.4. LÍQUIDO PLEURAL.-

I.3.4.1. Características fisiopatológicas del líquido pleural.

El líquido pleural normal es transparente, de color amarillo pálido y escaso (menos de 20 mL). Se produce fundamentalmente a partir de la ultrafiltración de plasma (**Kjeldsberg 1988**). Las efusiones pleurales pueden producirse por un incremento en la formación de líquido pleural, por un descenso del

aclaramiento linfático o la combinación de ambos. Pueden ser de dos clases: trasudados o exudados. Este último se asocia con una variedad de enfermedades entre ellas las de etiología infecciosa. El trasudado típicamente presenta recuentos de leucocitos inferiores a $1000/\text{mm}^3$ mientras que el exudado el recuento de leucocitos polimorfonucleares suele ser elevado. Su estudio microbiológico permite el diagnóstico etiológico del empiema (presencia de pus en el espacio pleural) **(Lode 1998)**.

I.3.4.2. Características clínico-epidemiológicas del empiema.

A pesar de los nuevos antimicrobianos y la mejora de las pruebas diagnósticas de imagen, el retraso en el diagnóstico, el fallo en la terapia antimicrobiana adecuada y un drenaje inadecuado aumentan su morbilidad y mortalidad **(Septimus 2005; Alfageme 1993)**.

La infección broncopulmonar es su principal causa (39% al 73%), seguida de los causados tras cirugía torácica (20% al 24%) o traumatismos (4% al 10%) y menos frecuentemente los secundarios a rupturas esofágicas, extensión subdiafragmática, diseminaciones hematógenas o desde la cabeza o cuello **(Septimus 2005; Hamm 1997; Alfageme 1993; Ali 1990; Smith 1991)**. Hasta en el 67% de los pacientes existen condicionantes favorecedores destacando (por orden de frecuencia): diabetes mellitus, procesos malignos, enfermedades pulmonares previas y alteraciones del sistema nervioso central **(Chen 2000)**.

Hay que tener en cuenta la existencia de etiologías no infecciosas como: embolismos pulmonares, pancreatitis, lupus eritematoso sistémico... **(Stein 1997; Lankisch 1994; Good 1983)**.

Se presenta con fiebre, tos, dolor costal, expectoración y alteración del patrón respiratorio (disnea o taquipnea). En infecciones por anaerobios el curso suele ser más indolente con pérdida de peso, fiebre y tos crónica, junto a una historia de aspiración. El examen físico revela disminución del ruido

respiratorio, crepitación en el área afecta y matidez a la percusión (**Septimus 2005; Chen 2000; Brook 1993**).

I.3.4.3. Etiología de los empiemas.

S. pneumoniae es el principal agente etiológico asociado a derrames paraneumónicos complicados en niños (cuando se ha recuperado el microorganismo en cultivo), si bien debido a la vacunación, ha disminuido su incidencia (representando tan sólo el 2% de los empiemas secundarios a neumonía neumocócica), siendo un alto porcentaje de estos derrames reactivos (**Septimus 2005; Musher 2005; Buckingham 2003**).

S. aureus es responsable de hasta el 28% de los empiemas en adultos y del 30% en los niños (**Buckingham 2003; LeMense 1995**), también puede surgir como complicación de la cirugía torácica (**Moreillon 2005**). Es junto a *Streptococcus* grupo *viridans* los aislamientos predominantes dentro de los microorganismos aerobios Gram positivos (**Chen 2000**).

Entre los bacilos Gram negativos aerobios destacan *K. pneumoniae* y *E. coli*; menos frecuentemente *Pseudomonas* spp y *H. influenzae* (**Chen 2000; Hamm 1997**).

Los microorganismos anaerobios, componentes de la flora orofaríngea, se aíslan en el 24% al 33% de los empiemas, principalmente secundarios a neumonías aspirativas, abscesos pulmonares y subdiafragmáticos, siendo frecuente su presencia junto a otros microorganismos aerobios de la flora oral (**Septimus 2005; Brook 1993; Ali 1990**).

I.4. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES BACTERIANAS DE LÍQUIDOS ESTÉRILES.-

Es fundamental para el manejo rápido y eficaz del paciente.

I.4.1. CULTIVO.-

El cultivo en medios adecuados y la subsecuente identificación y estudio de la susceptibilidad a antimicrobianos sigue siendo el método más sensible y específico para establecer el diagnóstico etiológico de las infecciones bacterianas.

La positividad de los cultivos puede verse afectada por diversos factores como la presencia de antibióticos en la muestra, el microorganismo infectante o el tipo de infección (**La Scolea 1983; Murray 1980**).

En los LCR es positivo en el 75% de las meningitis meningocócicas y en el 85% de las neumocócicas (**Fernández Viladrich 2006**), pero estudios realizados en niños afectados de meningitis bacteriana, observaron que el LCR se volvía estéril en el 90% al 100% de los casos a las 24-36 horas de iniciada la terapia antibiótica apropiada (**Bonadio 1992**). Estudios más recientes han propuesto que este hecho puede ser incluso más precoz, sugiriendo la completa esterilización del LCR a las dos horas del inicio de terapia antibiótica parenteral en el caso de meningitis meningocócicas y a las cuatro horas para las neumocócicas (**Kanegaye 2001**).

El líquido articular es positivo en el 60-90% de las artritis bacterianas no gonocócicas (**Wang 2003; Goldenberg 1985**), mientras que desciende al 25-50% en las gonocócicas (**Bouza Santiago 2006; Bardin 2003; Wise 1994**).

El cultivo del líquido pleural es positivo en un 60% de los pacientes, siendo mayor en empiemas de origen no paraneumónico (84%) frente a los de origen neumónico (46%) (**LeMense 1995**).

Los líquidos peritoneales de peritonitis primarias la positividad del cultivo puede ser tan baja como del 42%, mientras que en peritonitis asociadas a diálisis peritoneal el cultivo habitual puede no recuperar el microorganismo (**Archer 2005, Akriviadis 1990; Runyon 1987**).

Debido a la baja concentración bacteriana característica de determinadas infecciones de líquidos estériles se recomienda su inoculación en frascos de hemocultivos principalmente en líquidos articulares y peritoneales de peritonitis primarias y asociadas a diálisis peritoneal (**Gill 2005, Woods 1987**).

La principal desventaja del cultivo es no poder ofrecer un resultado rápido para el manejo inmediato del paciente pues, en el mejor de los casos, su resultado no está disponible hasta las 18-48 horas de procesada la muestra.

I.4.2. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS.-

Se han desarrollado pruebas para la detección rápida del agente infeccioso como detección de antígenos por aglutinación con látex, inmunofluorescencia, enzimoimmunoensayo o inmunocromatografía, si bien sólo están disponibles para determinados patógenos y en determinados tipos de líquidos. A las pruebas de detección de antígenos de *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *E. coli* y *S. agalactiae* con látex en LCR, les falta sensibilidad y especificidad (**Van de Beek 2006; Fernández Viladrich 2006; Tunkel³ 2005**). La detección de antígeno de neumococo por inmunocromatografía alcanza valores adecuados de sensibilidad y especificidad, pero actualmente sólo está aceptada su determinación, en orinas de pacientes adultos para diagnóstico de neumonía o en LCR para diagnóstico de meningitis.

I.4.3. PRUEBAS DE DETECCIÓN DE DNA.-

Tampoco se han desarrollado en la actualidad técnicas moleculares de detección de DNA para el diagnóstico rutinario de las infecciones bacterianas en líquidos orgánicos estériles. Saravolatz y colaboradores obtuvieron una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98,2% al aplicar una PCR de amplio espectro bacteriano (BRB-PCR) en el diagnóstico de meningitis bacterianas, si bien consideran necesarios más estudios para establecer la

fiabilidad de este test antes de aplicarlo en el diagnóstico rutinario (**Van de Beek 2006; Tunkel 2004; Saravolatz 2003**).

I.4.4. TINCIÓN DE GRAM.-

En la era de la microbiología molecular, el examen microscópico de la muestra mediante tinción de Gram sigue siendo, en general, el método más fiable y sencillo para el diagnóstico rápido microbiológico de estas infecciones (**Moellering 2005**).

En el LCR permite la identificación presuntiva rápida del agente etiológico en el 40 al 90% de los pacientes sin tratamiento, por tan sólo un 40 al 60% en pacientes tratados, siendo su especificidad cercana al 100% en meningitis bacterianas o fúngicas (**Tunkel¹ 2005; Gill 2005; La Scolea 1984; Dunbar 1998; Jensen 1993; Gray 1992**). La obtención de un resultado positivo en la tinción se encuentra relacionada con los siguientes factores (**Murray 1980**):

- **Concentración de bacterias:** sólo el 25% de las preparaciones con recuentos inferiores a 10^3 UFC/mL son positivas en la tinción de Gram, alcanza un 60% en concentraciones de entre 10^3 a 10^5 UFC/mL y del 97% cuando la concentración es igual o superior a 10^5 UFC/mL (**Tunkel³ 2005; La Scolea 1983**).
- **Agente etiológico:** *S. pneumoniae* se observa en la tinción de Gram en el 75-90% de las ocasiones, *H. influenzae* en el 86%, *N. meningitidis* en el 65-75% y en el 50% al 60% de los casos las meningitis producidas por bacilos Gram negativos; en el caso de *L. monocytogenes* la probabilidad es inferior al 50% (probablemente por su baja concentración en LCR - inferior a 10^3 UFC/mL -) (**Fernández Viladrich 2006; Sáez-Llorens 2003; Mylonakis 1998; Unhanand 1993; Greenlee 1990**).

- **Terapia antibiótica:** su inicio antes de la obtención del LCR, hecho que ocurre al menos en la mitad de los pacientes con meningitis, puede causar un descenso de entre 10^2 a 10^6 en el número de bacterias de la muestra obtenida (**Murray 1980**), reduciendo la sensibilidad de la tinción entre el 40% y 60% y del cultivo por debajo del 50% (**Tunke³ 2005; Sáez-Llorens 2003**).

En los líquidos sinoviales esta tinción es positiva en el 50% de las muestras con sospecha de artritis séptica no gonocócica, por tan sólo un 25% al 50% en las gonocócicas (diplococos Gram negativos intra o extracelulares) con cultivo positivo (**Bardin 2003; Goldenberg 1998**). En infecciones asociadas a prótesis articulares la tinción de Gram del líquido sinovial tiene una alta especificidad (mayor del 97%) pero poca sensibilidad (menor del 26%) (**Trampuz 2003**). La tinción de Gram en los líquidos articulares de infecciones asociadas a prótesis muestra típicamente células inflamatorias sin presencia de bacterias.

El 60% de los pacientes con empiema tienen una tinción de Gram positiva, si bien en empiemas paraneumónicos es sólo del 46% (**Septimus 2005; LeMense 1995; Alfageme 1993**).

Determinados tipos de infecciones como las peritonitis primarias sólo son positivas en el 10% al 40% de los pacientes (**Runyon 1988; Weinstein 1978**) y en las secundarias a diálisis peritoneal la tinción de Gram es normalmente negativa, pero debido a su ocasional positividad y la simplicidad de ejecución debería ser realizada de manera rutinaria (**Rubin 1980**). La concentración mínima de bacterias requeridas para su detección es de aproximadamente 10.000/ml (**Solà 2002**).

Por tanto, la utilización de la tinción de Gram en el estudio de las infecciones de los líquidos orgánicos estériles adolece en muchas ocasiones de falta de sensibilidad, por el escaso número de bacterias, o de especificidad por ser difícil la discriminación correcta entre microorganismos y artefactos (**Gill**

2005; Tunkel³ 2005). Esta falta de sensibilidad ocurre también incluso utilizando la centrifugación convencional aceptada ampliamente como técnica microbiológica para la concentración de la muestra.

La detección de bacterias con la tinción de Gram puede incrementarse cuando se prepara el portaobjetos con citocentrífuga, con las ventajas añadidas de requerir menos muestra y de permitir un examen más fácil y rápido de la tinción, pues la concentración de la muestra se produce en un área de 6 mm de diámetro, de manera homogénea y con menos artefactos. Su uso está ampliamente extendido en el campo de los estudios citológicos y virológicos pero no sucede lo mismo en el área de bacteriología. Ello puede ser debido a la inexistencia de trabajos dónde se compare directamente la citocentrifugación con la centrifugación o carezcan de un número suficiente de muestras clínicas.

OBJETIVOS

- 1) Estudiar la utilidad de la tinción de Gram respecto al cultivo, en la detección de los microorganismos presentes en líquidos orgánicos estériles con sospecha de infección bacteriana, tras su procesamiento mediante centrifugación o citocentrifugación.
- 2) Estudiar las diferencias de la tinción de Gram tras el procesamiento de las muestras por centrifugación clásica o citocentrifugación en el diagnóstico precoz de la infección bacteriana de líquidos estériles.
- 3) Estudiar las diferencias de la tinción de Gram tras procesamiento de las muestras por centrifugación clásica o citocentrifugación en la detección de los diferentes grupos de microorganismos bacterianos causantes de la infección de los líquidos orgánicos estériles.
- 4) Conocer la influencia de la presencia o ausencia de antibióticos previos en la sensibilidad de la tinción de Gram tras procesamiento del líquido cefalorraquídeo por centrifugación clásica o citocentrifugación.

MATERIAL Y MÉTODO

III.1. MUESTRAS OBJETO DEL ESTUDIO.-

Líquidos corporales estériles recibidos para cultivo bacteriano y cultivo de hongos (por la similitud del procesamiento de las muestras y lectura del cultivo) en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

Las características clínico-microbiológicas de las muestras estudiadas se describen en el Apéndice I.

III.2. DESCRIPCIÓN DEL CENTRO.-

El Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada ofrece cobertura sanitaria a una población cercana a los 440.000 habitantes en el año 2005, realizando una media diaria de 717 asistencias urgentes. Además cuenta con 1.072 camas, con una ocupación media anual de 957 camas. Diferenciamos cuatro complejos:

- a) Complejo de Rehabilitación y Traumatología (CRT) que engloba los siguientes Servicios: Neurocirugía, Neurología, Traumatología, Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), un área de Urgencias; otros servicios (Rehabilitación, Cirugía Maxilofacial, Cirugía Plástica, etc.).
- b) Complejo Materno-Infantil (CMI) formado por: Servicio de Pediatría con diferentes secciones (UCI pediátrica, Preescolares, Lactantes, Cirugía pediátrica, Neonatología,...); Servicio de Obstetricia y Ginecología; dos áreas de Urgencias independientes.
- c) Complejo Médico Quirúrgico (CMQ) que engloba el resto de especialidades médicas y quirúrgicas: Medicina Interna, Cirugía

General, Nefrología, Neumología, Consultas externas, Urología, una UCI, área de Urgencias, etc.

- d) Dentro del área de influencia de dicho complejo, existe una extensa red de centros de salud que dan cobertura al área norte de la ciudad, de la que es hospital de referencia (**Memoria Anual 2005**).

Sólo se recibieron muestras procedentes de las tres primeras áreas.

III.3. PERIODO DE ESTUDIO.-

Se estudiaron todos los LCRs recibidos desde el 1 de enero de 2003, mientras que para el resto de líquidos estériles (pleurales, peritoneales y articulares) el periodo de estudio se inició el 1 de marzo de 2005, finalizando la recogida de muestras, en ambos casos, el 15 de abril de 2006.

III.4. BASE DE DATOS.-

En la base de datos se registraron las siguientes variables:

- ✓ Número de historia, edad e iniciales del paciente
- ✓ Número del volante de petición del estudio microbiológico
- ✓ Método de procesamiento de la muestra para la obtención del portaobjetos (citocentrifugación, centrifugación o ambos)
- ✓ Resultado de la tinción de Gram
- ✓ Recuento leucocitario (sólo en LCR)
- ✓ Resultado del cultivo

- ✓ Servicio de procedencia de la muestra
- ✓ Existencia de tratamiento antibiótico previo a la toma de la muestra (a partir del 1 de enero de 2004 en los LCR)
- ✓ Sospecha diagnóstica motivo del estudio (desde 1 de enero de 2004 en los LCR).

III.5. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS MUESTRAS.-

III.5.1. EXAMEN DIRECTO.-

III.5.1.1. Recuento celular en cámara.

Se emplearon dos tipos de cámara: Neubauer (con una profundidad de 0,1 mm y un volumen de 0,9 mm³) y Fushs-Rosenthal (0,2 mm de profundidad y un volumen de 3,2 mm³). Para realizar el recuento se depositó una gota de LCR sin centrifugar en la cámara (**Bonadio 1992; Bauer 1980**).

III.5.1.2. Estudio de los portaobjetos.

A. Preparación de los portaobjetos:

- **Portaobjetos obtenidos por citocentrifugación:** Se depositaron 4 gotas de la muestra con pipeta estéril (aproximadamente 200µL - cantidad mínima recomendada por el fabricante para estudios microbiológicos-) en cada uno de los citocontenedores desechables (Cytofunnel®, Thermo Shandon, Cheshire, UK), centrifugándolos a 2.000 rpm (452 x g) durante 10 minutos y aceleración alta.

- **Portaobjetos obtenidos por centrifugación:** Se centrifugó la muestra durante 15 minutos a 3.000 rpm (1.700 x g) (EBA 20, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) tras lo cuál, se retiró el sobrenadante por decantación dejando aproximadamente 0,5 ml, resuspendiendo el sedimento con pipeta estéril, tomándose con dicha pipeta unas gotas para la preparación del portaobjetos para el estudio comparado.

B. Tinción de Gram:

1. Secar el portaobjetos a temperatura ambiente o en plancha térmica;
2. Fijar la muestra con alcohol metílico durante 1 minuto;
3. Eliminar el metílico y cubrir totalmente con cristal de violeta (QCA S.A. Amposta, España) durante 30 segundos;
4. Eliminar el cristal de violeta lavando con abundante agua y cubrir el portaobjetos con lugol (solución iodada para tinción de Gram);
5. Pasados 30 segundos eliminar la solución iodada lavando con agua y aplicar decolorante de tinción de Gram (por ejemplo acetona) durante otros 30 segundos;
6. Finalmente lavar con agua y cubrir con solución de safranina (QCA S.A. Amposta, España) durante 1 minuto;
7. Eliminar la safranina con agua y secar el portaobjetos a temperatura ambiente quedando listo para su examen microscópico (**Koneman 1997**).

C. Examen microscópico de la tinción de Gram:

Los portaobjetos fueron examinados por dos observadores independientes para cada una de las técnicas de concentración empleadas, según el siguiente protocolo:

1. Evaluación general de la extensión a bajo aumento (definido como un objetivo 10x con un ocular de 10x; superficie 2,6 mm²) para determinar la presencia de leucocitos (excepto en LCR que se hizo recuento en cámara) entre un total de 20 a 40 campos. Los resultados se anotaron de forma semicuantitativa como sigue:

- 1+: menos de 1 leucocito por campo.
- 2+: 1 a 9 leucocitos por campo.
- 3+: 10 a 25 leucocitos por campo.
- 4+: más de 25 leucocitos por campo (**York³ 2004**).

2. En una zona con predominancia leucocitaria y usando la lente de inmersión (definido como un objetivo de 100x con un ocular de 10x; superficie 0,02 mm²), se examinaron entre 20 y 40 campos para observar la morfología celular y determinar la presencia o ausencia de microorganismos (**York³ 2004**), valorándose su morfología (coco, bacilo, diplococo...) y propiedades tintoriales (Gram positivo, Gram negativo) (**Isenberg 2004**):

Cuando se produjo alguna discrepancia entre los resultados emitidos por los observadores, se procedió a la reevaluación del portaobjeto. En caso de persistir la discrepancia se sometió al examen de un evaluador independiente.

D. Conservación de los portaobjetos estudiados:

1. Tras el estudio inicial del portaobjetos, se retiró el aceite por decantación, guardándose una semana ante la posibilidad de necesitar inspecciones posteriores de la extensión.
2. Para el mantenimiento durante periodos más prolongados, eliminamos el aceite de inmersión con xileno y resguardamos los portaobjetos en sitio seco y a salvo del polvo (**Isenberg 2004**).

III.5.2. CULTIVO DE LA MUESTRA.-

A. Preparación de la muestra:

Del sedimento obtenido tras la centrifugación de la muestra para la obtención del portaobjetos, se realizó la siembra en medio de cultivo.

En los líquidos pleurales, articulares y peritoneales de peritonitis asociadas a diálisis, cuando el volumen de la muestra era superior a 1 mL, antes de centrifugarla se inoculó una parte en botellas de hemocultivos (0,5 mL en Bact-Alert pediátrico ó 1 mL en Bact-Alert aerobio y 1 mL en Bact-Alert anaerobio) (**York¹ 2004**).

B. Medios de cultivo:

Todas las muestras, independiente del tipo, se sembraron en una placa de Agar Sangre (Biomedics SL. Tres Cantos, Madrid), placa de Agar Chocolate (Biomedics SL). Los LCR además en Brain Heart Infusión Broth (BHI) (OXOID Ltd., Basingstoke, Reino Unido) (**York² 2004**).

A los LCR del Servicio de Neurocirugía se añadió una placa de Agar Sangre incubada en anaerobiosis; ésta también se añadió al resto de líquidos estériles, junto con un agar sangre lacado con amikacina (LK) e incubado en condiciones anaeróbicas (**York² 2004**).

En todas las muestras, con excepción de LCR, se sembró además una placa de Agar Manitol (Biomedics SL) para *Staphylococcus* spp y Agar MacConkey (Biomedics SL) para bacilos Gram negativos y un caldo de Thioglicolato (Biomedics SL) (**York¹ 2004**).

En solicitudes de patógenos no habituales (por ejemplo hongos) se emplearon medios de cultivo específicos para la recuperación de tales microorganismos (**York¹ 2004**).

C. Tiempo y atmósfera de incubación:

La incubación de las placas de Agar Sangre, Agar Chocolate, se realizó en ambiente enriquecido con CO₂ (5%) (**York¹ 2004**).

El BHI, thioglicolato, Agar Manitol y Agar MacConkey se incubaron en atmósfera aerobia (**York¹ 2004**).

El Agar Sangre y Agar Sangre LK fueron incubados en condiciones de anaerobiosis (**York² 2004**) mediante el sistema comercial de generación de anaerobiosis AnaeroGenTM Compact (OXOID) o GENbox anaero de bioMérieux (BioMérieux, Inc. Durham).

La temperatura de incubación de todos estos medios de cultivo se realizó a 35-37°C (**York¹ 2004**).

D. Lectura de las placas:

El estudio de las placas se realizó a las 24 horas de su inoculación en las placas aerobias y a las 48 horas en las placas incubadas en anaerobiosis. Tras el primer estudio las placas fueron reincubadas en las mismas condiciones durante 5 días. Si pasado este tiempo no se produjo crecimiento de ningún microorganismo patógeno en las placas de cultivo, se consideró el cultivo negativo.

En muestras especialmente purulentas, con antibióticos en el momento de la obtención de la misma o cultivos previos positivos (especialmente en LCR) se continuó la incubación hasta los 7 días.

En caso de sospecha de patógenos inusuales y/o de crecimiento lento se prolongó hasta las 3 semanas (por ejemplo hongos).

Los líquidos estériles inoculados en frascos de hemocultivos, fueron incubados en el sistema semi-automatizado BacT ALERT[®] 3D (BioMérieux, Inc. Durham). Sólo tras ser detectado por el sistema como positivo alguno de los frascos, se procedió a su extracción de la máquina, preparación de una extensión para tinción de Gram sin centrifugar y su siembra en placas de Agar Sangre y Agar Chocolate.

El periodo de incubación de los frascos de hemocultivos fue de 5 días, excepto los frascos aerobios de líquidos articulares que alcanzó los 14.

La recuperación exclusiva a partir de frascos de hemocultivos de estafilococos coagulasa negativa, *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp., *Streptococcus* grupo *viridans* y *Propionibacterium acnes* fue considerada como posible contaminación o de significación dudosa para su valoración por el clínico según las características del paciente **(Weinstein 2003; Mirrett 2001)**.

E. Identificación de los microorganismos:

Se realizó según la metodología establecida (York³ 2005; Murray 2003; Friedly 1985).

III.5.3. DESCRIPCIÓN DE LA CITOCENTRÍFUGA (Cytospin 4).-

III.5.3.1. Componentes básicos.

La citocentrífuga presenta distintos componentes (Ilustración 1):

- a. Tapa
- b. Rotor sellado
- c. Panel de control
- d. Tarjeta de programas extraíble



Ilustración 1. Cytospin 4 (Cytospin 4)

III.5.3.2. Panel de control.

Situado en la parte frontal del equipo (Ilustración 1) permite al usuario seleccionar o guardar un programa; establecer velocidad, duración y aceleración, y en caso necesario seleccionar la fijación automática (**Cytospin 4**).

III.5.3.3. Fundamento.

Cytospin 4 utiliza la fuerza centrífuga para depositar una capa de células en una zona concreta de los portaobjetos de vidrio, evitando las dificultades asociadas a las sedimentaciones realizadas mediante filtro o extensiones manuales (**Cytospin 4**).

A) Preparación del Cytoclip.

1. Rotular con lápiz un portaobjetos con el número de la muestra.
2. Seguidamente el portaobjetos (a) se coloca entre el Cytoclip (c) y el citocontenedor desechable (b), asegurándose el conjunto mediante el enganche del Cytoclip (Ilustración 2).

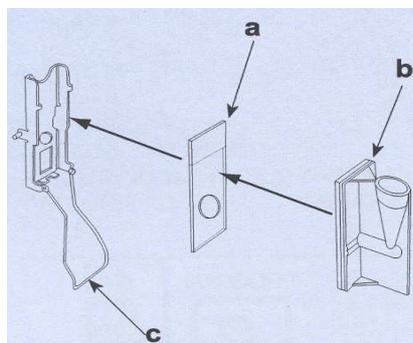
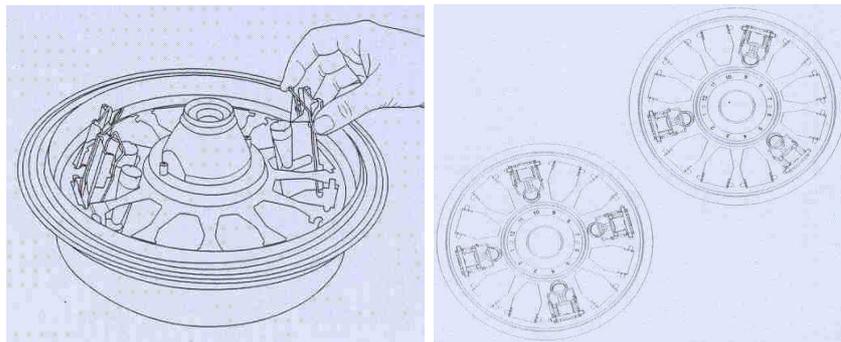


Ilustración 2. Montaje citocámara (Cytospin4)

B) Colocación del Cytoclip.

Abrimos la tapa del rotor, colocando cada Cytoclip en las ranuras existentes, con espacio suficiente para bascular entre la posición vertical y la inclinada, distribuyéndolos simétricamente para evitar errores de funcionamiento por desequilibrio del rotor (Ilustraciones 3 y 4).



Ilustraciones 3 y 4. Colocación y distribución de los cytoclips (Cytospin 4)

C) Retirada del portaobjetos.

Finalizado el programa, abrimos la tapa del equipo extrayendo el rotor y retiramos su tapadera. Seguidamente sacamos el citocontenedor desechable, evitando el arrastre de la muestra por el portaobjetos (Ilustración 5).

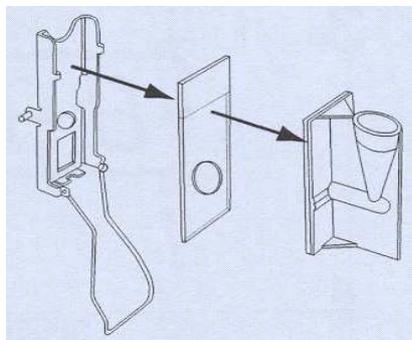


Ilustración 5. Retirada del portaobjetos (Cytospin 4)

III.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.-

Todos los datos fueron introducidos y posteriormente tratados estadísticamente mediante el programa informático SPSS 13.0 (SPSS, Chicago, IL) y el programa Epidat 3.0 (Epidat 2000, La Coruña, España).

Definimos la sensibilidad de la tinción de Gram como: “la probabilidad de detectar el microorganismo precozmente en el portaobjeto obtenido a partir de cada muestra respecto al total de muestras con cultivo positivo”.

Consideramos especificidad de la tinción de Gram a: “la probabilidad de obtener un resultado negativo en la tinción de aquellas muestras con cultivo negativo”.

El estudio de homogeneidad de los grupos muestrales se realizó mediante el análisis del χ^2 .

Para conocer la sensibilidad y especificidad de la tinción de Gram frente al resultado del cultivo, se crearon tablas de contingencia 2x2 para cada uno de los métodos de concentración empleados en la obtención de los portaobjetos. En la comparación de las sensibilidades obtenidas respecto al cultivo, por grupos de microorganismos y en presencia o ausencia de antibióticos para cada método de concentración, se crearon tablas de contingencia 2x2, calculándose el valor de χ^2 para dichas tablas.

Además, en el grupo de muestras relacionadas (obtención de portaobjetos simultáneamente por ambos métodos de concentración) se aplicó el test de McNemar o el análisis binomial para el estudio de las discrepancias.

En todos los casos se estableció el nivel de significación estadística para un valor $p \leq 0,05$.

III.7. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DISCORDANTES.-

En este apartado analizamos aquellos resultados en los que no se obtuvo una coincidencia entre el informe emitido inicialmente con la tinción de Gram y el resultado final del cultivo, en definitiva, estudiamos aquellas tinciones de Gram con resultado positivo y cultivo negativo o viceversa.

Los parámetros estudiados fueron: microorganismo aislado, servicio de procedencia de la muestra, sospecha diagnóstica motivo del estudio, purulencia de la muestra, presencia o ausencia de antibióticos y si el crecimiento del microorganismo se produjo tras la siembra directa de la muestra o a partir del medio de enriquecimiento correspondiente (BHI o Thioglicolato).

Además en aquellas muestras con tinción de Gram positiva y cultivo negativo se recurrió al estudio de la historia clínica para conocer el diagnóstico final que motivó el ingreso del paciente y la obtención de la muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. LÍQUIDOS CEFALORRAQUÍDEOS.-

Los LCR conformaron tres grupos de muestras en función del procesamiento empleado en la obtención del portaobjeto para su posterior tinción de Gram (tabla IV.1.a):

Método de concentración	Total de muestras	(%)
Citocentrifugación	698	52,1
Centrifugación	181	13,5
Ambos métodos	461	34,4
Total	1340	100

Tabla IV.1.a Distribución de los portaobjetos según su procesamiento.

Para poder realizar el estudio comparativo entre las muestras estudiamos la homogeneidad de los grupos (Tabla IV.1.b).

	CTC (n=698)	CENT (n=181)	Ambos (n=461)	p
Resultado del cultivo*				
Positivo	96 (13,8%)	28 (15,5%)	66 (14,3%)	NS
Negativo	602 (86,2%)	153 (84,5%)	395 (85,7%)	NS
Antibióticos**				
Presentes	243 (56,6%)	68 (56,7%)	190 (55,9%)	NS
Ausentes	186 (43,4%)	52 (43,3%)	150 (44,1%)	NS
Grupo microorganismos***				
Cocos Gram positivos	54 (56,3%)	16 (57,1%)	32 (48,5%)	NS
Bacilos Gram negativos	28 (29,2%)	5 (17,9%)	24 (36,4%)	NS
Bacilos Gram positivos	12 (12,5%)	5 (17,9%)	7 (10,6%)	NS
Diplococos Gram negativos	2 (2,1%)	0	0	NS
Hongos	0	2 (7,1%)	3 (4,5%)	NS

Tabla IV.1.b Análisis de la homogeneidad entre los grupos de muestras según el método de procesamiento para la obtención del portaobjetos.

CTC: citocentrifugación; CENT: centrifugación; Ambos: Citocentrifugación y centrifugación; *: $\chi^2=0,359$ (p=0,836); **: $\chi^2=0,05$ (p=0,975); *: $\chi^2=11,191$ (p=0,191); NS: no significativas.**

No se detectaron diferencias significativas al comparar las muestras sometidas sólo a citocentrifugación, centrifugación o por ambos métodos según las variables analizadas, realizándose su estudio comparativo.

IV.1.1. TINCIÓN DE GRAM Y RESULTADO DEL CULTIVO.-

A) Líquidos cefalorraquídeos procesados exclusivamente por centrifugación:

		Resultado del cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción de Gram	Positiva	14	2	16
	Negativa	14	151	165
	Total	28	153	181

La sensibilidad obtenida fue del 50% (IC 95% [29,7-70,3]) y su especificidad del 98,7% ($\chi^2=69,639$ con un valor de $p<0,001$).

B) Líquidos cefalorraquídeos procesados exclusivamente por citocentrifugación:

		Resultado del cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción de Gram	Positiva	75	12	97
	Negativa	21	590	611
	Total	96	602	698

La sensibilidad obtenida fue del 78,1% (IC 95% [69,3-86,9]) mientras que la especificidad se situó en el 98% ($\chi^2=439,838$ con un valor de $p<0,001$).

Las sensibilidades de la tinción de Gram de los portaobjetos obtenidos por ambos métodos de concentración se situaron en la franja descrita clásicamente del 40-90% (**Gill 2005; Sáez-Llorens 2003; Jensen 1993; Gray 1992**).

Comparación de las sensibilidades obtenidas:

	Resultado de la tinción de Gram		Total
	Positiva	Negativa	
Centrifugación	14	14	28
Citocentrifugación	75	21	96
Total	89	35	124

El valor de χ^2 fue de 8,464 con un valor $p=0,004$ siendo las diferencias entre las sensibilidades estadísticamente significativas, mejorando los resultados presentados por Chapin-Robertson y colaboradores, que no encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando compararon las sensibilidades obtenidas en el estudio de LCR por ambos métodos de concentración (**Chapin-Robertson 1992**), si bien habría que matizar que existen ciertas diferencias entre ambos trabajos:

- a) Chapin-Robertson comparó la citocentrifugación con la centrifugación de alta velocidad (11000 rpm), mientras que nosotros la comparamos con la centrifugación normal (3000 rpm), posiblemente el método más utilizado en los laboratorios de microbiología clínica;

- b) en nuestro caso el LCR fue directamente sometido a citocentrifugación frente al trabajo de Chapin-Robertson en el qué, tras una centrifugación inicial fue el sobrenadante el sometido a citocentrifugación para obtener el portaobjeto;
- c) en nuestro estudio, el volumen empleado en la preparación de los portaobjetos obtenidos por citocentrifugación fue siempre constante (0,2 mL), mientras que Chapin-Robertson empleó entre 0,25-0,5 mL, diferencia importante si contamos con que la muestra enviada no siempre es suficiente **(Chapin-Robertson 1992)**.

Para conocer si las diferencias entre las sensibilidades obtenidas por ambos métodos de concentración se mantienen estudiamos seguidamente:

C) Líquidos cefalorraquídeos en que se obtuvieron simultáneamente portaobjetos por ambos métodos de concentración:

Centrifugación:

		Resultado del cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción de Gram tras centrifugación	Positiva	28	6	34
	Negativa	38	389	427
	Total	66	395	461

En esta ocasión la sensibilidad fue del 42,4% (IC 95% [29,7-55,1]) y su especificidad del 98,5% ($\chi^2 = 138,514$ con un valor de $p < 0,001$).

Citocentrifugación:

		Resultado del cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción de Gram tras citocentrifugación	Positiva	40	9	49
	Negativa	26	386	412
	Total	66	395	461

La sensibilidad de la citocentrifugación en este grupo de muestras fue del 60,6% (IC 95% [48,1-73,1]) y su especificidad del 97,7% ($\chi^2 = 202,533$ con un valor de $p < 0,001$).

La sensibilidad en los portaobjetos obtenidos por ambos métodos de concentración se mantuvo dentro de la franja descrita del 40-90% (Gill 2005; Sáez-Llorens 2003; Jensen 1993; Gray 1992).

Comparación de las sensibilidades obtenidas:

	Resultado de la tinción de Gram		Total
	Positiva	Negativa	
Centrifugación	28	38	66
Citocentrifugación	40	26	66
Total	68	64	132

En esta ocasión el valor de χ^2 fue de 4,368 para una $p = 0,037$ siendo por ello las diferencias entre ambos métodos estadísticamente significativas.

Estudio de las discrepancias:

	Cultivo +	Cultivo -
Centrifugación + Citocentrifugación +	28	2
Centrifugación + Citocentrifugación -	0	4
Centrifugación - Citocentrifugación +	12	7
Centrifugación - Citocentrifugación -	26	382
Total	66	395

El análisis binomial aplicado a las muestras con cultivo positivo ofreció un valor de $p < 0,001$. Sin embargo al estudiar las muestras con cultivo negativo el valor obtenido fue $p = 0,274$.

Por tanto, podemos confirmar que las diferencias encontradas entre las sensibilidades obtenidas a partir de los portaobjetos sometidos a ambos métodos de concentración son estadísticamente significativas.

La especificidad alcanzada fue, independientemente del método empleado para la obtención del portaobjetos, superior al 97%, próximo al 100% establecido por la literatura para meningitis bacterianas agudas, no siendo sus diferencias estadísticamente significativas (**Gill 2005; Sáez-Llorens 2003; Dunbar 1998; Gray 1992; Marton 1986**).

IV.1.2. TINCIÓN DE GRAM Y MICROORGANISMOS AISLADOS.-

Con el fin de conocer la sensibilidad de la tinción de Gram de ambos métodos de concentración por grupos de microorganismos aislados en el cultivo, englobamos las muestras según el método de concentración empleado para la obtención del portaobjetos y su posterior tinción de Gram (tabla IV.1.2).

Microorganismos	Centrifugación		Citocentrifugación	
	Nº aislados	Tinción +	Nº aislados	Tinción +
BGN				
<i>E. cloacae</i>	8	3	18	11
<i>E. coli</i>	8	4	11	11
<i>P. aeruginosa</i>	2	2	11	10
<i>A. baumannii</i>	5	4	8	7
<i>C. koseri</i>	1	1	2	2
<i>E. aerogenes</i>	2	2	1	1
<i>H. influenzae</i>	2	0	1	0
<i>P. mirabilis</i>	1	1	-	-
Total	29	17	52	42
CGP				
<i>S. epidermidis</i>	24	4	47	28
<i>S. pneumoniae</i>	7	7	13	13
<i>S. haemolyticus</i>	6	5	8	8
<i>E. faecalis</i>	6	4	6	5
<i>S. aureus</i>	1	0	5	4
<i>Micrococcus spp</i>	3	3	2	1
<i>S. hominis-hominis</i>	1	0	3	1
<i>S. agalactiae</i>	-	-	1	1
<i>A. viridans</i>	1	0	1	0
Total	49	23	86	61
DCGN				
<i>N. meningitidis</i>	-	-	2	2
Total	-	-	2	2
BGP				
<i>P. acnes</i>	5	2	12	7
<i>L. monocytogenes</i>	6	0	5	2
<i>C. jeikeium</i>	-	-	1	0
<i>Rhodococcus spp</i>	1	0	1	0
Total	12	2	19	9
HONGOS				
<i>C. tropicalis</i>	3	1	2	1
<i>C. glabrata</i>	1	0	-	-
<i>C. neoformans</i>	1	0	1	0
Total	5	1	3	1
TOTAL	95	43	162	115

Tabla IV.1.2. Detección de los microorganismos aislados en cultivo por la tinción de Gram según el método de concentración empleado.

Las sensibilidades obtenidas por grupo de microorganismos en las muestras procesadas por centrifugación fueron del: 58,6% en los BGN, seguido de CGP (46,9%) y BGP (16,6%). En las muestras procesadas por citocentrifugación las sensibilidades fueron del: 100% en los DCGN, 80,7% para los BGN, 70,9% en los CGP y del 47,3% con los BGP.

La sensibilidad obtenida en el grupo de BGN en los portaobjetos obtenidos por centrifugación se mantuvo dentro del margen del 50-60% descrito en la literatura (**Unhanand 1993; Greenlee 1990**), mientras que en los portaobjetos obtenidos por citocentrifugación fue superior. En ambos casos estas sensibilidades fueron superiores a las obtenidas para el grupo de CGP.

Esta menor sensibilidad en el grupo de los CGP, puede ser explicada por la diversidad de microorganismos que conforman dicho grupo. De hecho, la sensibilidad para *S. pneumoniae* fue en ambos métodos de concentración del 100% (superior al 90% expuesto en la literatura) (**Sáez-Llorens 2003**), mientras que para *S. epidermidis* fue del 16,6% en los portaobjetos obtenidos por centrifugación frente al 59,6% en los obtenidos por citocentrifugación, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2 = 11,815$; $p = 0,001$)

Los escasos aislamientos de hongos no permitieron establecer sensibilidades concluyentes.

Ante estos datos estudiamos si se produjeron diferencias entre las sensibilidades de cada método de concentración y grupo de microorganismo:

Bacilos Gram Negativos:

	Resultado de la tinción de Gram		Total
	Positiva	Negativa	
Centrifugación	17	12	29
Citocentrifugación	42	10	52
Total	59	22	81

El valor de χ^2 fue igual a 4,616 con un valor $p=0,032$ siendo las diferencias estadísticamente significativas en este grupo.

Cocos Gram Positivos:

	Resultado de la tinción de Gram		Total
	Positiva	Negativa	
Centrifugación	23	26	49
Citocentrifugación	61	25	86
Total	84	51	135

El valor de χ^2 obtenido fue 7,643 con un valor $p=0,006$ siendo las diferencias entre ambos métodos de concentración estadísticamente significativas.

Bacilos Gram Positivos:

	Resultado de la tinción de Gram		Total
	Positiva	Negativa	
Centrifugación	2	10	12
Citocentrifugación	9	10	19
Total	11	20	31

El valor de χ^2 fue igual a 3,028 con un valor $p=0,082$ no siendo las diferencias estadísticamente significativas, posiblemente por el menor número de aislamientos.

IV.1.3. EFECTO DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LA TINCIÓN DE GRAM.-

Para conocer el efecto de los antibióticos en la tinción de Gram respecto al cultivo según el método de concentración empleado en la preparación del portaobjetos, englobamos los líquidos cefalorraquídeos en dos grupos (Tabla IV.1.3.a).

Presencia de antibióticos	Método de concentración	
	Centrifugación	Citocentrifugación
Si	258	433
No	202	336
No consta	182	390
Total	642	1159

Tabla IV.1.3.a. Distribución de los líquidos cefalorraquídeos según el procesamiento de los portaobjetos y la presencia o ausencia de antibióticos. $\chi^2 =5,236$; $p=0,068$.

A) Resultado de la tinción de Gram en presencia de antibióticos en el líquido cefalorraquídeo:

Centrifugación:

		Resultado del cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción de Gram tras centrifugación	Positiva	31	4	35
	Negativa	36	187	223
	Total	67	191	258

La sensibilidad fue del 46,2% en presencia de antibióticos (IC 95% [33,6-58,9]), mientras que la especificidad se situó en el 97,9% ($\chi^2 = 82,546$ con un valor de $p < 0,001$).

Citocentrifugación:

		Resultado del cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción de Gram tras citocentrifugación	Positiva	81	17	98
	Negativa	32	303	335
	Total	113	320	433

La sensibilidad fue del 71,6% (IC 95% [62,9-80,4]) y la especificidad del 94,6% ($\chi^2 = 210,075$ con un valor de $p < 0,001$).

Comparación de las sensibilidades obtenidas:

	Resultado de la tinción de Gram		Total
	Positiva	Negativa	
Centrifugación	31	36	67
Citocentrifugación	81	32	113
Total	112	68	180

El resultado de χ^2 obtenido fue igual a 11,556 con un valor $p=0,001$ siendo las diferencias entre ambos métodos de concentración en presencia de antibióticos estadísticamente significativas.

B) Resultado de la tinción de Gram en ausencia de antibióticos en el líquido cefalorraquídeo:

Centrifugación:

		Resultado del cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción de Gram tras centrifugación	Positiva	8	3	11
	Negativa	9	182	191
	Total	17	185	202

La sensibilidad obtenida fue del 47% (IC 95% [20,3-73,7]), mientras que la especificidad fue del 98,3% ($\chi^2 =62,427$ con un valor de $p<0,001$).

Citocentrifugación:

		Resultado del cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción de Gram tras citocentrifugación	Positiva	25	0	25
	Negativa	8	303	311
	Total	33	303	336

La sensibilidad alcanzó el 75,7% (IC 95% [59,6-91,8]), siendo la especificidad del 100% ($\chi^2=247,998$ con un valor de $p<0,001$).

Comparación de las sensibilidades obtenidas:

	Resultado de la tinción de Gram		Total
	Positiva	Negativa	
Centrifugación	8	9	17
Citocentrifugación	25	8	33
Total	33	17	50

El resultado de χ^2 obtenido fue igual a 4,118 con una $p=0,042$ siendo las diferencias entre ambos métodos de concentración en ausencia de antibióticos estadísticamente significativas.

Tanto en presencia como en ausencia de antibióticos, las sensibilidades de los portaobjetos obtenidos por citocentrifugación se mantuvieron dentro de los límites presentados por la literatura (40-90%), discretamente mejores en ausencia de antibióticos (Gill 2005; Sáez-Llorens 2003; Jensen 1993; Gray 1992).

En la siguiente tabla (IV.1.3.b) presentamos de forma resumida las diferentes sensibilidades obtenidas por cada método de concentración empleado según las diferentes variables estudiadas (cultivo, grupo de microorganismos y antibióticos).

	Centrifugación	Citocentrifugación	p
Por grupo de muestras:			
Un único método	50%	78,1%	0,004
Ambos métodos	42,4%	60,6%	0,037
Por grupo de microorganismos			
Bacilos Gram Negativos	58,6%	80,7%	0,032
Cocos Gram Positivos	46,9%	70,9%	0,006
Bacilos Gram Positivos	16,6%	47,3%	0,082
Presencia de antibióticos			
Si	46,2%	71,6%	0,001
No	47%	75,7%	0,042

Tabla IV.1.3.b. Resumen comparativo de las sensibilidades de la tinción de Gram frente al resultado del cultivo.

IV.1.4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DISCORDANTES.-

A) Líquidos cefalorraquídeos con cultivo positivo y tinción de Gram negativa:

Se produjeron un total de 190 muestras con cultivo positivo, en 52 de ellas el resultado de la tinción de Gram a partir de portaobjetos obtenidos por centrifugación fue negativo (tabla V.1.4.a), frente a los 47 portaobjetos obtenidos por citocentrifugación con tinción negativa (tabla IV.1.4.b).

Nº de casos	Tinción de Gram centrifugación	Aislamiento	Recuento	TTO	Sospecha diagnóstica	Recuperación
1	Negativo	<i>A. baumannii</i>	<10	Desc	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Cultivo directo
2-5	Negativo	<i>E. cloacae</i>	100-500	Si	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Cultivo directo
6	Negativo	<i>E. cloacae</i>	<10	Desc	Síndrome febril	Medio enriquecimiento
7-10	Negativo	<i>E. coli</i>	500-1000	Si	Hidrocefalia + IDVP	Cultivo directo
11	Negativo	<i>H. influenzae</i>	100-500	No	No consta	Cultivo directo
12	Negativo	<i>H. influenzae</i>	>1000	No	Meningitis	Cultivo directo
13	Negativo	<i>S. aureus</i>	100-500	Si	No consta	Cultivo directo
14-17	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	50-100	Si	No consta	Cultivo directo
18-19	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	<10	Si	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Cultivo directo
20	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	<10	Si	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Medio enriquecimiento
21-22	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	10-50	No	Hemorragia subaracnoidea	Medio enriquecimiento
23	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	<10	No	No consta	Cultivo directo
24-29	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	10-50	Si	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Medio enriquecimiento
30-32	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	<10	Si	Hidrocefalia	Medio enriquecimiento
33-34	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	10-50	Desc	No consta	Cultivo directo
35	Negativo	<i>S. hominis</i>	10-50	Desc	No consta	Cultivo directo

Nº de casos	Tinción de Gram centrifugación	Aislamiento	Recuento	TTO	Sospecha diagnóstica	Recuperación
36	Negativo	<i>S. haemolyticus</i>	<10	Si	Meningitis	Cultivo directo
37	Negativo	<i>E. faecalis</i>	100-500	Si	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Cultivo directo
38	Negativo	<i>E. faecalis</i>	>1000	Si	Meningitis	Cultivo directo
39	Negativo	<i>A. viridans</i>	10-50	No	Inmunodeprimido	Medio enriquecimiento
40	Negativo	<i>P. acnes</i>	10-50	Desc	No consta	Medio enriquecimiento
41	Negativo	<i>P. acnes</i>	10-50	Si	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Medio enriquecimiento
42	Negativo	<i>P. acnes</i>	<10	Si	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Cultivo directo
43	Negativo	<i>L. monocytogenes</i>	500-1000	Si	Síndrome confusional	Cultivo directo
44-47	Negativo	<i>L. monocytogenes</i>	100-500	Si	Varios ¹	Cultivo directo
48	Negativo	<i>Rhodococcus</i> spp	100-500	Si	Hematoma subdural	Cultivo directo
49	Negativo	<i>C. glabrata</i>	<10	Si	No consta	Cultivo directo
50-51	Negativo	<i>C. tropicalis</i>	10-50	Si	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Cultivo directo
52	Negativo	<i>C. neoformans</i>	50-100	Si	Meningitis	Cultivo directo

Tabla IV.1.4.a. Distribución de los líquidos cefalorraquídeos con tinción de Gram negativa tras centrifugación de la muestra y cultivo positivo. Recuento: recuento leucocitario; TTO: tratamiento; Desc: Desconocido; Varios¹: encefalitis, síndrome febril, síndrome confusional.

Nº de casos	Tinción de Gram citocentrifugación	Aislamiento	Recuento	TTO	Sospecha diagnóstica	Recuperación
1	Negativo	<i>A. baumannii</i>	<10	Desc	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Cultivo directo
2	Negativo	<i>P. aeruginosa</i>	>1000	Si	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Cultivo directo
3-7	Negativo	<i>E. cloacae</i>	100-500	Si	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Cultivo directo
8	Negativo	<i>E. cloacae</i>	50-100	Si	Hidrocefalia	Cultivo directo
9	Negativo	<i>E. cloacae</i>	<10	Desc	Síndrome febril	Medio enriquecimiento
10	Negativo	<i>H. influenzae</i>	>1000	No	Meningitis	Cultivo directo
11	Negativo	<i>S. aureus</i>	100-500	Si	No consta	Cultivo directo
12-16	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	10-50	Si	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Medio enriquecimiento
17-19	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	100-500	No	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Cultivo directo
20-22	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	<10	Si	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Cultivo directo
23-24	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	10-50	Si	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Cultivo directo
25	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	<10	Si	Post-cirugía	Medio enriquecimiento
26-28	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	<10	Si	Hidrocefalia	Medio enriquecimiento
29-30	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	10-50	Desc	No consta	Cultivo directo
31	Negativo	<i>S. hominis</i>	10-50	Si	No consta	Cultivo directo
32	Negativo	<i>S. hominis</i>	10-50	Desc	No consta	Cultivo directo

Nº de casos	Tinción de Gram citocentrifugación	Aislamiento	Recuento	TTO	Sospecha diagnóstica	Recuperación
33	Negativo	<i>E. faecalis</i>	100-500	Si	Hidrocefalia	Cultivo directo
34	Negativo	<i>Micrococcus</i> spp	10-50	Si	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Cultivo directo
35	Negativo	<i>A. viridans</i>	10-50	No	Inmunodeprimido	Medio enriquecimiento
36-39	Negativo	<i>P. acnes</i>	10-50	Si	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Cultivo directo
40	Negativo	<i>P. acnes</i>	10-50	Si	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Medio enriquecimiento
41-43	Negativo	<i>L. monocytogenes</i>	100-500	Si	Varios ¹	Cultivo directo
44	Negativo	<i>C. jeikeium</i>	10-50	Si	Síndrome febril	Medio enriquecimiento
45	Negativo	<i>Rhodococcus</i> spp	100-500	Si	Hematoma subdural	Cultivo directo
46	Negativo	<i>C. tropicalis</i>	10-50	Si	Infección drenaje ventrículo peritoneal	Cultivo directo
47	Negativo	<i>C. neoformans</i>	50-100	Si	Meningitis	Cultivo directo

Tabla IV.1.4.b. Distribución de los líquidos cefalorraquídeos con tinción de Gram negativa tras citocentrifugación de la muestra y cultivo positivo. Recuento: recuento leucocitario; TTO: tratamiento; Desc: Desconocido; Varios¹: encefalitis, síndrome febril, síndrome confusional.

El grupo de estafilococos coagulasa negativa fueron los microorganismos más aislados en cultivo con tinción de Gram negativa, y en especial *S. epidermidis* (40,4% tanto en los portaobjetos obtenidos por citocentrifugación como por centrifugación). En los portaobjetos obtenidos por citocentrifugación el segundo microorganismo menos detectado en la tinción de Gram fue *E. cloacae*, mientras que en los portaobjetos obtenidos por centrifugación fueron *E. cloacae* y *L. monocytogenes*. Destacar que todos los *E. coli* (n=4) no detectados en los portaobjetos obtenidos por centrifugación, si lo fueron en los obtenidos por citocentrifugación.

La principal sospecha diagnóstica asociada a este grupo de muestras fue la infección de drenaje ventrículo-peritoneal (57,4% en los portaobjetos obtenidos por citocentrifugación y un 44,2% tras centrifugación), seguida por la sospecha clínica de hidrocefalia (10,6% y 5,7% respectivamente).

Predominaron las muestras con 10 a 50 leucocitos/mm³ (42,5% citocentrifugación y 30,7% centrifugación), así como la presencia de antibióticos (78,7% citocentrifugación y 76,9% en las centrifugadas).

B) Líquidos cefalorraquídeos con cultivo negativo y tinción de Gram positiva:

De las 1150 muestras con cultivo negativo, sólo 27 presentaron una tinción de Gram positiva independientemente del método de concentración empleado.

En el 44,4% de las muestras (n=12) sólo se obtuvieron portaobjetos por citocentrifugación, en 2 casos (7,4%) sólo fueron obtenidos por centrifugación de la muestra y en las 13 restantes se obtuvieron de forma simultánea portaobjetos por ambos métodos de concentración (48,2%).

Su análisis detallado lo presentamos en la siguiente tabla (IV.1.4.c):

Nº caso	Fecha	Tinción de Gram		Recuento	% PMN	TTO	Diagnóstico al alta	Cultivos previos (fecha)
		CTC	CENT					
1	16/05/03	BGN	No hecho	100-500	90	Si	Ventriculitis purulenta	LCR + <i>E. coli</i> (13/03/04)
2	15/03/04	CGP	No hecho	500-1000	99	Si	Meningitis	LCR + <i>S. pneumoniae</i> (11/03/04)
3	02/08/04	BGN	No hecho	100-500	90	Si	Hemorragia subaracnoidea	LCR + <i>A. baumannii</i> (22/07/04)
4	18/08/03	CGP	No hecho	500-1000	90	Desc	Meningitis decapitada	NO
5	11/05/04	CGP	No hecho	50-100	80	Si	Meningoencefalitis IDVP	LCR + <i>S. epidermidis</i> (07/05/04)
6	12/05/04	CGP	No hecho	50-100	75	Si	Meningoencefalitis IDVP	LCR + <i>S. epidermidis</i> (07/05/04)
7	05/01/05	CGP	No hecho	500-1000	90	Si	Meningitis	LCR + <i>S. pneumoniae</i> (01/01/05)
8	20/09/04	CGP	No hecho	500-1000	99	Si	IDVP	NO
9	18/02/03	DCGN	No hecho	>1000	99	Si	Meningitis meningocócica	Hemocultivo + <i>N. meningitidis</i> (17/02/03)
10	03/03/03	DCGN	No hecho	>1000	99	Si	Síndrome meníngeo	Hemocultivos negativos (04/03/03)
11	27/04/04	DCGN	No hecho	500-1000	90	Si	Meningitis decapitada	Hemocultivos negativos (28/04/04)
12	08/04/03	DCGN	No hecho	>1000	99	Desc	Sepsis y meningitis meningocócica	Hemocultivos negativos (09/04/03)
13	06/04/05	No hecho	BGN	100-500	90	Si	Hidrocefalia	LCR + <i>E. coli</i> (01/04/05)
14	30/06/05	No hecho	BGP	10-50	20	Si	IDVP	LCR + <i>P. acnes</i> (01/07/05)

Nº caso	Fecha	Tinción de Gram		Recuento	% PMN	TTO	Diagnóstico al alta	Cultivos previos (fecha)
		CTC	CENT					
15	04/04/05	Negativo	BGN	<10	<10	Si	Síndrome confusional agudo	NO
16	20/07/05	Negativo	CGP	<10	<10	Si	Neuropatía	NO
17	03/08/05	Negativo	BGN	<10	<10	No	Mielomeningocele	NO
18	22/09/05	Negativo	BGN	50-100	60	No	Hemorragia subaracnoidea	NO
19	09/04/05	DCGN	Negativo	>1000	99	Si	Meningitis decapitada	NO
20	04/04/05	BGN	BGN	10-50	90	Si	IDVP	LCR + <i>E. cloacae</i> (01/04/05)
21	07/04/04	BGN	Negativo	10-50	80	Si	IDVP	LCR + <i>C. koseri</i> (01/04/05)
22	08/04/05	BGN	Negativo	100-500	90	Si	Hidrocefalia	LCR + <i>E. coli</i> (06/04/05)
23	15/04/05	BGN	Negativo	100-500	90	Si	Hidrocefalia	LCR + <i>E. coli</i> (06/04/05)
24	06/02/06	BGN	Negativo	50-100	75	Si	IDVP	LCR + <i>E. cloacae</i> (29/01/06)
25	15/10/05	BGN	Negativo	50-100	80	Si	IDVP	LCR + <i>A. baumannii</i> (13/10/05)
26	26/10/04	CGP	CGP	>1000	99	Si	Meningitis	Hemocultivo + <i>S. pneumoniae</i> (27/10/04)
27	09/03/06	DCGN	Negativo	100-500	90	Si	Meningitis decapitada	NO

Tabla IV.1.4.c. Resultados positivos del cultivo de líquidos cefalorraquídeos con tinción de Gram negativa.

TTO: tratamiento; Desc: Desconocido; CTC: citocentrifugación; CENT: centrifugación; IDVP: Infección drenaje ventrículo-peritoneal.

Todas las muestras con tinción de Gram positiva en portaobjetos obtenidos por citocentrifugación (casos 1 al 12 y 19 al 27), presentaban purulencia con predominio polimorfonuclear y los diagnósticos definitivos al alta de los pacientes se correspondían con un cuadro infeccioso. El 66,6% de ellas habían tenido un cultivo previo positivo bien a partir del LCR o de hemocultivo con un microorganismo de idénticas características tintoriales a los observados en la tinción de Gram y en el 90,4% existía tratamiento antibiótico previo a la obtención de la muestra, circunstancia contemplada en la literatura como causa de resultado positivo de la tinción y ausencia de crecimiento en las placas de cultivo (**Kanegaye 2001**), lo que aumenta el valor de la citocentrifugación en el diagnóstico precoz de la infección bacteriana aguda y más aún en el seguimiento del paciente con dicho proceso y tratamiento antibiótico con el fin de suspender o mantener el mismo.

En los casos 15 al 27 (muestras procesadas simultáneamente por ambos métodos de concentración), 7 de ellos fueron detectados (tinción de Gram positiva) solamente en los portaobjetos obtenidos por citocentrifugación. Por el contrario, en cuatro portaobjetos obtenidos por centrifugación (casos 15 al 18) se visualizaron bacterias que no fueron detectadas en los portaobjetos preparados por citocentrifugación, en ninguno de los cuáles el diagnóstico final correspondió a un cuadro de naturaleza infecciosa. Por tanto la citocentrifugación tiene menor número de resultados falsos positivos que la centrifugación al disminuir la presencia de restos celulares que puedan inducir a error en el examen de la tinción (**Ackerman 2007; Chapin 2003**).

Para conocer si se produjeron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de la tinción de Gram de los portaobjetos obtenidos simultáneamente por ambos métodos de concentración, estudiamos aquellos casos (19 al 27) con diagnóstico final del cuadro de características infecciosas (meningitis decapitada, infección drenaje ventrículo-peritoneal...) y además con aislamientos obtenidos en muestras previas o simultáneas (caso de hemocultivos), mediante la siguiente tabla:

		Centrifugación		
		Positiva	Negativa	Total
Citocentrifugación	Positiva	2	7	9
	Negativa	0	0	0
	Total	2	7	9

En esta ocasión el análisis binomial nos ofreció un valor $p=0,008$, siendo por tanto las diferencias estadísticamente significativas.

Por todo ello, la citocentrifugación se presenta como una técnica de gran utilidad, muy superior a la centrifugación ($p<0,01$), en la identificación de microorganismos de forma precoz en la tinción de Gram, y en especial en aquellos casos con resultado del cultivo negativo. Este aspecto es, a nuestro entender, de vital importancia en pacientes portadores de sistemas de drenaje ventriculares, en los que ante la sospecha de infección del mismo se obtienen múltiples muestras en el seguimiento del proceso infeccioso y en los que el tratamiento antibiótico adecuado ha sido instaurado.

Además, podemos sugerir que, dado que nuestro estudio sólo comparó la tinción de Gram con el diagnóstico obtenido en la siembra directa del LCR, sin tener en cuenta resultados de: hemocultivos, diagnóstico al alta del paciente, aplicación de técnicas de diagnóstico molecular, pruebas antigenémicas u otras pruebas complementarias de laboratorio, la sensibilidad de la tinción de Gram obtenida por ambos métodos de concentración, y en especial por la citocentrifugación, puede ser superior a la que presentamos. Por ello creemos necesario ampliar estos estudios para conocer el verdadero alcance de la sensibilidad de la tinción de Gram tras aplicación de la citocentrifugación y la detección de diferencias frente a la centrifugación clásica.

IV.2. LÍQUIDOS ASCÍTICOS y/o PERITONEALES.-**IV.2.1. TINCIÓN DE GRAM Y RESULTADO DEL CULTIVO.-****Centrifugación:**

		Resultado del cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción de Gram tras centrifugación	Positiva	7	0	7
	Negativa	46	267	313
	Total	53	267	320

La sensibilidad obtenida fue del 13,2% (IC 95% [3,1-23,2]), mientras que la especificidad fue del 100 ($\chi^2=36,053$ con un valor de $p<0,001$).

Citocentrifugación:

		Resultado del cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción de Gram tras citocentrifugación	Positiva	19	3	22
	Negativa	34	264	298
	Total	53	267	320

La sensibilidad de los portaobjetos obtenidos por citocentrifugación fue del 35,8% (IC 95% [21,9-49,7]), con una especificidad del 98,9% ($\chi^2=83,29$ con un valor de $p<0,001$).

La sensibilidad obtenida tras citocentrifugación fue superior a la obtenida con la centrifugación, si bien sólo la primera se situó dentro de los valores de sensibilidad (20-40%) reconocidos en la literatura (**Weinstein 1978**).

Comparación de las sensibilidades obtenidas:

	Resultado de la tinción de Gram		Total
	Positiva	Negativa	
Centrifugación	7	46	53
Citocentrifugación	19	34	53
Total	26	80	106

El valor de χ^2 fue de 7,338 con una $p=0,007$ siendo las diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos de concentración.

Estudio de las discrepancias:

	Cultivo +	Cultivo -
Centrifugación + Citocentrifugación +	7	0
Centrifugación + Citocentrifugación -	0	0
Centrifugación - Citocentrifugación +	12	3
Centrifugación - Citocentrifugación -	34	264
Total	53	267

El análisis binomial de las discrepancias presentes en las muestras con cultivo positivo ofreció un valor de $p<0,001$. Sin embargo, por cultivo negativo el valor de p fue mayor 0,05.

Por tanto, podemos confirmar que las diferencias encontradas entre las sensibilidades obtenidas a partir de los portaobjetos sometidos a ambos métodos de concentración son estadísticamente significativas.

La especificidad alcanzada fue, independientemente del método empleado para la obtención del portaobjetos, superior al 98,9%, no siendo sus diferencias estadísticamente significativas.

Dado las diversas sospechas clínicas de los líquidos ascíticos (diálisis peritoneal, peritonitis bacteriana espontánea, post-cirugía...) y como afectan estos a la sensibilidad de la tinción de Gram, desglosamos las muestras por grupos diagnósticos (peritonitis primaria, secundaria o asociada a diálisis peritoneal) y el método de concentración empleado:

Centrifugación:

		Resultado del cultivo								
		Peritonitis primaria			Peritonitis secundaria			Diálisis peritoneal ambulatoria		
		Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción	Positiva	1	0	1	3	0	3	3	0	3
	Negativa	6	81	87	12	28	40	28	158	186
	Total	7	81	88	15	28	43	31	158	189

El mejor dato de sensibilidad lo obtuvimos en las muestras con sospecha clínica de peritonitis secundaria con un 25% (IC 95% [0-43,5]) ($\chi^2 = 6,02$ con un valor de $p=0,014$), seguido de la sensibilidad de los cuadros de peritonitis primaria con un 14,3% (IC 95% [0-47,3]) ($\chi^2 = 11,704$ con un valor de $p<0,001$). El valor más bajo de sensibilidad se obtuvo en el grupo de muestras procedentes de diálisis peritoneal ambulatoria con un 10,3% de portaobjetos positivos (IC 95% [0-21,7]) ($\chi^2 = 15,537$ con un valor de $p<0,001$). En todos los casos la especificidad fue del 100%.

Citocentrifugación:

		Resultado del cultivo								
		Peritonitis primaria			Peritonitis Secundaria			Diálisis peritoneal ambulatoria		
		Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción	Positiva	4	2	6	6	0	8	9	1	10
	Negativa	3	79	82	9	28	37	22	157	179
	Total	7	81	88	15	28	43	31	158	189

En este grupo de muestras la mayor sensibilidad correspondió al grupo de muestras de peritonitis primaria con el 57,1% (IC 95% [13,3-100]) ($\chi^2 = 30,315$ con un valor de $p < 0,001$), seguido de las muestras de peritonitis secundaria con un 40% (IC 95% [11,8-68,1]) ($\chi^2 = 13,016$ con un valor de $p < 0,001$) y finalmente las muestras de pacientes sometidos a diálisis peritoneal ambulatoria con un 29% (IC 95% [11,4-44,6]) ($\chi^2 = 41,71$ con un valor de $p < 0,001$). La especificidad se situó por encima del 97,5%.

Al comparar los resultados mediante el análisis binomial por sospecha diagnóstica, sólo encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,016$) en las muestras procedentes de diálisis peritoneal ambulatoria, siendo la citocentrifugación fundamental en el diagnóstico de una infección a la que clásicamente se le achaca un valor negativo de la tinción de Gram en la literatura (**Rubin 1980**).

IV.2.2. TINCIÓN DE GRAM Y MICROORGANISMOS AISLADOS.-

En la tabla IV.2.2. se muestra la distribución por grupo de microorganismos y su detección en la tinción de Gram según el método de concentración empleado en la preparación del portaobjetos.

Microorganismos	Nº aislados	Centrifugación	Citocentrifugación
BGN			
<i>Enterobacteriaceae</i>	15	2	6
BGN no fermentadores	1	0	1
<i>Bacteroides</i> spp	1	0	0
Total	17	2	7
CGP			
<i>S. aureus</i>	6	1	2
Estafilococos coagulasa negativa	14	0	1
<i>S. pneumoniae</i>	1	0	1
<i>E. faecium</i>	1	1	1
S. grupo <i>viridans</i>	2	0	0
Total	24	2	5
Cultivo mixto	12	3	7
TOTAL	53	7	19

Tabla IV.2.2. Distribución microorganismos aislados y detección en la tinción de Gram.

La sensibilidad de la tinción de Gram tras aplicar la centrifugación fue inferior en todos los grupos: 25% cultivo mixto (58,3% tras citocentrifugación); 11,7% BGN (41,1% con citocentrifugación); y 8,3% CGP (20,8% en las muestras obtenidas por citocentrifugación); si bien sólo fueron estadísticamente significativas en el grupo de los BGN ($p=0,031$).

Todos los microorganismos identificados en los portaobjetos obtenidos por centrifugación, fueron detectados en los obtenidos por citocentrifugación.

La sensibilidad de los portaobjetos obtenidos por citocentrifugación para CGP en racimo fue del 15%, frente al 50% de los CGP en cadena. Dentro de estos, *S. aureus* presentó una sensibilidad en la tinción de Gram del 33,3%, frente al 7,1% de los estafilococos coagulasa negativa (*S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. lugdunensis*...).

IV.2.3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DISCORDANTES.-

A) Líquidos ascíticos con cultivo positivo y tinción de Gram negativa:

Se obtuvieron un total de 53 cultivos positivos, 34 de los cuáles presentaron una tinción de Gram negativa a partir de los portaobjetos obtenidos por citocentrifugación, frente a los 46 resultados negativos obtenidos tra el examen de la tinción de Gram de los portaobjetos procesados por centrifugación. En la tabla IV.2.3. presentamos las características de dichas muestras.

Nº de casos	Tinción de Gram		Aislamiento	Recuento	TTO	Sospecha diagnóstica	Recuperación
	CTC	CENT					
1	BGN	Negativo	<i>A. lowfii</i>	+++	Desc	No consta	Cultivo directo
2	BGN	Negativo	<i>C. koseri</i>	++	No	Post-cirugía	Medio enriquecimiento
3-4	BGN	Negativo	<i>E. coli</i>	++	Desc	Post-cirugía	Cultivo directo
5	BGN	Negativo	<i>Klebsiella</i> spp	+++	No	Peritonitis	Cultivo directo
6-7	FM	Negativo	Flora mixta	-	No	Diálisis peritoneal ambulatoria	Cultivo directo
8	FM	Negativo	Flora mixta	+++	No	Peritonitis	Cultivo directo
9	FM	Negativo	Flora mixta	+	Si	Peritonitis	Cultivo directo
10	CGP	Negativo	<i>S. aureus</i>	++	Si	Cirrosis	Cultivo directo
11	CGP	Negativo	<i>S. hominis</i>	++	Si	Insuficiencia renal aguda	Cultivo directo
12	CGP	Negativo	<i>S. pneumoniae</i>	++	Desc	Ascitis	Cultivo directo
13	Negativo	Negativo	<i>Bacteroides</i> spp	+	Si	Post-cirugía	Cultivo directo
14	Negativo	Negativo	<i>C. koseri</i>	+++	No	Diálisis peritoneal ambulatoria	Cultivo directo
15-17	Negativo	Negativo	<i>E. coli</i>	+++	No	Post-cirugía	Medio enriquecimiento
18	Negativo	Negativo	<i>E coli</i>	+	Si	Post-cirugía	Cultivo directo
19-20	Negativo	Negativo	<i>E coli</i>	+	No	Diálisis peritoneal ambulatoria	Cultivo directo
21-22	Negativo	Negativo	<i>K. pneumoniae</i>	++	Si	Post-cirugía	Medio enriquecimiento

Nº de casos	Tinción de Gram		Aislamiento	Recuento	TTO	Sospecha diagnóstica	Recuperación
	CTC	CENT					
23	Negativo	Negativo	Flora mixta	++	No	Diálisis peritoneal ambulatoria	Medio enriquecimiento
24-25	Negativo	Negativo	Flora mixta	++	No	Post-cirugía	Cultivo directo
26-27	Negativo	Negativo	Flora mixta	++	Si	Post-cirugía	Cultivo directo
28-31	Negativo	Negativo	<i>S. aureus</i>	+++	Si	Diálisis peritoneal ambulatoria	Medio enriquecimiento
32-33	Negativo	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	+	No	Diálisis peritoneal ambulatoria	Medio enriquecimiento
34-35	Negativo	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	++	Si	Peritonitis	Medio enriquecimiento
36-37	Negativo	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	+++	Si	Peritonitis	Cultivo directo
38-39	Negativo	Negativo	<i>S. grupo viridans</i>	++	Desc	Diálisis peritoneal ambulatoria	Medio enriquecimiento
40-42	Negativo	Negativo	SCN	+++	No	Diálisis peritoneal ambulatoria	Medio enriquecimiento
43-45	Negativo	Negativo	SCN	++	No	Diálisis peritoneal ambulatoria	Medio enriquecimiento
46	Negativo	Negativo	SCN	+++	Si	Peritonitis	Cultivo directo

Tabla IV.2.3. Distribución de los líquidos peritoneales con tinción de Gram negativa y cultivo positivo.

TTO: tratamiento; CTC: citocentrifugación; CENT: centrifugación; Desc: Desconocido; FM: flora mixta; SCN: Estafilococos coagulasa negativa.

En las muestras procesadas por ambos métodos de concentración fueron las enterobacterias y los estafilococos coagulasa negativa los principales grupos de microorganismos con tinción de Gram negativa. Por aislamientos *S. epidermidis* y *E. coli* fueron los que con mayor frecuencia se acompañaron de tinción de Gram negativa en los portaobjetos obtenidos por citocentrifugación (17,6% en ambos casos), mientras que en los portaobjetos obtenidos por centrifugación fueron los cultivos mixtos los menos detectados (19,6%) seguidos por *E. coli* (17,3%).

El principal motivo para la obtención de la muestra fue la diálisis peritoneal ambulatoria (50% citocentrifugación y 43,4% centrifugación).

Los cultivos positivos a partir de medios de enriquecimiento fueron los que mayor número de tinciones negativas presentaron en ambos métodos de concentración (66,6% citocentrifugación y 54,3% tras centrifugación).

No hubo diferencias en el recuento leucocitario y la presencia o no de antibióticos.

B) Líquidos ascíticos con cultivo negativo y tinción de Gram positiva:

De las 267 muestras con cultivo negativo ninguna fue positiva en la tinción de Gram a partir de los portaobjetos obtenidos por centrifugación, frente a 3 resultados positivos tras obtención del portaobjetos por citocentrifugación. Las características de estas muestras fueron muy diversas, tanto en procedencia (Oncología, Nefrología y UCI del CMQ), como en las sospechas diagnósticas (ascitis, diálisis peritoneal ambulatoria y cirrosis); en dos casos existía tratamiento antibiótico previo a la obtención de la muestra; si bien, en ningún caso el diagnóstico final orientó a un posible origen infeccioso del cuadro ni hubo resultados positivos en otras muestras (hemocultivos, otros líquidos peritoneales correspondientes al mismo episodio...).

IV.3. LÍQUIDOS ARTICULARES, SINOVIALES y PERIPROTÉSICOS.-**IV.3.1. TINCIÓN DE GRAM Y RESULTADO DEL CULTIVO.-****Centrifugación:**

		Resultado del cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción de Gram tras centrifugación	Positiva	5	2	7
	Negativa	21	195	216
	Total	26	197	223

La sensibilidad obtenida fue del 19,2% (IC 95% [2,1-36,3]), situándose la especificidad en el 98,9% ($\chi^2=25,066$ con un valor de $p<0,001$).

Citocentrifugación:

		Resultado del cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción de Gram tras citocentrifugación	Positiva	7	0	7
	Negativa	19	197	216
	Total	26	197	223

Su sensibilidad fue del 26,9% (IC 95% [7,9-45,9]), siendo la especificidad del 100% ($\chi^2=54,757$ con un valor de $p<0,001$).

Las sensibilidades obtenidas en la tinción de Gram fueron, en ambas técnicas, inferiores al 50% establecido por la literatura para artritis bacterianas no gonocócicas y no relacionadas con prótesis articulares (**Goldenberg 1998**). Este aspecto requiere una matización dado que nuestras muestras estuvieron formadas por líquidos articulares con gran diversidad de sospechas clínicas (como presentamos en el apéndice A.III.1 y A.III.2) y de forma predominante relacionados con prótesis articulares cuya sensibilidad se sitúa en el 26% (**Trampuz 2003**).

Comparación de las sensibilidades obtenidas:

	Resultado de la tinción de Gram		Total
	Positiva	Negativa	
Centrifugación	5	21	26
Citocentrifugación	7	19	26
Total	12	40	52

El valor de χ^2 fue de 0,433 con una $p=0,51$ no siendo las diferencias estadísticamente significativas.

Estudio de las discrepancias:

	Cultivo +	Cultivo -
Centrifugación + Citocentrifugación +	5	0
Centrifugación + Citocentrifugación -	0	2
Centrifugación - Citocentrifugación +	2	0
Centrifugación - Citocentrifugación -	19	195
Total	26	197

El análisis binomial de las discordancias, no mostró en ningún caso diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$).

Por tanto no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las sensibilidades obtenidas a partir de ambos métodos de concentración.

La especificidad alcanzada fue, independientemente del método empleado para la obtención del portaobjetos, superior al 98,9% ($p > 0,05$).

IV.3.2. TINCIÓN DE GRAM Y MICROORGANISMOS AISLADOS.-

Microorganismos	Nº aislados	Centrifugación	Citocentrifugación
BGN			
<i>P. aeruginosa</i>	2	0	0
<i>E. coli</i>	1	0	0
<i>A. lowffi</i>	1	0	1
Total	4	0	1
CGP			
<i>S. epidermidis</i>	12	0	0
<i>S. aureus</i>	4	3	3
<i>S. pyogenes</i>	1	0	1
<i>S. agalactiae</i>	2	1	1
Total	19	4	5
BGP			
<i>Propionibacterium spp</i>	2	0	0
Total	2	0	0
Cultivo mixto			
	1	1	1
TOTAL	26	5	7

Tabla IV.3.2. Detección de los aislamientos por la tinción de Gram según el método de concentración.

La sensibilidad de la tinción de Gram tras centrifugación de la muestra en el grupo de los CGP fue del 21% frente al 26,3% obtenido con la citocentrifugación. No hubo diferencias entre ambas técnicas en la detección de

microorganismos específicos, si bien sería conveniente aumentar el tamaño muestral para poder concluir en uno u otro sentido.

IV.3.3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DISCORDANTES.-

A) Líquidos articulares con cultivo positivo y tinción de Gram negativa:

De las 26 muestras con resultado positivo del cultivo, 21 de los portaobjetos obtenidos por centrifugación presentaron un resultado negativo en el análisis de la tinción de Gram que no se correspondió con el posterior resultado positivo del cultivo, circunstancia que sólo se produjo en 19 portaobjetos obtenidos por citocentrifugación de la muestra. Estos datos los presentamos en la tabla IV.3.3:

Nº de casos	Tinción de Gram		Aislamiento	Recuento	TTO	Sospecha diagnóstica	Recuperación
	CTC	CENT					
1	BGN	Negativo	<i>A. lowfii</i>	++	Desc	Prótesis	Medio enriquecimiento
2	CGP	Negativo	<i>S. pyogenes</i>	+++	Si	Bursitis	Cultivo directo
3	Negativo	Negativo	<i>E. coli</i>	+++	Si	Artritis	Cultivo directo
4	Negativo	Negativo	<i>P. aeruginosa</i>	++	Si	Prótesis	Medio enriquecimiento
5	Negativo	Negativo	<i>P. aeruginosa</i>	-	No	Fractura	Cultivo directo
6-7	Negativo	Negativo	<i>Propionibacterium spp</i>	+	Desc	Prótesis	Cultivo directo
8	Negativo	Negativo	<i>S. agalactiae</i>	+++	Si	Prótesis	Cultivo directo
9	Negativo	Negativo	<i>S. aureus</i>	-	Desc	Artritis	Cultivo directo
10-11	Negativo	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	-	No	Prótesis	Medio enriquecimiento
12	Negativo	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	-	No	Prótesis	Cultivo directo
13-14	Negativo	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	+	No	Prótesis	Cultivo directo
15	Negativo	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	++	Desc	Prótesis	Medio enriquecimiento
16	Negativo	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	++	Si	Prótesis	Cultivo directo
17-19	Negativo	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	+++	No	Prótesis	Medio enriquecimiento
20-21	Negativo	Negativo	<i>S. epidermidis</i>	+++	Si	Prótesis	Cultivo directo

Tabla IV.3.3. Distribución de los líquidos articulares con tinción de Gram negativa y cultivo positivo.

Recuento: recuento leucocitario; TTO: tratamiento; CTC: citocentrifugación; CENT: centrifugación; Desc: Desconocido.

S. epidermidis fue el microorganismo más aislado en cultivo con tinción de Gram negativa (63,1% en el grupo de muestras sometidas a citocentrifugación y 57,1% en las centrifugadas). La principal sospecha diagnóstica fue la existencia de una prótesis articular (89,4% en portaobjetos citocentrifugados y 80,9% en los centrifugados).

No se detectaron diferencias en función de la presencia o ausencia de antibióticos, ni en relación con la detección del microorganismo tras cultivo directo de la muestra o a partir del medio de enriquecimiento, ni con la mayor o menor purulencia de la misma.

B) Líquidos articulares con cultivo negativo y tinción de Gram positiva:

En ninguna de las 197 muestras con cultivo negativo, los portaobjetos obtenidos por citocentrifugación ofrecieron un resultado positivo en la tinción de Gram.

Sí se produjeron dos tinciones de Gram positivas en portaobjetos obtenidos por centrifugación en las que el resultado final del cultivo fue negativo. Las muestras procedieron de los servicios de Medicina Interna y Reumatología, ambos presentaron un recuento leucocitario superior a 25 leucocitos por campo, ninguna presentaba antibiótico previo a la obtención de la muestra, siendo los diagnósticos finales de los procesos artritis reumatoide y derrame articular.

IV.4. LÍQUIDOS PLEURALES.-**IV.4.1. TINCIÓN DE GRAM Y RESULTADO DEL CULTIVO.-****Centrifugación:**

		Resultado del cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción de Gram tras centrifugación	Positiva	6	4	10
	Negativa	18	231	249
	Total	24	235	259

La sensibilidad obtenida fue del 25% (IC 95% [5,6-44,4]), situándose la especificidad en el 98,3% ($\chi^2=31,843$ con un valor de $p<0,001$).

Citocentrifugación:

		Resultado del cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción de Gram tras citocentrifugación	Positiva	16	5	21
	Negativa	8	230	238
	Total	24	235	259

La sensibilidad en esta ocasión fue del 66,6% (IC 95% [45,7-87,6]), situándose la especificidad en el 97,9% ($\chi^2=121,738$ con un valor de $p<0,001$).

La sensibilidad de los portaobjetos obtenidos por citocentrifugación fue discretamente superior al 60% reflejado en la literatura (**LeMense 1995; Alfageme 1993**).

Comparación de las sensibilidades obtenidas:

	Resultado de la tinción de Gram		Total
	Positiva	Negativa	
Centrifugación	6	18	24
Citocentrifugación	16	8	24
Total	22	26	48

El valor de χ^2 fue de 8,392 con una $p=0,004$ siendo las diferencias estadísticamente significativas.

Estudio de las discrepancias:

	Cultivo +	Cultivo -
Centrifugación + Citocentrifugación +	6	1
Centrifugación + Citocentrifugación -	0	3
Centrifugación - Citocentrifugación +	10	4
Centrifugación - Citocentrifugación -	8	227
Total	24	235

El análisis binomial de las discrepancias entre los resultados de las tinciones presentados por ambos métodos de concentración en las muestras con cultivo positivo ofreció un valor de $p=0,001$, mientras que en las muestras con cultivo negativo fue de $p=0,5$.

Por tanto, podemos confirmar que las diferencias encontradas entre las sensibilidades obtenidas a partir de los portaobjetos sometidos a ambos métodos de concentración son estadísticamente significativas.

La especificidad alcanzada fue, independientemente del método de concentración, superior al 97,9% ($p > 0,05$).

IV.4.2. TINCIÓN DE GRAM Y MICROORGANISMOS AISLADOS.-

Los microorganismos aislados en los líquidos pleurales, como su detección mediante la tinción de Gram se encuentran reflejados en la tabla IV.4.2.

La sensibilidad de la tinción de Gram en el grupo de CGP fue del 33,3% tras centrifugación de la muestra, por un 88,8% cuando se obtuvo el portaobjetos por citocentrifugación.

Los BGN fueron detectados en el 14,2% de los casos precozmente centrifugación y sólo en el 71,4% con citocentrifugación.

El análisis binomial de los resultados sólo ofreció diferencias estadísticamente significativas en el grupo de los CGP ($p = 0,031$).

Microorganismos	Nº aislados	Centrifugación	Citocentrifugación
BGN			
<i>Enterobacteriaceae</i>	3	1	2
<i>P. aeruginosa</i>	2	0	1
Otros BGN*	2	0	2
Total	7	1	5
CGP			
<i>S. anginosus</i>	3	2	3
<i>S. aureus</i>	2	0	2
<i>S. pyogenes</i>	1	1	1
<i>S. pneumoniae</i>	1	0	1
SCN	1	0	1
<i>S. viridans</i>	1	0	0
Total	9	3	8
BGP			
<i>L. monocytogenes</i>	1	0	0
Total	1	0	0
HONGOS			
<i>Candida</i> spp	2	0	1
<i>Aspergillus</i> spp	1	0	0
Total	3	0	1
Cultivos mixtos	4	2	2
TOTAL	24	6	16

Tabla IV.4.2. Distribución de los microorganismos aislados y su detección mediante tinción de Gram. Otros BGN: *Bacteroides* spp, *Fusobacterium* spp
*SCN: Estafilococo coagulasa negativa.

IV.4.3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DISCORDANTES.-

A) Líquidos pleurales con cultivo positivo y tinción de Gram negativa:

De los 24 líquidos pleurales con cultivo positivo, sólo 8 portaobjetos obtenidos por citocentrifugación presentaron una tinción de Gram negativa, frente a los 18 portaobjetos obtenidos por centrifugación. Estos datos se presentan en la tabla IV.4.3.a.

Nº de casos	Tinción de Gram		Aislamiento	Recuento	TTO	Sospecha diagnóstica	Recuperación
	CTC	CENT					
1	BGN	Negativo	<i>P. aeruginosa</i>	++	Si	Empiema	Cultivo directo
2	BGN	Negativo	<i>P. mirabilis</i>	+++	Si	Empiema	Cultivo directo
3	BGN	Negativo	<i>Fusobacterium</i> spp	+++	Si	Insuficiencia respiratoria	Cultivo directo
4	BGN	Negativo	<i>Bacteroides</i> spp	+++	Si	Mediastinitis	Cultivo directo
5-6	CGP	Negativo	<i>S. aureus</i>	++	Si	Empiema	Cultivo directo
7	CGP	Negativo	<i>S. pneumoniae</i>	++	No	Neumotórax	Cultivo directo
8	CGP	Negativo	<i>S. anginosus</i>	+++	No	Derrame pleural	Cultivo directo
9	CGP	Negativo	Estafilococo coagulasa negativa	+++	Si	Derrame pleural	Medio enriquecimiento
10	Levaduras	Negativo	<i>C. parapsilosis</i>	++	Desc	No consta	Cultivo directo
11-12	Negativo	Negativo	Flora mixta	+++	Si	Empiema	Cultivo directo
13	Negativo	Negativo	<i>P. aeruginosa</i>	++	Si	Post-cirugía	Cultivo directo
14	Negativo	Negativo	<i>K. pneumoniae</i>	++	Desc	No consta	Cultivo directo
15	Negativo	Negativo	<i>S. viridans</i>	++	No	Derrame pleural	Cultivo directo
16	Negativo	Negativo	<i>L. monocytogenes</i>	+++	No	Derrame pleural	Cultivo directo
17	Negativo	Negativo	<i>Aspergillus</i> spp	+	No	Derrame pleural	Cultivo directo
18	Negativo	Negativo	<i>C. albicans</i>	+++	Desc	No consta	Cultivo directo

Tabla IV.4.3.a. Distribución de los líquidos pleurales con tinción de Gram negativa y cultivo positivo.

Recuento: recuento leucocitario; TTO: tratamiento; CTC: citocentrifugación; CENT: centrifugación; Desc: Desconocido.

No hubo un microorganismo que predominara por su no detección en la tinción de Gram obtenida por ambos métodos de concentración, pero sí destacar la falta de detección de los portaobjetos obtenidos por centrifugación de los aislamientos de *S. aureus* (n=2), *S. pneumoniae* (n=1) y *S. anginosus* (n=1) todos ellos detectados en los portaobjetos obtenidos por citocentrifugación.

La presencia de antibióticos predominó en las muestras procesadas por centrifugación (55,5%) mientras que en las procesadas por citocentrifugación la presencia o ausencia de antibióticos fue la misma en ambos casos (37,5%). Estas diferencias nos condujeron a analizar si la presencia o ausencia de antibióticos pudo modificar la sensibilidad de la tinción de Gram según el método de concentración empleado, datos que presentamos a continuación:

- **En presencia de antibióticos:**

Centrifugación:

		Resultado del cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción de Gram tras centrifugación	Positiva	3	5	8
	Negativa	11	111	122
	Total	14	116	130

La sensibilidad fue del 21,4% (IC 95% [0-46,5]), situándose la especificidad en el 95,7% ($\chi^2 = 6,339$ con un valor de $p=0,012$).

Citocentrifugación:

		Resultado del cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción de Gram tras citocentrifugación	Positiva	11	5	16
	Negativa	3	111	114
	Total	14	116	130

La sensibilidad obtenida fue del 78,5% (IC 95% [53,5-100]) y la especificidad del 95,7% ($\chi^2=63,83$ con un valor de $p<0,001$).

Comparación de las sensibilidades obtenidas:

	Resultado de la tinción de Gram		Total
	Positiva	Negativa	
Centrifugación	3	11	14
Citocentrifugación	11	3	14
Total	14	14	28

El valor de χ^2 fue de 7,538 con una $p=0,006$ siendo las diferencias estadísticamente significativas a favor de la citocentrifugación.

Estudio de las discrepancias:

	Cultivo +	Cultivo -
Centrifugación + Citocentrifugación +	4	1
Centrifugación + Citocentrifugación -	0	3
Centrifugación - Citocentrifugación +	7	4
Centrifugación - Citocentrifugación -	3	108
Total	14	116

El análisis binomial de las tinciones discordantes frente al grupo de muestras con cultivo positivo mostró un valor de $p=0,008$, frente al valor de $p=0,5$ para las muestras con cultivo negativo.

Por tanto, podemos confirmar que las diferencias encontradas entre las sensibilidades obtenidas a partir de los portaobjetos sometidos a ambos métodos de concentración en presencia de antibióticos son estadísticamente significativas.

La especificidad alcanzada fue, independientemente del método empleado para la obtención del portaobjetos, superior al 95,6% ($p>0,05$).

- **En ausencia de antibióticos:**

Centrifugación:

		Resultado del cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción de Gram tras citocentrifugación	Positiva	1	0	1
	Negativa	5	51	56
	Total	6	51	57

La sensibilidad se situó en el 16,7% (IC 95% [0-54,8]) con una especificidad del 100% ($\chi^2=8,652$ con un valor de $p=0,003$).

Citocentrifugación:

		Resultado del cultivo		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la tinción de Gram tras citocentrifugación	Positiva	3	0	3
	Negativa	3	51	54
	Total	6	51	57

El valor de la sensibilidad fue del 50% (IC 95% [1,6-98,3]), situándose la especificidad en el 100% ($\chi^2=26,917$ con un valor de $p<0,001$).

Comparación de las sensibilidades obtenidas:

	Resultado de la tinción de Gram		Total
	Positiva	Negativa	
Centrifugación	1	5	6
Citocentrifugación	3	3	6
Total	4	8	12

El valor de χ^2 fue de 1,5 con una $p=0,221$ no siendo las diferencias estadísticamente significativas en ausencia de antibióticos.

Estudio de las discrepancias:

	Cultivo +	Cultivo -
Centrifugación + Citocentrifugación +	1	0
Centrifugación + Citocentrifugación -	0	0
Centrifugación - Citocentrifugación +	2	0
Centrifugación - Citocentrifugación -	3	51
Total	6	51

En ambos grupos de muestras el valor de p obtenido por análisis binomial fue superior a 0,5.

La especificidad alcanzada fue del 100%, independientemente del método empleado para la obtención del portaobjetos, no siendo sus diferencias estadísticamente significativas.

Por tanto, podemos afirmar que la citocentrifugación ofrece mayor sensibilidad en la tinción de Gram de líquidos pleurales en presencia de

antibióticos respecto de los portaobjetos obtenidos por centrifugación, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

B) Líquidos pleurales con cultivo negativo y tinción de Gram positiva:

De las 235 muestras con cultivo negativo, sólo se produjeron 8 portaobjetos con tinción de Gram positiva, que reflejamos en la siguiente tabla (tabla IV.4.3.b):

Nº de caso	Tinción de Gram		Recuento	Tratamiento	Diagnóstico al alta
	CTC	CENT			
1	CGP	Negativo	++	Si	Derrame pleural
2	CGP	Negativo	+++	Si	Derrame pleural
3	CGP	Negativo	+++	Si	IRA
4	BGN	Negativo	+++	Si	Tuberculosis
5	Negativo	CGP	+	Si	Derrame pleural
6	Negativo	BGN	+	Si	Pleuritis posquirúrgica
7	Negativo	CGP	+++	Si	Traumatismo
8	CGP	CGP	++	Si	Empiema

Tabla IV.4.3.b. Resultados positivos de la tinción de Gram en líquidos pleurales con resultado negativo del cultivo.

Recuento: recuento leucocitario; CTC: citocentrífuga; CENT: centrifuga; IRA: insuficiencia respiratoria aguda

Ninguna de las muestras presentó cultivos de líquido pleural o hemocultivos simultáneos positivos.

Sólo en una muestra se produjo concordancia entre el resultado de la tinción de Gram de ambos portaobjetos y el diagnóstico final del paciente (empiema), siendo el resto de los casos falsos positivos de la tinción de Gram.

IV.5. ASPECTOS CUALITATIVOS DE LA CITOCENTRIFUGACIÓN.-

Durante el estudio realizado pudimos comprobar una serie de aspectos no cuantificables que reforzaron aún más los resultados previos. Nos referimos a la mejor calidad de las extensiones obtenidas por citocentrifugación frente a las obtenidas por centrifugación de la muestra. A continuación presentamos unas imágenes representativas de estas diferencias:



Ilustración 1. Portaobjetos de LCR obtenido por centrifugación de la muestra (10x)

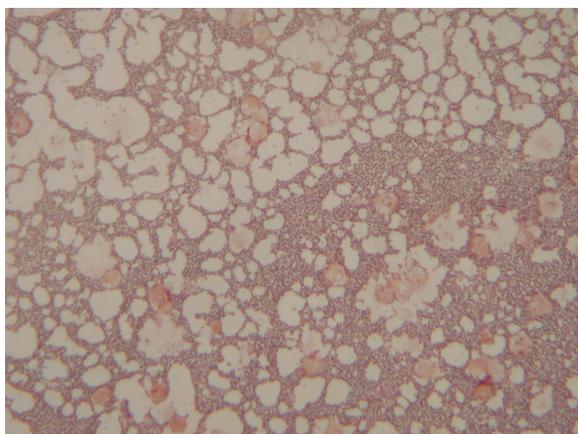


Ilustración 2. Portaobjetos de LCR obtenido por citocentrifugación de la muestra (10x)

En estas primeras imágenes podemos comprobar la mayor claridad del portaobjetos obtenido por citocentrifugación de la muestra, gracias a la absorción del sobrenadante por parte del filtro presente en el citocontenedor.

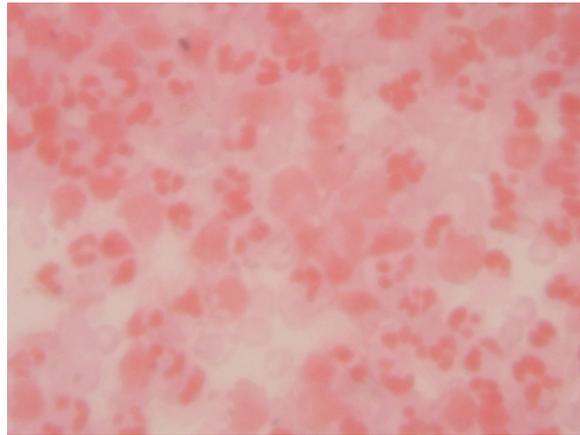


Ilustración 3. Portaobjetos de LCR obtenido tras citocentrifugación de la muestra (40x)

Con esta imagen queremos reseñar la facilidad para la identificación de los leucocitos polimorfonucleares a 40 aumentos.

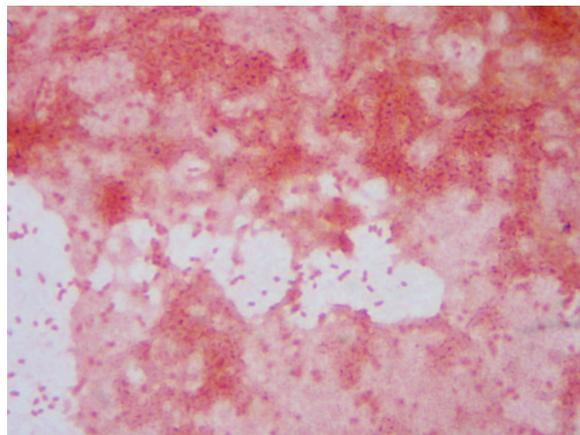


Ilustración 4. Portaobjetos obtenido de LCR tras centrifugación de la muestra (100x)

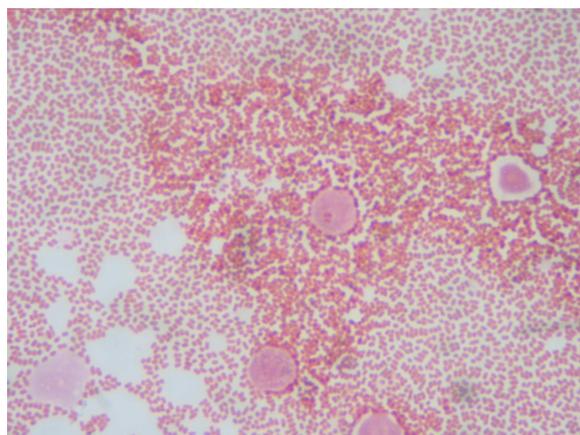


Ilustración 5. Portaobjetos de LCR obtenido tras citocentrifugación de la muestra (100x)

En las ilustraciones 4 y 5 presentamos las diferencias encontradas al examinar una misma muestra a 100 aumentos de LCR a partir de portaobjetos

obtenidos por ambos métodos de concentración de forma simultánea. Se aprecia la mayor concentración de microorganismos en la ilustración 5 correspondiente al portaobjetos obtenido por citocentrifugación, así como la menor presencia de sobrenadante.

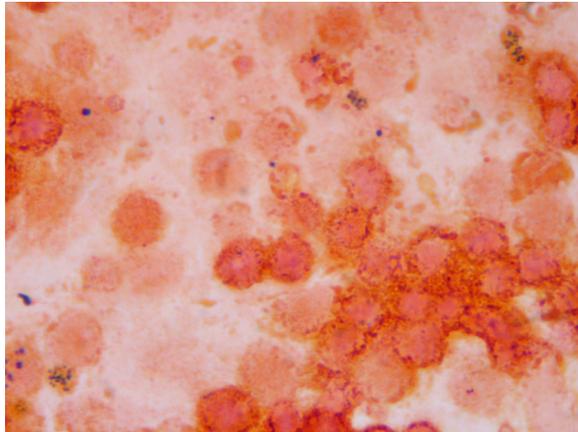


Ilustración 6. Portaobjetos de muestra peritoneal obtenido por centrifugación (100x)

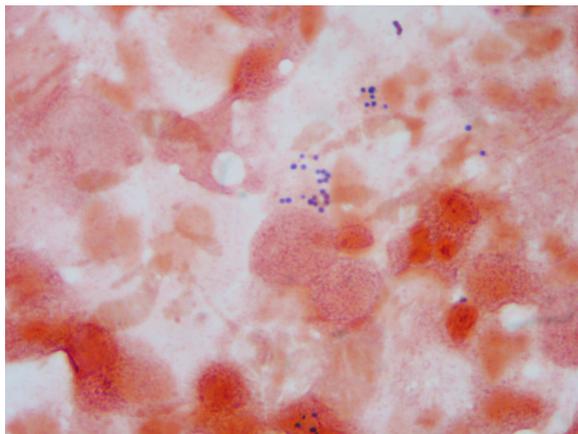


Ilustración 7. Portaobjetos de muestra peritoneal obtenido por citocentrifugación (100x)

En las dos imágenes precedentes se observa la diferente morfología celular obtenida tras someter a la muestra a ambos métodos de concentración, así como la mayor facilidad en la identificación del microorganismo.

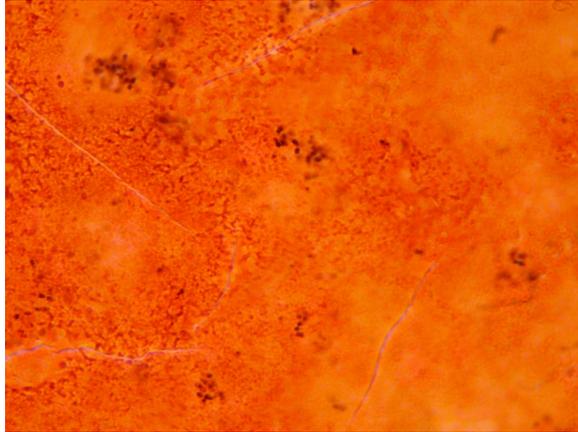


Ilustración 8. Portaobjeto de muestra pleural obtenido por centrifugación (100x)

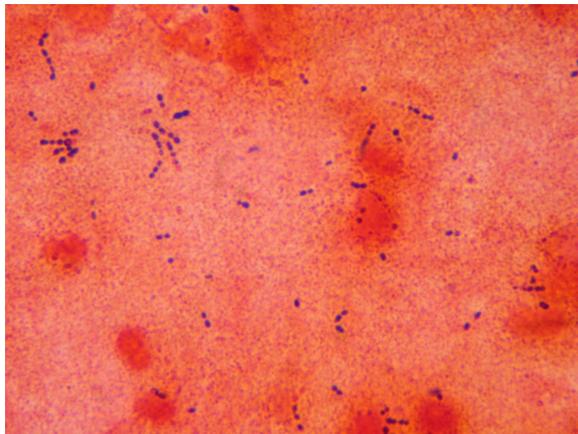


Ilustración 9 Portaobjeto de muestra pleural obtenido por citocentrifugación (100x)

En las muestras de líquido pleural la diferenciación celular sigue siendo mejor en los portaobjetos obtenidos por citocentrifugación, si bien la elevada densidad del sobrenadante impide que sea tan clara como en el caso del LCR. Ello no impide la mejor detección de los microorganismos en la muestra estudiada tal como se presenta en estas ilustraciones.

Con estas ilustraciones sólo pretendemos reflejar la mejoría cualitativa que se produce con la citocentrifugación en el estudio de la tinción de Gram en líquidos estériles frente a los portaobjetos obtenidos por centrifugación.

CONCLUSIONES

1. La tinción de Gram, independientemente del método de concentración empleado en la obtención del portaobjetos, persiste como un método sencillo, rápido y fiable, respecto al cultivo, en la detección precoz de microorganismos en líquidos estériles;
2. La citocentrifugación aplicada en muestras de líquidos estériles (cefalorraquídeo, pleural y peritoneal) previo a la realización de la tinción de Gram, presenta una mayor sensibilidad en la detección precoz de los microorganismos respecto a las muestras procesadas por centrifugación, siendo estas diferencias estadísticamente significativas;
3. La citocentrifugación ofrece una mayor sensibilidad en la detección de todos los grupos de microorganismos independientemente del líquido estéril estudiado, si bien las diferencias sólo son estadísticamente significativas en los aislamientos de cocos Gram positivos de muestras de líquidos cefalorraquídeos y pleurales y en los aislamientos de bacilos Gram negativos de líquidos cefalorraquídeos y peritoneales;
4. La citocentrifugación aporta mayor sensibilidad en el estudio de líquidos cefalorraquídeos y pleurales en presencia de antibióticos que la centrifugación, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

APÉNDICE I

A.I. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-MICROBIOLÓGICAS DE LAS MUESTRAS ESTUDIADAS.-

Las muestras recibidas durante el periodo de estudio presentaron la siguiente distribución:

Tipo de muestra	Total	Muestras válidas (%)¹	Cultivo + (%)²
Líquido cefalorraquídeo	1466	1340 (91,4)	190 (14,1)
Líquido peritoneal	438	320 (73)	53 (16,6)
Líquido pleural	304	259 (85,1)	24 (9,2)
Líquido articular	303	223 (73,6)	26 (11,6)
Total	2511	2142 (85,3)	292 (13,6)

Tabla A.I. Distribución de las muestras recibidas.

(%)¹ Porcentaje de muestras válidas para el estudio respecto a las muestras recibidas.

(%)² Porcentaje de muestras positivas por número de muestras válidas para el estudio.

A.I.1. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.-

El principal criterio de exclusión en los LCR fue la no constatación del método de concentración (citocentrifugación o centrifugación) empleado para la obtención del portaobjetos y su posterior tinción de Gram; también se excluyeron las muestras cuando el volumen de líquido recibido fue muy escaso (generalmente menos de 0,5 mL) procediéndose a la obtención del portaobjetos para la tinción de Gram y la siembra directa sin centrifugación de la muestra.

En el resto de líquidos estériles el principal criterio de exclusión fue la no obtención de los portaobjetos necesarios para el estudio comparativo de ambos métodos de concentración, debido principalmente a las características de la muestra: material demasiado purulento (drenajes, abscesos, seromas, quistes)

o sanguinolento (coágulos). En estos casos no se procesó la muestra por citocentrifugación, pues el botón de muestra resultante en el portaobjetos impedía su correcto estudio microscópico.

También fueron excluidas las muestras cuyo resultado fue interpretado como posible contaminación (*Corynebacterium* spp, estafilococos coagulasa negativa, *Bacillus* spp, *Alcaligenes* spp,...), en ausencia de leucocitos en la tinción de Gram y que tras comunicación con el médico peticionario fueron considerados como tales. Además en los líquidos estériles diferentes LCR, se excluyeron aquellas muestras en las que se rescató a partir del frasco de hemocultivo un microorganismo potencialmente contaminante con cultivo directo de la muestra negativo.

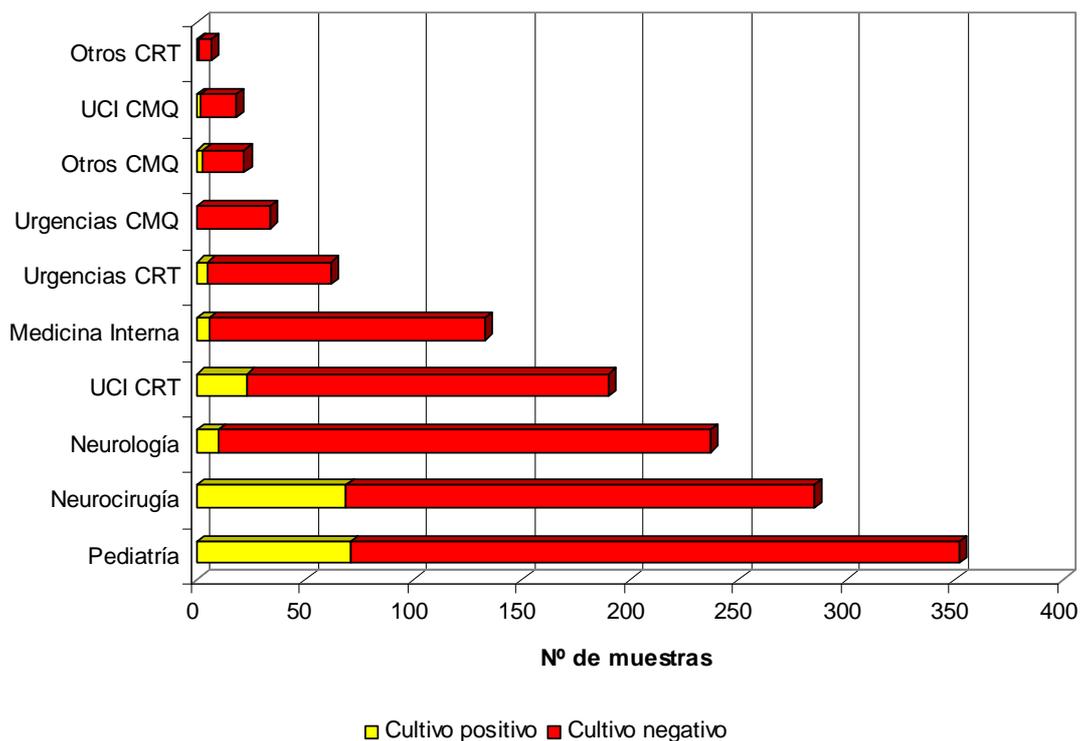
No se excluyeron las muestras con cultivo positivo para hongos dado que el procesamiento de las mismas en cuanto a diagnóstico (tinción de Gram, cultivo y lectura de las placas) son similares a las empleadas para las bacterias.

Dada la diferente naturaleza de las muestras su estudio se realizó de manera independiente.

A.II. LÍQUIDOS CEFALORRAQUÍDEOS.-

A.II.1. Distribución de las muestras por Servicio de procedencia.

La distribución según el servicio de procedencia y el resultado del cultivo se refleja en la siguiente gráfica (A.II.1):



Gráfica A.II.1. Distribución de los LCR por servicio de procedencia y resultado del cultivo
UCI: Unidad de Cuidados Intensivos. **CRT:** Complejo de Rehabilitación y Traumatología; **CMQ:** Complejo Médico Quirúrgico. **Otros CMQ:** Oncología, Nefrología, Digestivo, Neumología, Cardiología. **Otros CRT:** Rehabilitación, Traumatología.

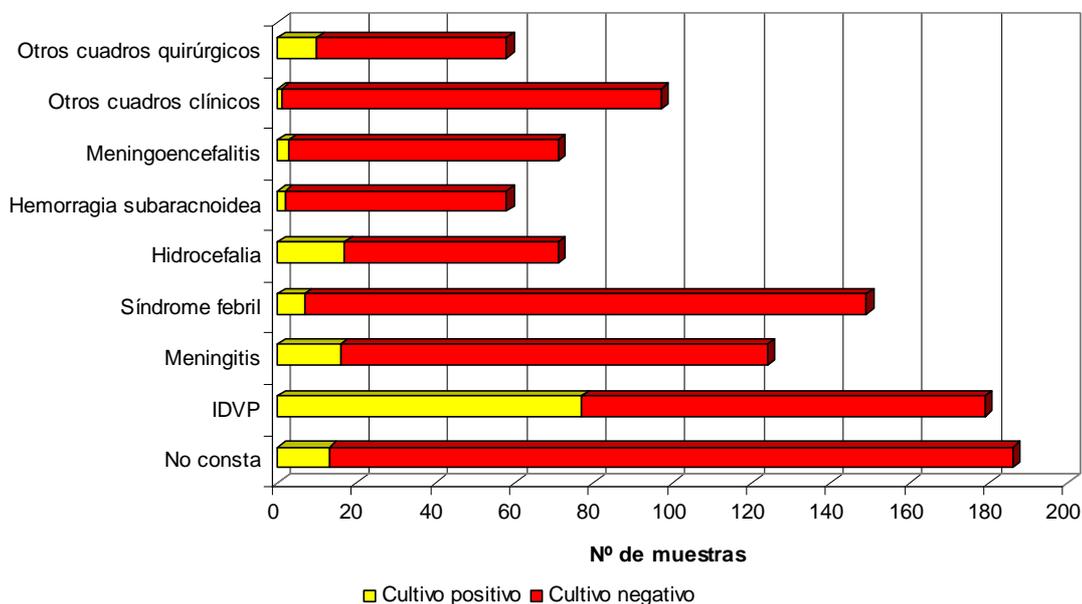
Pediatría fue el principal servicio solicitante de estudio de LCR (26,3%), seguido por Neurocirugía (21,3%) y Neurología (17,7%).

El 14,1% de los LCR tuvieron un resultado positivo en el cultivo (n=190). Al estudiar la distribución de estos cultivos por el total de muestras remitidas por cada servicio, el mayor porcentaje de cultivos positivos correspondió al servicio de Neurocirugía (31,9%), seguido por Pediatría (25,3%) y la UCI del CRT (13,7%) debido a que atiende a los pacientes neuroquirúrgicos hasta su estabilización para su ingreso en planta.

A.II.2. Distribución de las muestras por sospecha diagnóstica.

Para conocer la relación entre las sospechas, síntomas o signos clínicos que motivaron el estudio y el resultado del cultivo, registramos dichos datos

desde enero de 2004 hasta abril de 2006 y que presentamos a continuación en la gráfica A.II.2:



Gráfica A.II.2. Distribución de las muestras por sospecha, signo o síntoma clínico y resultado del cultivo. IDVP: infección drenaje ventrículo peritoneal.

Otros cuadros clínicos: convulsión, Sd. confusional, sepsis, cefalea, tetraplejía, Guillain-Barre...

Otros cuadros quirúrgicos: hipertensión intracraneal, fístula LCR, hematoma...

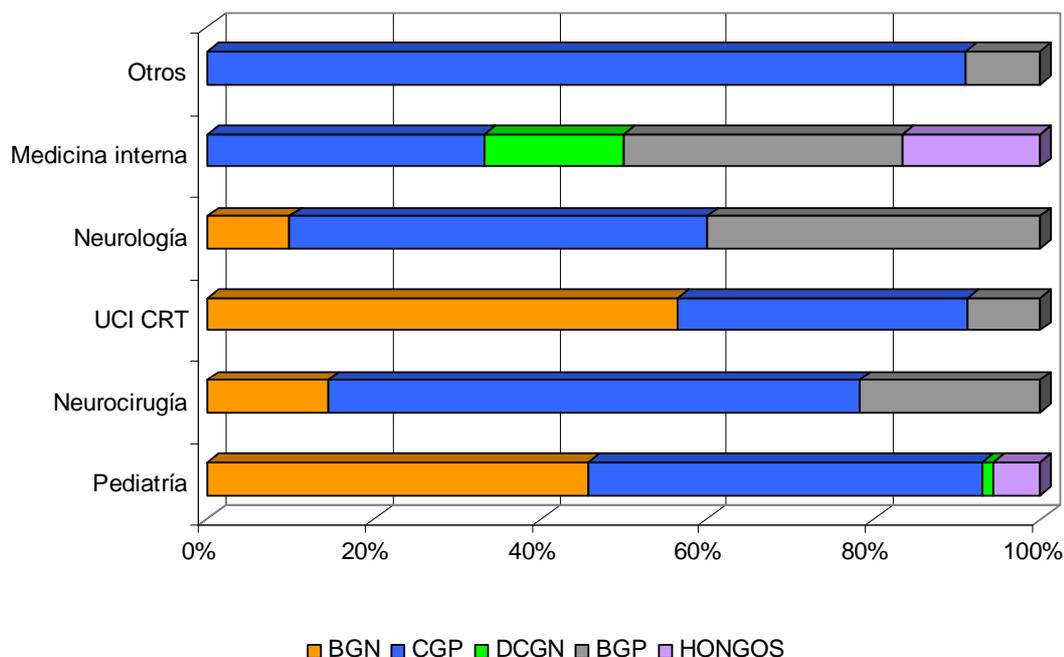
El principal motivo para la obtención del LCR fue la sospecha clínica de infección del sistema de drenaje ventrículo peritoneal (IDVP) (18%), seguido del síndrome febril (15%) y la sospecha clínica de meningitis (12,5%). Los siguientes procesos estuvieron relacionados con la probable presencia de sistemas de drenaje ventriculares como son la hidrocefalia (7,1%) y la hemorragia subaracnoidea (5,8%).

El mayor porcentaje de cultivos positivos correspondió a la sospecha clínica de IDVP (43%), seguido de otros cuadros con posible antecedente de intervención neuroquirúrgica (15,5%) y la sospecha clínica de meningitis (12,9%), datos que reflejan el aumento de las meningitis secundarias a estas intervenciones (**Wang 2004**).

En el 18,7% de las muestras recibidas no constaba el síntoma, signo o sospecha clínica que motivó el estudio, a pesar de la relación etiológica microorganismo-factor predisponente (Thomson 2003; Tunkel³ 2005).

A.II.3. Relación Servicio de procedencia y microorganismos aislados.

Con el fin de establecer los agentes etiológicos más habituales de las meningitis bacterianas en cada uno de los servicios de nuestro hospital, estudiamos los diferentes aislamientos por grupo de microorganismos (gráfica A.II.3).



Gráfica A.II.3. Distribución de los microorganismos por servicio de procedencia de la muestra.
BGN: bacilos Gram negativos; CGP: cocos Gram positivos; BGP: bacilos Gram positivos; DCGN: diplococos Gram negativos.
UCI CRT: Unidad Cuidados Intensivos del Complejo de Rehabilitación y Traumatología
Otros: Urgencias CRT, Oncología...

En las 190 muestras con cultivo positivo, se produjeron un total de 191 aislamientos (se obtuvo un cultivo mixto con desarrollo de *E. aerogenes* y *E. faecalis*), con la siguiente distribución: 103 cocos Gram positivos (53,9%), 57

bacilos Gram negativos (29,8%), 24 bacilos Gram positivos (12,6%), 5 hongos (2,6%) y 2 diplococos Gram negativos (1,1%).

S. epidermidis fue el microorganismo aislado más frecuentemente (28,8%), y el principal agente etiológico de las infecciones bacterianas del LCR en los servicios de Neurocirugía y Pediatría (39,1% y 26,4% respectivamente sobre los cultivos positivos de cada servicio). El segundo microorganismo más aislado fue *E. cloacae* (9,4%), con predominio en pacientes pediátricos (18%).

El tercer microorganismo recuperado con mayor frecuencia fue *P. acnes* (7,8%), de presentación exclusiva en muestras del servicio de Neurocirugía, dónde fue el segundo microorganismo más aislado (21,7%). La ausencia de aislamientos en pacientes del servicio de Pediatría con sistema de drenaje ventriculares fue debida a que nuestro protocolo de trabajo no incluyó la siembra de una placa de AS en condiciones de anaerobiosis.

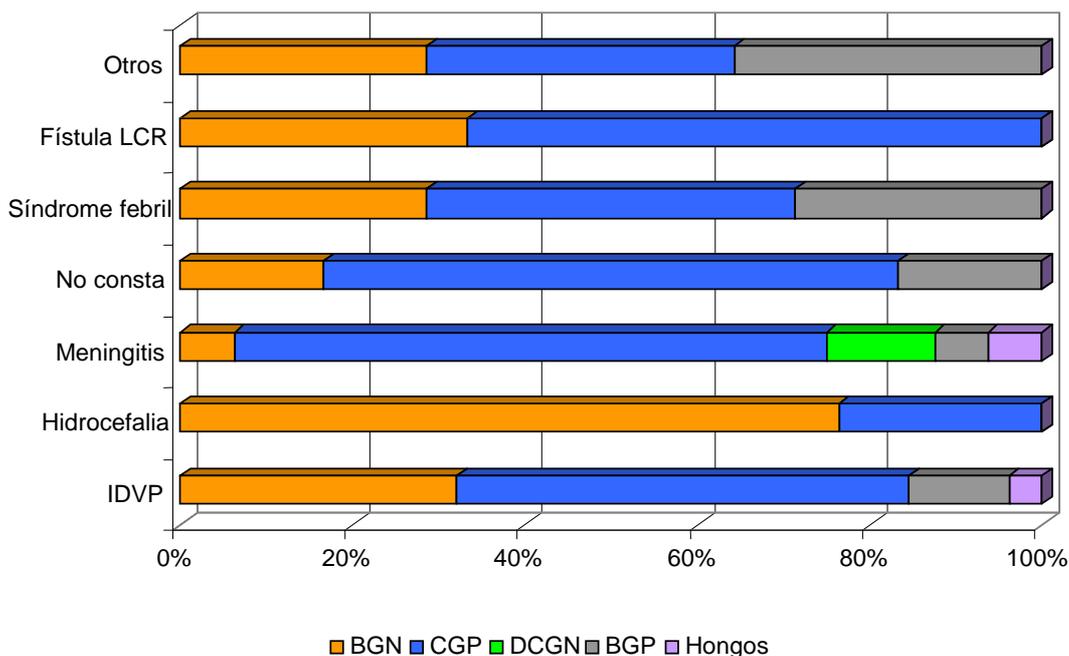
Atendiendo al trabajo de Brook y colaboradores, y a nuestros resultados, deberíamos considerar la siembra de una placa de AS en anaerobiosis en LCR de pacientes cuya sospecha diagnóstica oriente hacia intervenciones neuroquirúrgicas (hidrocefalia, IDVP...) **(Brook I 2002)**.

S. pneumoniae y *S. haemolyticus*, con 13 aislamientos cada uno, fueron los siguientes microorganismos aislados con mayor frecuencia.

Destacar los aislamientos de *P. aeruginosa* y *E. coli* en muestras del servicio de Pediatría (12,5% y 11,1% respectivamente sobre el total de cultivos positivos); el 80% de los aislamientos de *S. aureus* obtenidos a partir de pacientes neuroquirúrgicos y el 90% de los aislamientos de *A. baumannii* en muestras procedentes de la UCI del CRT, resaltando su papel como patógeno hospitalario **(Wang 2004)**.

A.II.4. Relación entre sospecha diagnóstica y microorganismos aislados.

Para conocer la relación entre los microorganismos aislados y la sospecha diagnóstica registrada en el volante de microbiología, se estudiaron las muestras recibidas a partir del año 2004:



Gráfica A.II.4. Distribución de los aislamientos obtenidos por sospecha diagnóstica desde enero de 2004 hasta abril de 2006.

BGN: bacilos Gram negativos; **CGP:** cocos Gram positivos; **DCGN:** diplococos Gram negativos; **BGP:** bacilos Gram positivos. **IDVP:** infección drenaje ventrículo-peritoneal. **Otros:** encefalitis, hematoma, hemorragia subaracnoidea, síndrome confusional...

El 53,1% de los aislamientos estuvieron relacionados con IDVP, siendo los CGP el grupo de microorganismos predominante (52,6%), seguidos de BGN (32,1%) y en menor proporción BGP (11,5%) y hongos (3,8%).

El principal agente etiológico de las IDVP fue *S. epidermidis* (37,2%), seguido de *E. cloacae* (14,1%) y de *P. aeruginosa* (12,8%) en consonancia con lo reflejado en la literatura (Tunkel² 2005; Wang 2004; Thomson 2003; Kralinsky 2000; Mayhall 1984).

P. acnes se aisló exclusivamente de pacientes con sospecha de IDVP del servicio de Neurocirugía acorde con el incremento de su prevalencia recogido en la literatura **(Kaufman 2005)**.

La hidrocefalia constituyó el segundo proceso clínico con mayor número de cultivos positivos (11,6%) con la siguiente distribución: BGN 76,5% y CGP 23,5%. El principal microorganismo aislado fue *E. cloacae* (35,3%), seguido de *E. coli* (29,4%) y *S. epidermidis* (23,5%).

El 12,9% de las muestras con sospecha clínica de meningitis (n=124) tuvieron un resultado positivo en el cultivo, con la siguiente distribución por grupo de microorganismos: CGP 73,3%, DCGN 13,3%, finalmente hongos y BGP 6,7% cada uno de ellos.

El principal agente etiológico de las sospechas clínicas de meningitis fue *S. pneumoniae* (50%), seguido de *N. meningitidis* (12,5%), datos coincidentes con los presentados en la actualidad, donde *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *L. monocytogenes* son los principales agentes etiológicos de las meningitis bacterianas agudas adquiridas en la comunidad **(Tunkel³ 2005; Schuchat 1997)**.

L. monocytogenes se aisló de muestras con una gran diversidad de síntomas, signos o síndromes clínicos (meningitis, encefalitis, síndrome febril, síndrome confusional o síndrome meníngeo), si englobásemos estos aislamientos sería el segundo microorganismo más frecuente en nuestra área responsable de cuadros meníngeos agudos adquiridos en la comunidad.

La escasez de aislamientos de *N. meningitidis* a partir de LCR (n=2), no es reflejo de los episodios meníngeos agudos por dicho microorganismo. De hecho, *N. meningitidis* fue detectada en otras 6 ocasiones mediante tinción de Gram sin obtener crecimiento en el cultivo directo del LCR, circunstancia explicada por Kanegaye y colaboradores que sugieren la completa esterilización de este a las dos horas del inicio de terapia antibiótica parenteral

en el caso de meningitis meningocócicas (**Kanegaye 2001**). De hecho en una revisión de los aislamientos obtenidos de *N. meningitidis* en nuestro laboratorio entre los años 2000 a 2005, de los 48 pacientes con aislamientos positivos, el 43,7% se obtuvieron a partir de hemocultivos, un 16,6% simultáneamente en hemocultivo y cultivo del LCR y sólo un 8,3% a partir de LCR. Matizar que este trabajo analizó todos los aislamientos, independientemente de la sospecha clínica, y por tanto no podemos afirmar que correspondiesen a meningitis bacterianas (**Pedrosa 2006**), pero ayuda a comprender la dificultad de aislar al microorganismo a partir del LCR y la necesidad de obtener hemocultivos en todos los cuadros con sospecha de meningitis bacteriana aguda (**Tunkel 2004**).

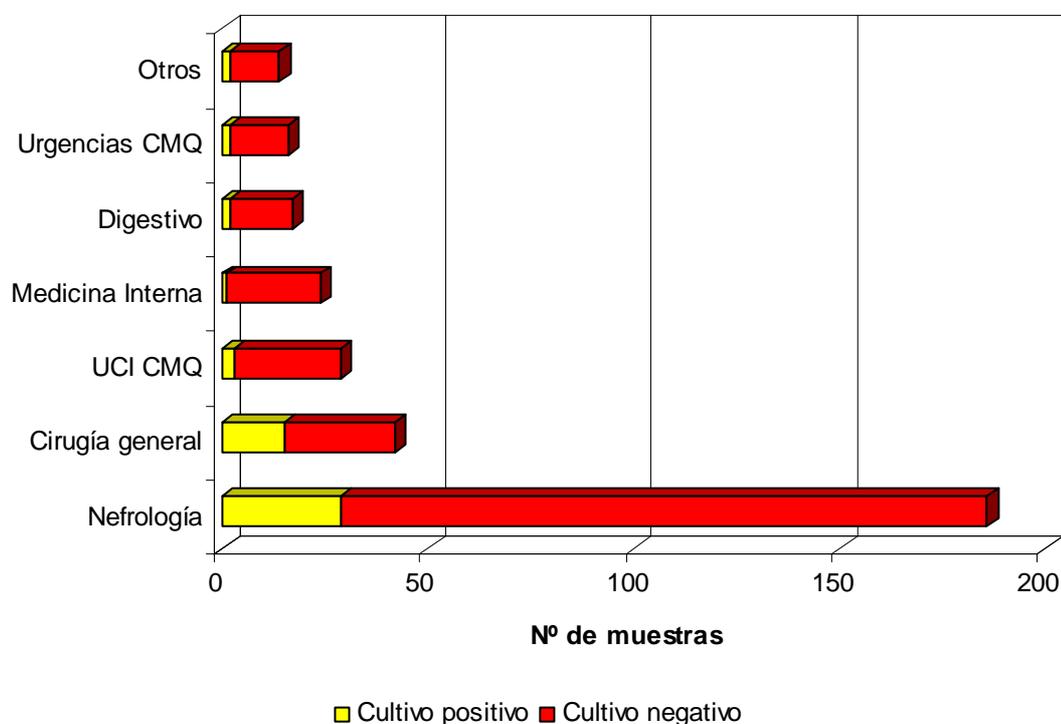
Reseñar que uno de los aislamientos de *N. meningitidis* correspondió al serogrupo W-135, comúnmente relacionado con pacientes pediátricos y especialmente en peregrinaciones a la Meca (circunstancia no presente en nuestro paciente), poniendo de manifiesto el incremento de prevalencia de serogrupos poco habituales no incluidos en el calendario vacunal (**Reina 2005**).

C. neoformans se aisló de un paciente con sospecha clínica de meningitis; mientras que los aislamientos de levaduras (*C. tropicalis*) se produjo bajo la sospecha de IDVP.

En resumen, existe un notable aumento de meningitis bacterianas agudas relacionadas con la presencia de sistemas de drenaje ventrículo peritoneales (IDVP, hidrocefalia, hemorragia subaracnoidea...) y de microorganismos relacionados específicamente con estos dispositivos respecto a la meningitis bacteriana aguda de la comunidad; de ahí la importancia de constatar la sospecha clínica en el volante peticionario para orientar su estudio microbiológico.

A.III. LÍQUIDOS ASCÍTICOS y/o PERITONEALES.-

A.III.1. Distribución de las muestras por Servicio de procedencia.

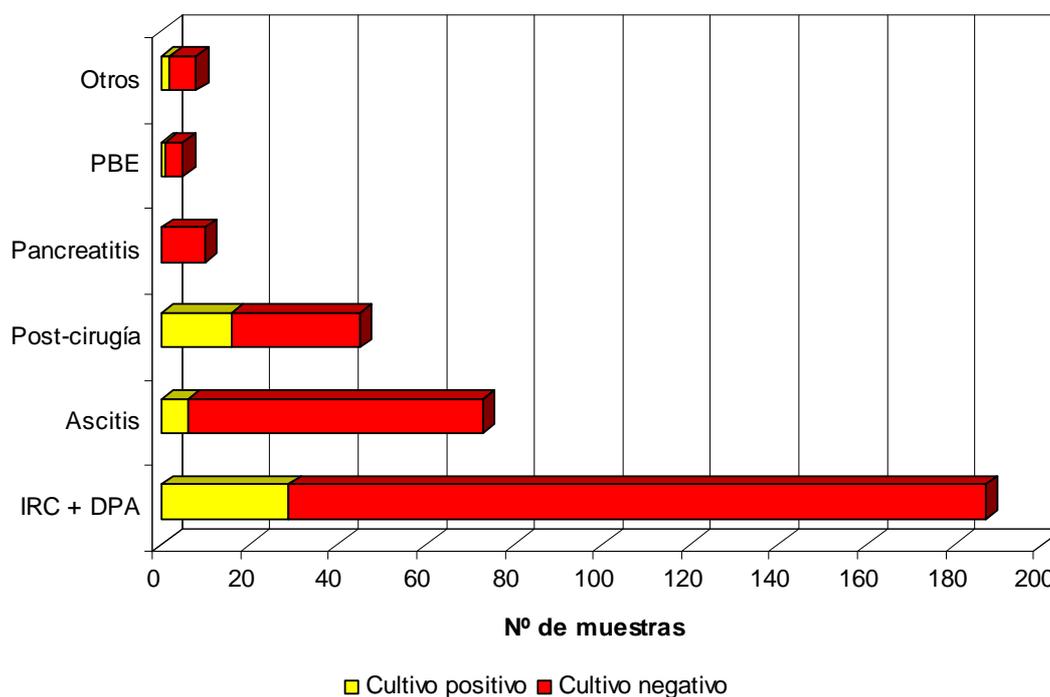


Gráfica A.III.1. Distribución de las muestras por servicio de procedencia y resultado del cultivo.
 UCI CMQ: Unidad de Cuidados Intensivos Complejo Médico Quirúrgico. Otros: Oncología, Hematología, Pediatría...

Por orden de frecuencia el mayor número de muestras procedió de Nefrología (56,7%), seguido de Cirugía general (12,8%) y la UCI del CMQ (8,8%).

Por total de cultivos positivos, el mayor porcentaje correspondió a Nefrología (53,7%); sin embargo, por muestras remitidas la mayor positividad perteneció a Cirugía general (35,7%), seguida de Nefrología (15,6%).

A.III.2. Distribución de las muestras por sospecha diagnóstica.

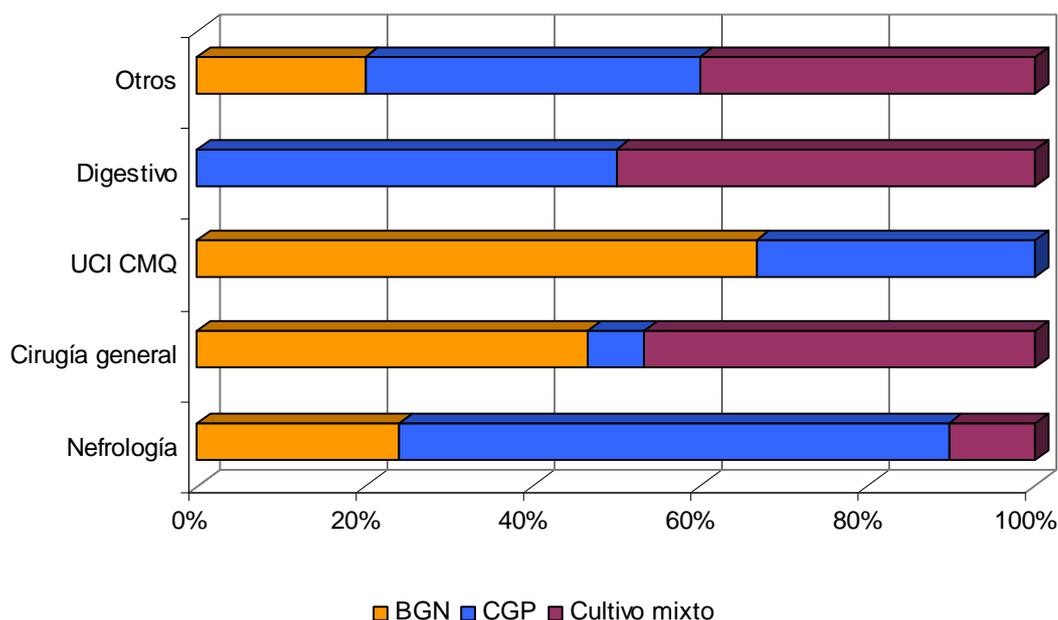


Gráfica A.III.2. Sospecha diagnóstica y resultado del cultivo.

***IRC+DPA: insuficiencia renal crónica en diálisis peritoneal ambulatoria. PBE: peritonitis bacteriana espontánea. Otros: síndrome febril, shock...**

La principal sospecha diagnóstica motivo del estudio fue la insuficiencia renal crónica en pacientes sometidos a diálisis peritoneal ambulatoria (IRC+DPA) (57%), seguido de la sospecha de ascitis (22,2%) y los obtenidos tras cirugía abdominal (13,7%). El mayor porcentaje de cultivos positivos por sospecha diagnóstica correspondió a las muestras de pacientes posquirúrgicos (35,5%), seguido de la ascitis (25%) y la IRC+DPA (15,5%).

A.III.3. Relación Servicio de procedencia y microorganismos aislados.



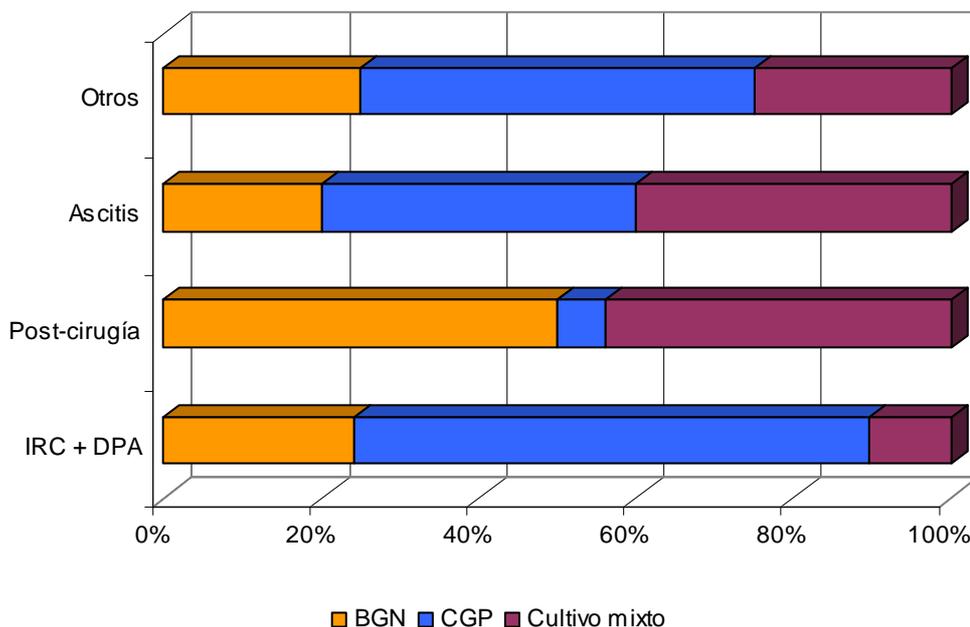
Gráfica A.III.3. Relación microorganismo aislado y servicio de procedencia de la muestra.

Los CGP se aislaron en el 65,5% de los pacientes de Nefrología con cultivo positivo, datos coincidentes con la literatura, dónde se destaca el papel de estos microorganismos como principales agentes etiológicos de las infecciones de líquidos peritoneales en pacientes sometidos a DPA (**Zelenitsky 2000; West 1986; Rubin 1980; Sewell 1982**).

Los BGN son los segundos agentes etiológicos en frecuencia de las muestras procedentes de Nefrología (24,1%), predominando *E. coli* (42,8%), y en menor frecuencia *Klebsiella* spp (28,6%) (**Zelenitsky 2000; Graus 1983; Arfania 1981; Vas 1983**).

BGN y cultivos mixtos fueron los principales aislamientos obtenidos en pacientes quirúrgicos (46,6% en cada caso).

A.III.4. Relación entre sospecha diagnóstica y microorganismos aislados.



Gráfica A.III.4. Relación entre sospecha diagnóstica y microorganismo aislado.
IRC+DPA: Insuficiencia renal crónica en diálisis peritoneal ambulatoria. Otros: inmunodeprimido.

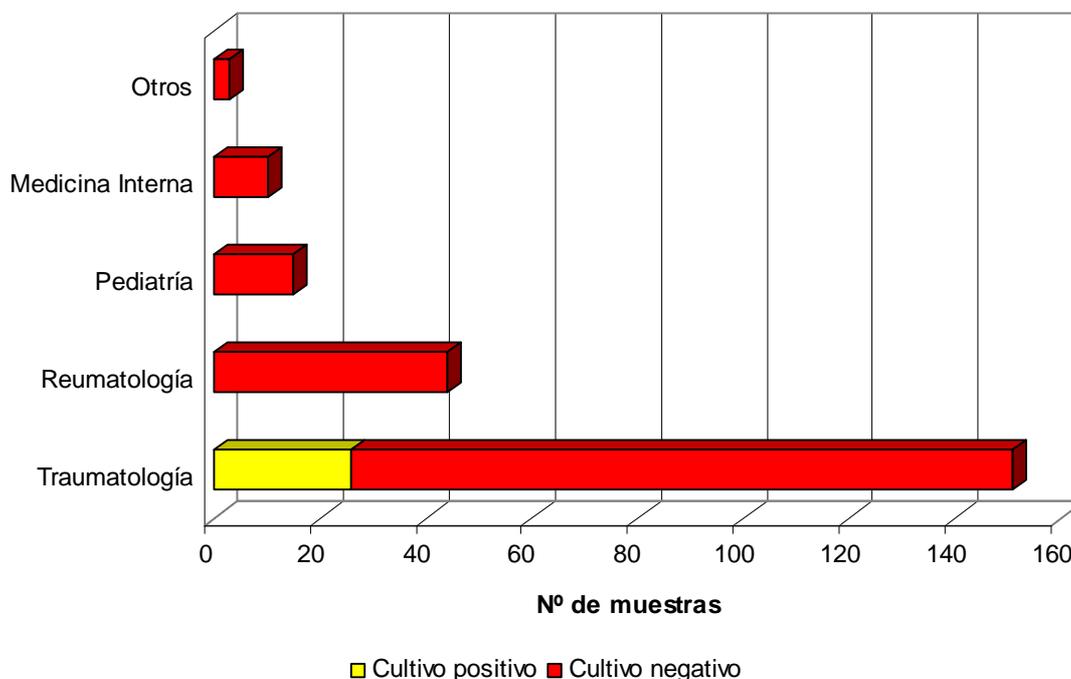
La principal etiología de peritonitis en pacientes sometidos a DPA fueron los CGP (65,5%), siendo *S. epidermidis* el responsable del 31,6% de estos aislamientos, seguido por *S. aureus* (26,3%) en consonancia con lo descrito en la literatura (Zelenitsky 2000; West 1986; Rubin 1980; Sewell 1982).

Las etiologías de peritonitis secundarias concordaron con la literatura, así el 50% de los BGN y 43,7% de las floras mixtas fueron las principales etiologías de los pacientes adscritos al servicio de Cirugía general. Destacar *E. coli* responsable del 71,4% de los aislamientos, seguido de *E. faecium* y *Bacteroides* spp (Levison 2005; Mowat 2001; Nathens 1998).

Por el contrario, el 29,4% de los aislamientos de BGN se relacionaron con peritonitis secundarias, frente al 11,7% de pacientes sometidos a DPA, destacando la mayor frecuencia de *E. coli* similar a los datos presentados en la literatura (Zelenitsky 2000).

A.IV. LÍQUIDOS ARTICULARES, SINOVIALES y PERIPROTÉSICOS.-

A.IV.1. Distribución de las muestras por Servicio de procedencia.

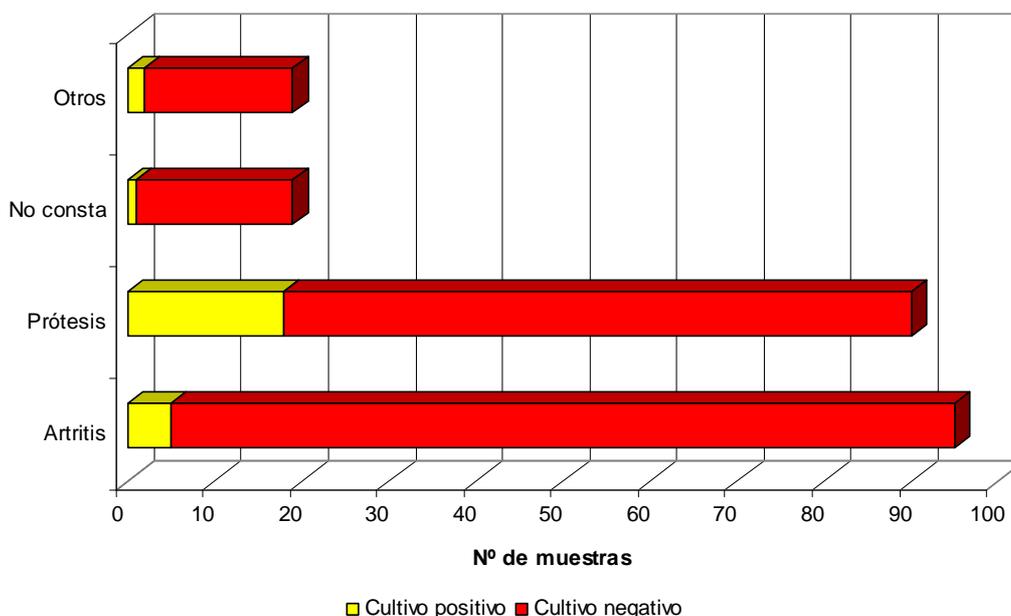


Gráfica A.IV.1. Distribución las muestras por servicio y resultado del cultivo.

El servicio de Traumatología con un 67,7% de las muestras recibidas fue el principal demandante de estudio microbiológico, seguido por Reumatología (19,3%) y Pediatría (6,7%), si bien sólo se obtuvieron resultados positivos en el cultivo de las muestras procedentes del servicio de Traumatología.

A.IV.2. Distribución de las muestras por sospecha diagnóstica.

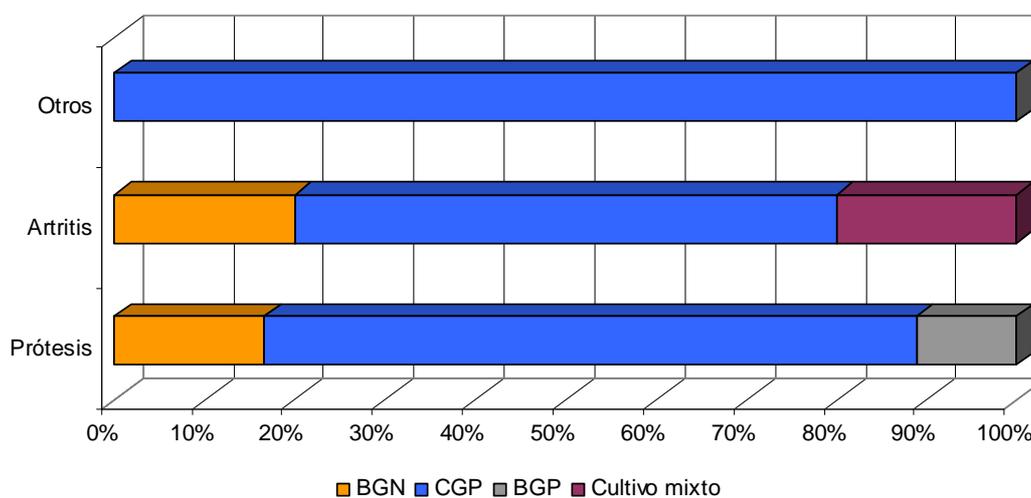
La sospecha clínica de artritis fue el principal motivo para estudio bacteriano de los líquidos articulares (42,6%), seguido de la presencia de una prótesis articular (40,4%). En el 8,5% de los casos no pudimos constatar la sospecha clínica (Gráfica III.5.3.2).



Gráfica A.IV.2. Sospecha diagnóstica motivo del estudio de la muestra.
Otros: sinovitis, hemartros, artritis reumatoide, bursitis, fractura, síndrome febril...

El mayor porcentaje de cultivos positivos se obtuvo en muestras relacionadas prótesis articulares (20%), seguida de la sospecha clínica de artritis (5,3%).

A.IV.3. Relación Servicio de procedencia y microorganismos aislados.



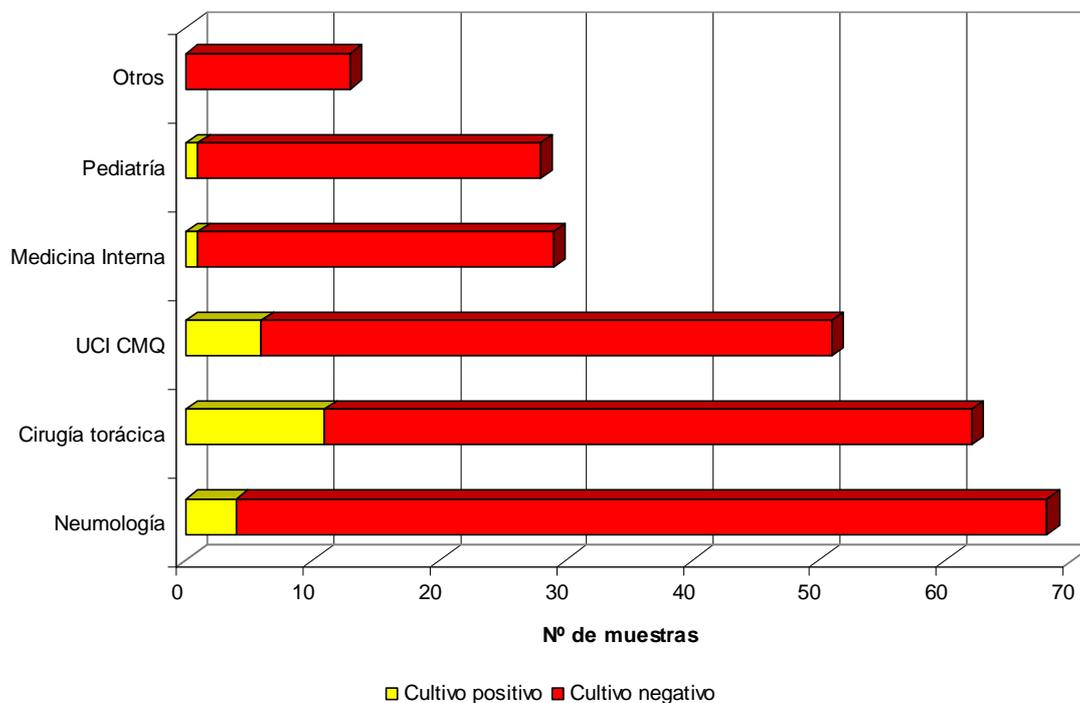
Gráfica A.IV.3. Relación entre sospecha diagnóstica y microorganismos aislados.
Otros: fractura, síndrome febril, bursitis...

Tanto en artritis como en las infecciones de prótesis articulares, el principal aislamiento fueron los CGP (60% y 72,2% respectivamente), seguidos de los BGN (20% y 16,7% respectivamente).

El principal agente etiológico de las infecciones relacionadas con prótesis articulares fue *S. epidermidis* (55,5%), seguido de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *Propionibacterium* spp (11,1% en cada caso), tal como se refleja en la literatura actual (**Lentino 2003; Shirliff 2002; Gupta 2001**).

A.V. LÍQUIDOS PLEURALES.-

A.V.1. Distribución de las muestras por Servicio de procedencia.

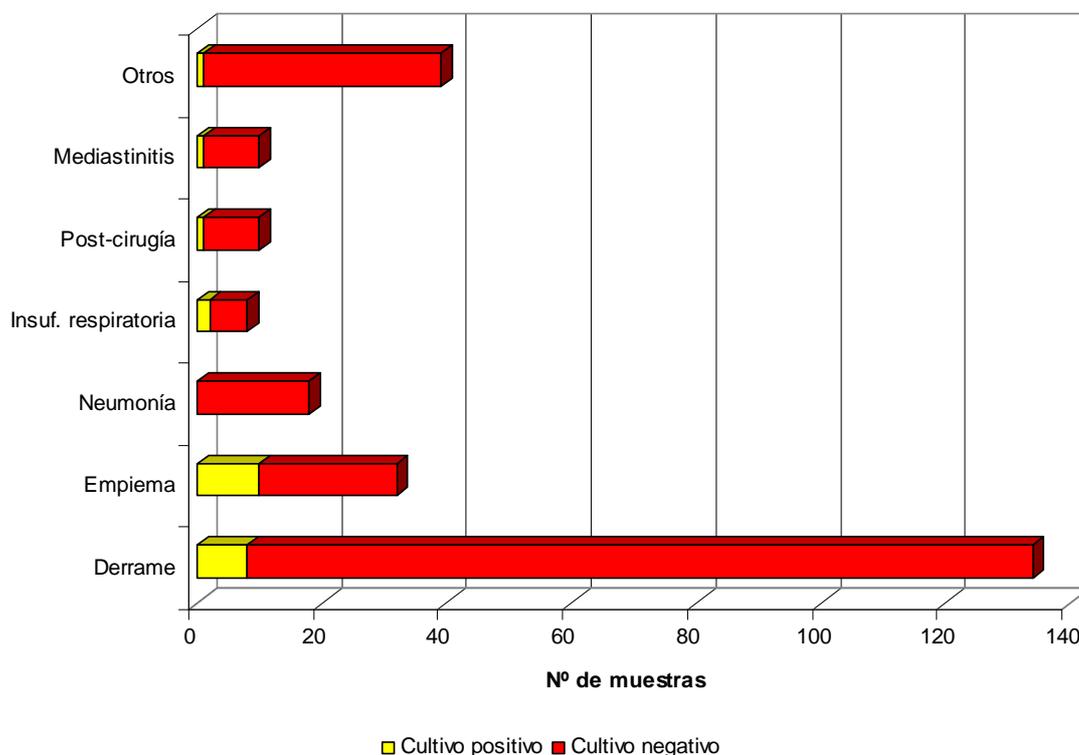


Gráfica A.V.1. Distribución líquidos pleurales por servicios y resultado del cultivo.
 *Otros: digestivo, cirugía general, oncología, cirugía cardiovascular, nefrología.

El mayor porcentaje de muestras procedió del servicio de Neumología (27,1%), seguido por Cirugía torácica (24,7%) y la UCI del CMQ (20,3%).

Por otro lado, el 17,7% de las muestras procedentes del servicio de Cirugía torácica presentaron un cultivo positivo, seguido de la UCI del CMQ (11,8%). De igual forma el 47,8% de los cultivos positivos obtenidos pertenecían a pacientes del servicio de Cirugía torácica y un 26,1% a la UCI del CMQ.

A.V.2. Distribución de las muestras por sospecha diagnóstica.

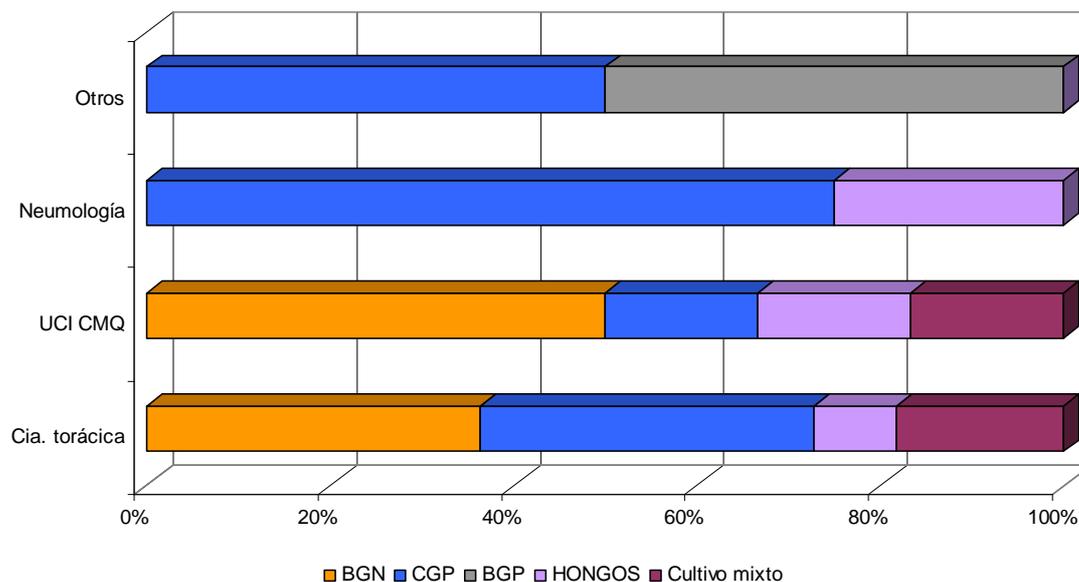


Gráfica A.V.2. Cuadros clínicos responsables del estudio y resultado del cultivo.
Otros: cardiopatía, neumotórax, traumatismo, tuberculosis, pleuritis, hemotórax...

El principal motivo que indujo la obtención del líquido pleural fue la existencia de un derrame pleural (53,4%), seguido por la sospecha de empiema (12,7%) y la neumonía (7,2%).

El mayor porcentaje de resultados positivos tanto por muestras enviadas como por total de cultivos positivos, correspondió a la sospecha clínica de empiema (31,2% y 43,5% respectivamente). El 25% de las muestras con sospecha clínica de insuficiencia respiratoria aguda tuvieron un cultivo positivo; sin embargo la segunda sospecha clínica responsable del mayor número de cultivos positivos fue el derrame pleural (34,8%).

A.V.3. Relación Servicio de procedencia y microorganismos aislados.

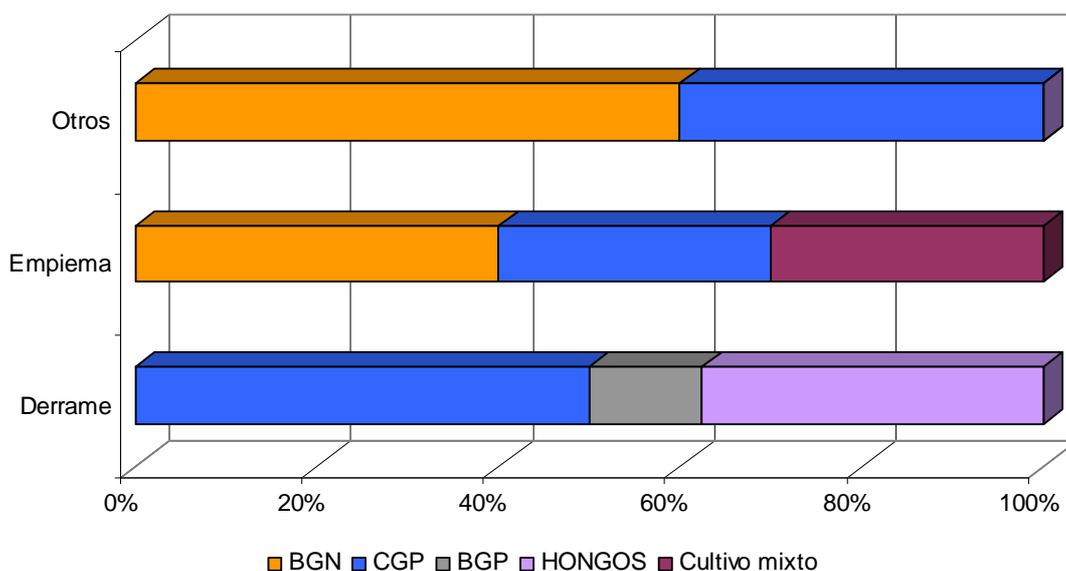


Gráfica A.V.3. Relación grupo microorganismos aislados y servicio procedencia de la muestra. Otros: Pediatría y Medicina Interna.

Los microorganismos predominantes en el servicio de Cirugía torácica fueron los BGN y CGP (36,4% cada uno), mientras que en la UCI del CMQ predominaron los BGN (50%). Por el contrario en el servicio de Neumología el 75% de los aislamientos correspondieron al grupo de los CGP.

Dentro del grupo de los CGP destacar a *S. anginosus* como principal agente etiológico de los derrames pleurales (33,3% de los aislamientos) seguido de *S. aureus* (22,2%). Sólo se produjo un aislamiento de *S. pneumoniae* (11,1%). En el grupo de los BGN se produjo un amplio abanico de agentes etiológicos siendo *P. aeruginosa* el más aislado (28,6%).

A.V.4. Relación entre sospecha diagnóstica y microorganismos aislados.



Gráfica A.V.4. Distribución grupo de microorganismos aislados y sospecha diagnóstica motivo del estudio. Otros: insuficiencia respiratoria aguda, mediastinitis, neumotórax.

El 40% de los empiemas estuvieron ocasionados por BGN, aislándose: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis*; coincidiendo con la literatura (**Chen 2000; Hamm 1997**). Mientras que CGP y floras mixtas fueron responsables del 30% de los aislamientos (cada uno). *S. aureus* fue el aislamiento más frecuente dentro de los CGP y el segundo microorganismo más aislado ante la sospecha clínica de empiema dato que contrasta con lo expuesto en la literatura donde se presenta como un agente ocasionalmente relacionado con las complicaciones de este tipo de cirugía (**Moreillon 2005**).

Por el contrario, el 50% de los derrames estuvieron ocasionados por CGP, siendo *S. anginosus* el principal agente etiológico (50%). Mientras que un 37,5% de derrames estuvieron ocasionados por hongos (*C. albicans*, *C. parapsilosis* y *Aspergillus* spp), no aislándose en ningún caso de sospecha clínica de empiema.

Sólo se produjo un aislamiento de *S. pneumoniae* coincidiendo con el hecho de que muchos de los derrames asociados a este microorganismo son reactivos (**Musher 2005**).

BIBLIOGRAFÍA

Akriviadis EA, Runyon BA. Utility of an algorithm in differentiating spontaneous from secondary bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1990; 98(1):127-33.

Alfageme I, Munoz F, Pena N, Umbria S. Empyema of the thorax in adults. Etiology, microbiologic findings, and management. *Chest* 1993; 103(3):839-43.

Ali I, Unruh H. Management of empyema thoracis. *Ann Thorac Surg* 1990; 50(3):355-9.

Archer GL, Climo MW. *Staphylococcus epidermidis* and Other Coagulase-Negative Staphylococci. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill-Livingstone, 2005: 2352-60.

Arfania D, Everett ED, Nolph KD, Rubin J. Uncommon causes of peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis. *Arch Intern Med* 1981; 141(1):61-4.

Bardin T. Gonococcal arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003; 17(2):201-8.

Barenfanger J, Drake C, Leon N, Mueller T, Troutt T. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. *J Clin Microbiol* 2000; 38(8):2824-8.

Bar-Meir S, Conn HO. Spontaneous bacterial peritonitis induced by intraarterial vasopressin therapy. *Gastroenterology* 1976; 70(3):418-21.

Bauer JD. Numerical evaluation of formed elements of blood. En: Sonnenwirth AC, Jarett L (eds). *Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis*. 8th edition. Saint Louis: C.V. Mosby Co, 1980: 785-802.

Bonadio WA. The cerebrospinal fluid: physiologic aspects and alterations associated with bacterial meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11(6):423-31.

Bouza Santiago E, Barberán López J. Infecciones óseas y osteoarticulares. Infecciones asociadas a material de osteosíntesis y

prótesis articulares. En: Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S (directores). Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana, 2006: 1381-96.

Bowerman SG, Green NE, Mencio GA. Decline of bone and joint infections attributable to *haemophilus influenzae* type b. Clin Orthop Relat Res 1997; (341):128-33.

Brause BD. Infections with Protoses in Bone and Joints. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill-Livingstone, 2005: 1332-37.

Brook I, Frazier EH. Aerobic and anaerobic microbiology of empyema. A retrospective review in two military hospitals. Chest 1993; 103(5):1502-7.

Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Estructura celular. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 18^a edición. Ciudad de México: Manual Moderno, 2005: 9-40.

Buckingham SC, King MD, Miller ML. Incidence and etiologies of complicated parapneumonic effusions in children, 1996 to 2001. Pediatr Infect Dis J 2003; 22(6):499-504.

Chapin KC, Murray PR. Principles of Stains and Media. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8th edition. Washington, DC: ASM Press, 2003: 257-67.

Chapin-Robertson K, Dahlberg SE, Edberg SC. Clinical and laboratory analyses of cytopsin-prepared Gram stains for recovery and diagnosis of bacteria from sterile body fluids. J Clin Microbiol 1992; 30(2):377-80.

Chen KY, Hsueh PR, Liaw YS, Yang PC, Luh KT. A 10-year experience with bacteriology of acute thoracic empyema: emphasis on *Klebsiella pneumoniae* in patients with diabetes mellitus. Chest 2000; 117(6):1685-9.

Correia JP, Conn HO. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: endemic or epidemic? Med Clin North Am 1975; 59(4):963-81.

Cox CJ, Kempell KE, Gaston JS. Investigation of infectious agents

associated with arthritis by reverse transcription PCR of bacterial rRNA. *Arthritis Res Ther* 2003; 5(1):R1-8.

Cytospin 4. Cell preparation system. Thermo Shandon. 2002.

De Souza YG, Freese UK, Greenspan D, Greenspan JS. Diagnosis of Epstein-Barr virus infection in hairy leukoplakia by using nucleic acid hybridization and noninvasive techniques. *J Clin Microbiol* 1990; 28(12):2775-8.

Dufresne JJ. Citología práctica del líquido cefalorraquídeo. Basilea, Suiza: Ciba-Geigy SA, 1971.

Dunbar SA, Eason RA, Musher DM, Clarridge JE 3rd. Microscopic examination and broth culture of cerebrospinal fluid in diagnosis of meningitis. *J Clin Microbiol* 1998; 36(6):1617-20.

Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VS Jr, Swartz MN. Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N Engl J Med* 1993; 328(1):21-8.

Eneström S. Some aspects on technique and clinical evaluation of CSF cytology. *Acta Neurol Scand Suppl* 1965; 13 Pt 1:153-9.

Fenton S, Wu G, Cattran D. Clinical aspects of peritonitis in patients on CAPD. Citado en: Levison ME, Bush LM. Peritonitis and Intraperitoneal Abscesses. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill-Livingstone, 2005: 927-51.

Fernández Viladrich P, Cabellos Mínguez C. Infecciones del Sistema Nervioso Central. En: Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S (directores). *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana, 2006: 1343-54.

Friedly G. Importance of bacterial stains in the diagnosis of infectious disease. *J Med Technol* 1985; 1:823-33.

Gardner GC, Weisman MH. Pyarthrosis in patients with rheumatoid

arthritis: a report of 13 cases and a review of the literature from the past 40 years. *Am J Med* 1990; 88(5):503-11.

Gerna G, Percivalle E, Torsellini M, Revello MG. Standardization of the human cytomegalovirus antigenemia assay by means of in vitro-generated pp65-positive peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Microbiol* 1998; 36(12):3585-9.

Gill VJ, Fedorko DP, Witebsky FG. The Clinician and the Microbiology Laboratory. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill-Livingstone, 2005: 203-41.

Goldenberg DL, Reed JI. Bacterial arthritis. *N Engl J Med* 1985; 312(12):764-71.

Goldenberg DL. Septic arthritis. *Lancet* 1998; 351(9097):197-202.

Good JT Jr, King TE, Antony VB, Sahn SA. Lupus pleuritis. Clinical features and pleural fluid characteristics with special reference to pleural fluid antinuclear antibodies. *Chest* 1983; 84(6):714-8.

Gordon S, Raik E, Hewitt B, Moore P. Cerebrospinal fluid involvement in patients with adult acute leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Aust N Z J Med* 1980; 10(5):509-12.

Gray LD, Fedorko DP. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5(2):130-45.

Greenlee JE. Approach to diagnosis of meningitis. Cerebrospinal fluid evaluation. *Infect Dis Clin North Am* 1990; 4(4):583-98.

Gupta MN, Sturrock RD, Field M. A prospective 2-year study of 75 patients with adult-onset septic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40(1):24-30.

Hamm H, Light RW. Parapneumonic effusion and empyema. *Eur Respir J* 1997; 10(5):1150-6.

Hoefs JC, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. *Dis Mon* 1985;

31(9):1-48.

Hoefs JC. Diagnostic paracentesis. A potent clinical tool. *Gastroenterology* 1990; 98(1):230-6.

Höltje JV. Cell Walls, Bacterial. En: Lederberg J (ed). *Encyclopedia of Microbiology*. 2nd edition. Vol. 1. New York, NY: Academic Press, 2000: 759-71.

Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd edition. Washington, DC: ASM Press, 2004.

Jensen AG, Espersen F, Skinhoj P, Rosdahl VT, Frimodt-Moller N. *Staphylococcus aureus* meningitis. A review of 104 nationwide, consecutive cases. *Arch Intern Med* 1993; 153(16):1902-8.

Kaandorp¹ CJ, Dinant HJ, van de Laar MA, Moens HJ, Prins AP, Dijkmans BA. Incidence and sources of native and prosthetic joint infection: a community based prospective survey. *Ann Rheum Dis* 1997; 56(8):470-5.

Kaandorp² CJ, Krijnen P, Moens HJ, Habbema JD, van Schaardenburg D. The outcome of bacterial arthritis: a prospective community-based study. *Arthritis Rheum* 1997; 40(5):884-92.

Kanegaye JT, Soliemanzadeh P, Bradley JS. Lumbar puncture in pediatric bacterial meningitis: defining the time interval for recovery of cerebrospinal fluid pathogens after parenteral antibiotic pretreatment. *Pediatrics* 2001; 108(5):1169-74.

Kaufman BA. Infections of cerebrospinal fluid shunts. Citado en: Tunkel AR, Kaufman BA. *Cerebrospinal Fluid Shunt Infections*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill-Livingstone, 2005: 1126-32.

Kjeldsberg CR, Krieg AF. Líquido cefalorraquídeo y otros líquidos corporales. En: Henry JB (ed). *Todd-Sanford-Davidsohn Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio*. 8^a edición. Vol. 1. Barcelona: Salvat Editores SA, 1988: 569-611.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WCJr. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th edition. Philadelphia: Lippincott, 1997.

Kralinsky K, Krcmeryova T, Tuharsky J, Krcmery V. Nosocomial *Acinetobacter* meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19(3):270-1.

Kraus ES, Spector DA. Characteristics and sequelae of peritonitis in diabetics and nondiabetics receiving chronic intermittent peritoneal dialysis. *Medicine (Baltimore)* 1983; 62(1):52-7.

La Scolea LJ Jr, Dryja D. Quantitation of bacteria in cerebrospinal fluid and blood of children with meningitis and its diagnostic significance. *J Clin Microbiol* 1984; 19(2):187-90.

Lan CC, Wong TT, Chen SJ, Liang ML, Tang RB. Early diagnosis of ventriculoperitoneal shunt infections and malfunctions in children with hydrocephalus. *J Microbiol Immunol Infect* 2003; 36(1):47-50.

Landry ML, Ferguson D, Wlochowski J. Detection of herpes simplex virus in clinical specimens by cytospin-enhanced direct immunofluorescence. *J Clin Microbiol* 1997; 35(1):302-4.

Landry ML, Ferguson D. Suboptimal detection of influenza virus in adults by the Directigen Flu A+B enzyme immunoassay and correlation of results with the number of antigen-positive cells detected by cytospin immunofluorescence. *J Clin Microbiol* 2003; 41(7):3407-9.

Lankisch PG, Droge M, Becher R. Pleural effusions: a new negative prognostic parameter for acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1994; 89(10):1849-51.

Lauer BA, Reller LB, Mirrett S. Comparison of acridine orange and Gram stains for detection of microorganisms in cerebrospinal fluid and other clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1981; 14(2):201-5.

LeMense GP, Strange C, Sahn SA. Empyema thoracis. Therapeutic management and outcome. *Chest* 1995; 107(6):1532-7.

Lentino JR. Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin Infect Dis* 2003; 36(9):1157-61.

Levison ME, Bush LM. Peritonitis and Intraperitoneal Abscesses. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill-Livingstone, 2005: 927-51.

Lode H, Schaberg T, Eller J. Pleurisy and Empyema. Root R, Waldvogel F, Corey L, Tenenbaum WE (eds). *Clinical Infectious Diseases. A practical approach*. New York: Oxford University Press, 1998: 565-72.

Martin WJ 2nd, Smith TF. Rapid detection of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage specimens by a monoclonal antibody method. *J Clin Microbiol* 1986; 23(6):1006-8.

Marton KI, Gean AD. The spinal tap: a new look at an old test. *Ann Intern Med* 1986; 104(6):840-8.

Mayhall CG, Archer NH, Lamb VA, Spadora AC, Baggett JW, Ward JD, Narayan RK. Ventriculostomy-related infections. A prospective epidemiologic study. *N Engl J Med* 1984; 310(9):553-9.

McDougal WS, Izant RJ Jr, Zollinger RM Jr. Primary peritonitis in infancy and childhood. *Ann Surg* 1975; 181(3):310-3.

Memoria Anual, Hospital Virgen de las Nieves. 2005.

Meredith FT, Phillips HK, Reller LB. Clinical utility of broth cultures of cerebrospinal fluid from patients at risk for shunt infections. *J Clin Microbiol* 1997; 35(12):3109-11.

Mimoz O, Karim A, Mazoit JX, Edouard A, Leprince S, Nordmann P. Gram staining of protected pulmonary specimens in the early diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Br J Anaesth* 2000; 85(5):735-9.

Mirrett S, Weinstein MP, Reimer LG, Wilson ML, Reller LB. Relevance of the number of positive bottles in determining clinical significance of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. *J Clin Microbiol* 2001;

39(9):3279-81.

Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. Principles of Anti-infective Therapy. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill-Livingstone, 2005: 3242-52.

Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill-Livingstone, 2005: 2321-52.

Morgan DS, Fisher D, Merianos A, Currie BJ. An 18 year clinical review of septic arthritis from tropical Australia. *Epidemiol Infect* 1996; 117(3):423-8.

Mowat C, Stanley AJ. Review article: spontaneous bacterial peritonitis-diagnosis, treatment and prevention. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15(12):1851-9.

Murphy TF. *Haemophilus* Infections. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill-Livingstone, 2005: 2661-69.

Murray P.R, Baron E.J, Jorgensen J.H, Pfaller M.A, Tenover F.C, White O. Manual of Clinical Microbiology. 8^a edición. Washington, DC: ASM Press, 2003.

Murray PR, Hampton CM. Recovery of pathogenic bacteria from cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1980; 12(4):554-7.

Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill-Livingstone, 2005: 2392-411.

Mylonakis E, Hohmann EL, Calderwood SB. Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. 33 years' experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. *Medicine (Baltimore)* 1998; 77(5):313-36.

Nade S. Septic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003; 17(2):183-

200.

Nathens AB, Rotstein OD, Marshall JC. Tertiary peritonitis: clinical features of a complex nosocomial infection. *World J Surg* 1998; 22(2):158-63.

Newhall WJ, Johnson RE, DeLisle S, Fine D, Hadgu A, Matsuda B, Osmond D, Campbell J, Stamm WE. Head-to-head evaluation of five chlamydia tests relative to a quality-assured culture standard. *J Clin Microbiol* 1999; 37(3):681-5.

Ohi CA. Infectious Arthritis of Native Joints. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill-Livingstone, 2005: 1311-22.

Pedrosa I, Paulos S, Reina G, Mazuelas P, Miranda C, de la Rosa M. Estudio de los aislados de *Neisseria meningitidis* en los últimos años. XII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Valencia, 10-13 de mayo de 2006 (Abstract).

Reina G, Camacho E, Turiño JD, Pérez MD, Miranda C. Infection Due *Neisseria meningitidis* Serogroup W-135. *Clinical Microbiology Newsletter* 2005; 27 (6): 48-9.

Ross¹ JJ, Hu LT. Septic arthritis of the pubic symphysis: review of 100 cases. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82(5):340-5.

Ross² JJ, Saltzman CL, Carling P, Shapiro DS. Pneumococcal septic arthritis: review of 190 cases. *Clin Infect Dis* 2003; 36(3):319-27.

Rubin J, Rogers WA, Taylor HM, Everett ED, Prowant BF, Fruto LV, Nolph KD. Peritonitis during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ann Intern Med* 1980; 92(1):7-13.

Runyon BA, Canawati HN, Akriviadis EA. Optimization of ascitic fluid culture technique. *Gastroenterology* 1988; 95(5):1351-5.

Runyon BA, Umland ET, Merlin T. Inoculation of blood culture bottles with ascitic fluid. Improved detection of spontaneous bacterial peritonitis. *Arch*

Intern Med 1987; 147(1):73-5.

Runyon BA. Monomicrobial nonneutrocytic bacterascites: a variant of spontaneous bacterial peritonitis. Hepatology 1990; 12(4 Pt 1):710-5.

Rushforth JA, Hoy CM, Kite P, Puntis JW. Rapid diagnosis of central venous catheter sepsis. Lancet 1993; 342(8868):402-3.

Ryan MJ, Kavanagh R, Wall PG, Hazleman BL. Bacterial joint infections in England and Wales: analysis of bacterial isolates over a four year period. Br J Rheumatol 1997; 36(3):370-3.

Sáez-Llorens X, McCracken GHJ. Bacterial meningitis in children. Lancet 2003; 361(9375):2139-48.

Saravolatz LD, Manzor O, VanderVelde N, Pawlak J, Belian B. Broad-range bacterial polymerase chain reaction for early detection of bacterial meningitis. Clin Infect Dis 2003; 36(1):40-5.

Sayk J. The results of the recent cytological studies of cerebrospinal fluid with sedimentation chamber. 1954. Citado en: Dufresne JJ, (ed). Citología práctica del líquido cefalorraquídeo. Basilea, Suiza: Ciba-Geigy SA, 1971.

Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, Lefkowitz L, Perkins BA. Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. N Engl J Med 1997; 337 (14):970-6.

Seal SH. A method for concentrating cancer cells suspended in large quantities of fluid. 1956. Citado en: Dufresne JJ, (ed). Citología práctica del líquido cefalorraquídeo. Basilea, Suiza: Ciba-Geigy SA, 1971.

Septimus E. Pleural Effusion and Empyema. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill-Livingstone, 2005: 845-53.

Sewell CM, Clarridge J, Lacke C, Weinman EJ, Young EJ. Staphylococcal nasal carriage and subsequent infection in peritoneal dialysis patients. JAMA 1982; 248(12):1493-5.

Shanholtzer CJ, Schaper PJ, Peterson LR. Concentrated gram stain smears prepared with a cytopsin centrifuge. *J Clin Microbiol* 1982; 16(6):1052-6.

Shirliff ME, Mader JT. Acute septic arthritis. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(4):527-44.

Shmerling RH, Delbanco TL, Tosteson AN, Trentham DE. Synovial fluid tests. What should be ordered? *JAMA* 1990; 264(8):1009-14.

Simon G, Schroeer H. The cell-catch procedure. A new method which preserves all cellular elements of spinal-fluid samples. 1963. Citado en: Dufresne JJ, (ed). *Citología práctica del líquido cefalorraquídeo*. Basilea, Suiza: Ciba-Geigy SA, 1971.

Smith JA, Mullerworth MH, Westlake GW, Tatoulis J. Empyema thoracis: 14-year experience in a teaching center. *Ann Thorac Surg* 1991; 51(1):39-42.

Solà Lamoglia R. Infecciones bacterianas en la cirrosis hepática. Drobnic L (ed). *Tratamiento antimicrobiano*. 3ª edición. Ergon, 2002: 133-48.

Stein PD, Henry JW. Clinical characteristics of patients with acute pulmonary embolism stratified according to their presenting syndromes. *Chest* 1997; 112(4):974-9.

Thomas KE, Hasbun R, Jekel J, Quagliarello VJ. The diagnostic accuracy of Kernig's sign, Brudzinski's sign, and nuchal rigidity in adults with suspected meningitis. *Clin Infect Dis* 2002; 35(1):46-52.

Thomson RB, Miller JM. Specimen Collection, Transport, and Processing: Bacteriology. En: Murray PR, Baron FJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th edition. Washington, DC: ASM Press, 2003: 286-333.

Trampuz A, Steckelberg JM, Osmon DR, Cockerill Fr, Hanssen AD, Patel R. Advances in the laboratory diagnosis of prosthetic joint infection. Citado en: Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. *Prosthetic-joint infections*.

N Engl J Med 2004; 351(16):1645-54.

Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, Whitley RJ. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. Clin Infect Dis 2004; 39(9):1267-84.

Tunkel¹ AR. Approach to the patient with Central Nervous System Infection. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill-Livingstone, 2005: 1079-83.

Tunkel² AR, Kaufman BA. Cerebrospinal Fluid Shunt Infections. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill-Livingstone, 2005: 1126-32.

Tunkel³ AR, Schweld WM. Acute meningitis. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill-Livingstone, 2005: 1083-126.

Unhanand M, Mustafa MM, McCracken GH Jr, Nelson JD. Gram-negative enteric bacillary meningitis: a twenty-one-year experience. J Pediatr 1993; 122(1):15-21.

Van de Beek D, de Gans J, Tunkel AR, Wijdicks EF. Community-acquired bacterial meningitis in adults. N Engl J Med 2006; 354(1):44-53.

Van Der Pol B, Ferrero DV, Buck-Barrington L, Hook E 3rd, Lenderman C, Quinn T, Gaydos CA, Lovchik J, Schachter J, Moncada J, Hall G, Tuohy MJ, Jones RB. Multicenter evaluation of the BDProbeTec ET System for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens, female endocervical swabs, and male urethral swabs. J Clin Microbiol 2001; 39(3):1008-16.

Vas SI. Microbiologic aspects of chronic ambulatory peritoneal dialysis. Kidney Int 1983; 23(1):83-92.

Wang CL, Wang SM, Yang YJ, Tsai CH, Liu CC. Septic arthritis in

children: relationship of causative pathogens, complications, and outcome. *J Microbiol Immunol Infect* 2003; 36(1):41-6.

Wang KW, Chang WN, Shih TY, Huang CR, Tsai NW, Chang CS, Chuang YC, Liliang PC, Su TM, Rau CS, Tsai YD, Cheng BC, Hung PL, Chang CJ, Lu CH. Infection of cerebrospinal fluid shunts: causative pathogens, clinical features, and outcomes. *Jpn J Infect Dis* 2004; 57(2):44-8.

Weinstein MP, Iannini PB, Stratton CW, Eickhoff TC. Spontaneous bacterial peritonitis. A review of 28 cases with emphasis on improved survival and factors influencing prognosis. *Am J Med* 1978; 64(4):592-8.

Weinstein MP. Blood culture contamination: persisting problems and partial progress. *J Clin Microbiol* 2003; 41(6):2275-8.

West TE, Walshe JJ, Krol CP, Amsterdam D. Staphylococcal peritonitis in patients on continuous peritoneal dialysis. *J Clin Microbiol* 1986; 23(5):809-12.

Weston VC, Jones AC, Bradbury N, Fawthrop F, Doherty M. Clinical features and outcome of septic arthritis in a single UK Health District 1982-1991. *Ann Rheum Dis* 1999; 58(4):214-9.

Wise CM, Morris CR, Wasilaukas BL, Salzer WL. Gonococcal arthritis in an era of increasing penicillin resistance. Presentations and outcomes in 41 recent cases (1985-1991). *Arch Intern Med* 1994; 154(23):2690-5.

Woodruff KH. Cerebrospinal fluid cytomorphology using cytocentrifugation. Citado en: Mengel M. The Use of Cytocentrifuge in the Diagnosis of Meningitis. *Am J Clin Pathol* 1985; 84(2):212-6.

Woods GL, Washington JA 2nd. Comparison of methods for processing dialysate in suspected continuous ambulatory peritoneal dialysis-associated peritonitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1987; 7(2):155-7.

York¹ MK, Thomson RB Jr. Body Fluid Cultures (Excluding Blood, Cerebrospinal fluid, and Urine). En: Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology*

Procedures Handbook. 2nd edition. Washington, DC: ASM Press, 2004: 3.5.

York² MK. Cerebrospinal Fluid Cultures. En: Isenberg HD (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd edition. Washington, DC: ASM Press, 2004: 3.7.

York³ MK. Gram Stain. En: Isenberg HD (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd edition. Washington, DC: ASM Press, 2004: 3.2.1.

Zelenitsky S, Barns L, Findlay I, Alfa M, Ariano R, Fine A, Harding G. Analysis of microbiological trends in peritoneal dialysis-related peritonitis from 1991 to 1998. Am J Kidney Dis 2000; 36(5):1009-13.

Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. N Engl J Med 2004; 351(16):1645-54.