

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Evaluación de la técnica de sonificación para el diagnóstico microbiológico de infecciones asociadas al uso de implantes

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Laura Prieto Borja

DIRECTORES

Jaime Esteban Moreno
María Luisa Gómez-Lus Centelles

Madrid, 2018

EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE SONICACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE INFECCIONES ASOCIADAS AL USO DE IMPLANTES

Trabajo de tesis doctoral presentado por: **Laura Prieto Borja**

Directores: Jaime Esteban Moreno y María Luisa Gómez-Lus
Centelles

Madrid, 2017



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

Doctorado en Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas

Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
<i>Nombre del Doctorando</i>	Laura Prieto Borja
<i>Título de la Tesis</i>	EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE SONICACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE INFECCIONES ASOCIADAS AL USO DE IMPLANTES
<i>Facultad o Centro</i>	Facultad de Medicina UCM

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
<i>Nombre Completo</i>	Jaime Esteban Moreno
<i>Centro al que pertenece y dirección</i>	Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz. Avenida Reyes Católicos nº2
<i>D.N.I./Pasaporte</i>	2527918B
<i>e-mail</i>	jestebanmoreno@gmail.com

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	<i>Muy Buena</i>	<i>Buena</i>	<i>Suficiente</i>	<i>Deficiente</i>
<i>Originalidad</i>	X			
<i>Definición Objetivos</i>	X			
<i>Metodología</i>	X			
<i>Relevancia Resultados</i>	X			
<i>Discusión / Conclusiones</i>	X			

INFORME

La tesis incluye todos los apartados con claridad y concisión. Los objetivos y la hipótesis son claros y las conclusiones adecuadas al trabajo realizado. La tesis reúne en mi opinión las condiciones para su defensa.

Madrid, a 16 de junio de 2017

Fdo.: Jaime Esteban Moreno

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jaime Esteban Moreno', is written over a faint, light-colored rectangular stamp or watermark. The signature is stylized and cursive.

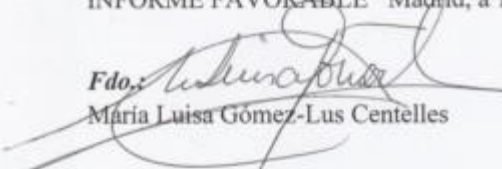
Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
<i>Nombre del Doctorando</i>	Laura Prieto Borja
<i>Título de la Tesis</i>	EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE SONICACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE INFECCIONES ASOCIADAS AL USO DE IMPLANTES
<i>Facultad o Centro</i>	Facultad de Medicina UCM

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
<i>Nombre Completo</i>	María Luisa Gómez-Lus Centelles
<i>Centro al que pertenece y dirección</i>	Facultad de Medicina Área de Microbiología- Departamento de Medicina Avda. Complutense s/n
<i>D.N.I./Pasaporte</i>	17.708.569H
<i>e-mail</i>	mlgomezl@ucm.es

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	<i>Muy Buena</i>	<i>Buena</i>	<i>Suficiente</i>	<i>Deficiente</i>
<i>Originalidad</i>	X			
<i>Definición Objetivos</i>	X			
<i>Metodología</i>	X			
<i>Relevancia Resultados</i>	X			
<i>Discusión / Conclusiones</i>	X			

INFORME FAVORABLE Madrid, a 15 de Junio de 2017

Fdo: 
María Luisa Gómez-Lus Centelles

AGRADECIMIENTOS

Me siento muy contenta de haber llegado hasta aquí y concluir mi etapa de doctoranda. A pesar de los momentos duros y difíciles que la investigación conlleva, ha sido una época repleta de buenos momentos, no sólo profesionales, sino especialmente personales. He tenido la suerte de conocer personas maravillosas, y de afianzar mi relación con los de siempre. Soy muy afortunada de haber contado con tanta gente que ha contribuido a que llegue a este punto, y por ello quiero agradecerleselo.

Especialmente y en primer lugar a Sergio, mi compañero de viaje en la vida y una persona por la que siento una profunda admiración personal por sus valores y su enorme corazón. No tengo palabras que resuman el apoyo incondicional y el calor recibido durante todos estos años en los buenos momentos, y en particular en los malos. Siempre ha confiado en mí, incluso cuando yo misma no lo hacía, ha sido la persona que más ha aguantado mis frustraciones cuando algo no salía como hubiera querido, y siempre ha sabido sacar mi coraje para seguir adelante, dándome la fortaleza necesaria y recordándome que todo merecía la pena por estar dedicándome a lo que me gustaba. Pero el apoyo no ha sido únicamente moral, sino que sus conocimientos me han ayudado a comprender mejor muchos aspectos de mi investigación durante tantas horas de charlas científicas. Un gran porcentaje del mérito de esta tesis es suyo así que debo agradecerle que siempre haya estado ahí convirtiéndose en mi salvavidas.

En segundo lugar, mención especial merece también uno de mis directores de tesis, Jaime Esteban. Fue él quien me introdujo en el campo de la investigación, así que siempre tendré que agradecerle que me haya descubierto este mundo, y que haya estado disponible a contestar mis dudas, especialmente fuera del horario laboral. Ha sido un

honor haber aprendido de él durante todos estos años, y me enorgullece la confianza depositada en mí.

Igualmente quiero agradecer a mi otra directora de tesis, Marisa Gómez Lus, y a mi tutora Lola Folgueira, quienes no dudaron en ofrecerme su ayuda cuando más la necesitaba, además de haberme guiado y aconsejado durante toda esta etapa.

Y cómo no, hay una serie de personas que han jugado un papel especial en todo esto, mi numerosa familia: mi madre, mis hermanos, mis sobrinos, mis cuñados y mi familia política, que siempre me ha acogido en su núcleo como un miembro más. A mis hermanos y mi madre debo agradecerles su tremendo esfuerzo para permitirme que pudiera estudiar y dedicarme a lo que realmente me gustaba. Siempre me he sentido muy protegida y arropada, quizá por ser la más pequeña, pero también de ellos he aprendido valores tan importantes como la humildad, el esfuerzo, la perseverancia, y la lucha para ganarse a pulso lo que uno quiere. A todos los mayores en general, gracias por sentirse orgullosos y haber confiado en mí, por repetirme una y otra vez que siempre iba a conseguir lo que me propusiera, por comprender que esto era importante para mí e incluso entender mis ausencias en eventos importantes por tener que echarle horas a la investigación. Y a los pequeños, mis sobrinos, por ser un pilar tan importante en mi vida, por llevarme de nuevo a la infancia cuando estamos juntos, por dejarme disfrutar tanto de ellos y ser responsables de mi felicidad. Toda mi familia ha sido una pieza clave durante todos estos años y me siento muy orgullosa de la piña que formamos.

Esta tesis nació durante mi residencia de Microbiología y Parasitología en la Fundación Jiménez Díaz de Madrid. Por eso, gran parte de los momentos vividos en los años de investigación van íntimamente ligados a los vividos en mi etapa de residente. Quiero agradecer a los adjuntos del servicio Ignacio, Ricardo, Javier y de nuevo a Jaime, todo lo

aprendido y en particular la comprensión que me ofrecieron durante esos 4 años. De no haber sido por la flexibilidad para compaginar el trabajo asistencial y el trabajo de investigación, no sé si habría podido concluir esta etapa. En ese sentido me han puesto las cosas fáciles, y me he sentido muy a gusto trabajando codo con codo con ellos.

En cuanto a mis compañeros de residencia, esa palabra se queda corta. Todos ellos, tanto mis “resis” mayores Cuca, Moncho, María, Iris y Marta Martínez, como mis “resis” menores Chela y Marta García, se han convertido en verdaderos amigos. Han sido muchísimas las experiencias y emociones compartidas dentro y fuera del hospital, y gracias a que todos hemos pasado por fases muy similares, hemos sabido comprendernos y apoyarnos unos a otros. A todos ellos quiero agradecerles que me enseñaran lo que sabían, me ofrecieran siempre su ayuda cuando la necesitaba y me dejaran enseñarles lo que yo iba aprendiendo. Como solemos decir, “lo que la Microbiología ha unido que no lo separe el hombre”.

Igualmente quiero agradecer al resto de personal del servicio de Microbiología (técnicos, residentes, becarios, estudiantes, etc.) por haber formado parte de esta experiencia.

Gracias a mis amigas de la infancia, Laura y Gema porque a pesar de los largos períodos sin vernos por compromisos laborales, cuando lo hacíamos parecía que el tiempo no había pasado. Y a Nacho porque ambos hemos vivido esta etapa de doctorandos a la vez, comprendiéndonos a la perfección.

En último lugar y no por ello menos importante, quiero agradecer a toda la gente que ha contribuido a que pudiera llevar a cabo mis trabajos de investigación: servicio de Cirugía General y Digestivo, Medicina Interna y Traumatología de la FJD y personal del Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas.

Gracias a todos vosotros por ser parte de este trabajo.

ABREVIATURAS

BGN: Bacilos Gram Negativos

BGNNF: Bacilos Gram Negativos No Fermentadores

E: especificidad

EB: Enterobacterias

ECN: Estafilococos Coagulasa Negativa

IP: infección protésica

MCK: Agar MacConkey

PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PVX: Agar chocolate + PolyVitex

RFA: Reactantes de Fase Aguda

S: sensibilidad

SCS: Agar Schaedler + 5% sangre cordero

TSS: Agar triptosa soja + 5% sangre cordero

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

VPN: Valor Predictivo Negativo

VPP: Valor Predictivo Positivo

ÍNDICE DE CONTENIDO

1	RESUMEN	1
2	ABSTRACT	9
3	INTRODUCCIÓN.....	15
3.1	Cuadros clínicos de infecciones asociadas al uso de implantes	19
3.1.1	Infección de prótesis articular	19
3.1.2	Infecciones asociadas al uso de drenajes abdominales	25
3.1.3	Otras infecciones asociadas al uso de implantes	28
3.2	Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas al uso de implantes...29	
3.2.1	Diagnóstico microbiológico convencional de las infecciones asociadas al uso de implantes	30
3.2.2	Diagnóstico de las infecciones asociadas al uso de implantes basado en la técnica de sonicación.....	33
3.2.3	Diagnóstico de las infecciones asociadas al uso de implantes basado en técnicas de biología molecular	41
3.3	Adherencia microbiana y formación del biofilm sobre la superficie de implantes..	43
3.3.1	Adherencia microbiana	43
3.3.2	Formación del biofilm.....	47
3.3.3	Biofilm como mecanismo de patogenicidad	49
4	HIPÓTESIS	53
5	OBJETIVOS.....	57

6	MATERIAL Y MÉTODOS	61
6.1	Estudio <i>in vitro</i> de la influencia del tiempo de sonicación de discos de Ti6Al4Va en la liberación de bacterias desde el biofilm formado sobre la superficie del material	63
6.2	Estudio retrospectivo de comparación del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular con el cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y el cultivo del tejido periprotésico para el diagnóstico de IP	66
6.3	Estudio prospectivo de evaluación de la utilidad del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación del espaciador para el diagnóstico de infecciones asociadas a espaciadores.....	70
6.4	Estudio prospectivo de evaluación de la técnica de PCR Unyvero i60 ITI® a partir del líquido de sonicación de prótesis articulares para el diagnóstico microbiológico de IP	72
6.5	Estudio prospectivo de evaluación del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de drenajes abdominales para el diagnóstico de infección del sitio quirúrgico	75
6.6	Estudio estadístico.....	80
7	RESULTADOS	83
7.1	Estudio <i>in vitro</i> de la influencia del tiempo de sonicación de discos de Ti6Al4Va en la liberación de bacterias desde el biofilm formado sobre la superficie del material	85

7.2	Estudio retrospectivo de comparación del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular con el cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y el cultivo del tejido periprotésico para el diagnóstico de IP	88
7.3	Estudio prospectivo de evaluación de la utilidad del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación del espaciador para el diagnóstico de infecciones asociadas a espaciadores.....	98
7.4	Estudio prospectivo de evaluación de la técnica de PCR Unyvero i60 ITI® a partir del líquido de sonicación de prótesis articulares para el diagnóstico microbiológico de IP	105
7.5	Estudio prospectivo de evaluación del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de drenajes abdominales para el diagnóstico de infección del sitio quirúrgico	112
8	DISCUSIÓN.....	119
8.1	Influencia del tiempo de sonicación de un dispositivo en la liberación de bacterias desde el biofilm formado sobre la superficie del material	122
8.2	Uso de la sonicación para el diagnóstico de infección de prótesis articular	127
8.3	Estudio prospectivo de evaluación del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de drenajes abdominales para el diagnóstico de infección del sitio quirúrgico	139
9	CONCLUSIONES.....	143
10	BIBLIOGRAFÍA.....	149
11	ANEXOS.....	161

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Ejemplo de modelo de prótesis total cadera (izquierda) y parcial de cadera (derecha)[10].	20
Ilustración 2. Ejemplo de modelo de prótesis de rodilla[11].	21
Ilustración 3. Estrategias médicas y quirúrgicas para el manejo de la IP[6].	24
Ilustración 4. Drenaje Blake (imagen izquierda superior), Jackson Pratt (izquierda inferior) y Redon (derecha).	26
Ilustración 5. Compresión y expansión de un fluido por la propagación de ondas de ultrasonidos.	34
Ilustración 6. Generación de micro-flujos durante el proceso de cavitación acústica[47].	36
Ilustración 7. Tipos de cavitación y sus consecuencias[51].	37
Ilustración 8. Esquema de un sistema de sonicación para el diagnóstico de infecciones asociadas al uso de implantes[56].	38
Ilustración 9. Baño de sonicación usado en el IIS-FJD.	39
Ilustración 10. Modelo esquemático de las fases y los factores bacterianos implicados en la formación del biofilm en <i>S. epidermidis</i> [74].	49
Ilustración 11. Mecanismos implicados en la resistencia del biofilm a antimicrobianos[96].	50
Ilustración 12. Discos de Ti6Al4V utilizados en el estudio in vitro.	63
Ilustración 13. Diluciones seriadas y siembra drop plate por el método estándar (10 mL) y el alternativo (1 mL)[103].	65

Ilustración 14. Representación gráfica de la media y desviación estándar de la cantidad total de bacterias (expresadas en UFC) en los 5 mL de líquido obtenido tras sonicación de discos de Ti6Al4V con respecto al tiempo de sonicación (en minutos) para las 5 cepas estudiadas.86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos y mecanismos de resistencia detectados por el sistema Unyvero i60 ITI®.....	73
Tabla 2. Recuento medio y desviación estándar (expresado en UFC) de los 3 experimentos realizados para cada minuto y cepa, calculado en los 5 mL de líquido obtenido tras sonicación de discos de Ti6Al4Va.....	85
Tabla 3. Liberación media de los 10 minutos de sonicación para cada cepa tras la sonicación de discos de Ti6Al4Va.	85
Tabla 4. Comparación del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (CLSPA) con el cultivo del tejido periprotésico y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos (CTP/CLAFH) para pacientes con IP aguda (n=47).....	89
Tabla 5. Comparación del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (CLSPA) con cultivo del tejido periprotésico y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos (CTP/CLAFH) para pacientes con IP crónica (n=63).	91
Tabla 6. Datos para calcular los parámetros estadísticos del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (CLSPA), cultivo del tejido periprotésico (CTP), cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos (CLAFH) y cultivo del tejido periprotésico y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos (CTP/CLAFH) para el diagnóstico microbiológico de IP aguda, crónica y total.	93
Tabla 7. Parámetros estadísticos del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (CLSPA), cultivo del tejido periprotésico (CTP), cultivo del líquido	

articular inoculado en frasco de hemocultivos (CLAFH), y cultivo del tejido periprotésico y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos (CTP/CLAFH) para el diagnóstico microbiológico de IP aguda, crónica y total (expresado en %).	94
Tabla 8. Datos para calcular el aumento del número de pacientes diagnosticados cuando el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (CLSPA) se llevó a cabo conjuntamente con los cultivos convencionales (cultivo del tejido periprotésico y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos) para las IP aguda, crónica y total.	95
Tabla 9. Datos para calcular la S de todos los cultivos en IP total, en los pacientes que recibieron terapia antimicrobiana previa a la cirugía y aquellos que no.	96
Tabla 10. Valores de S de todos los cultivos en IP total, en los pacientes que recibieron terapia antimicrobiana previa a la cirugía y aquellos que no.	96
Tabla 11. Datos clínicos y microbiológicos de los pacientes incluidos en el estudio de la utilidad del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación del espaciador para el diagnóstico de infecciones asociadas a su uso.....	99
Tabla 12. Características clínicas y microbiológicas de los pacientes con infección asociada al uso de espaciadores.....	102
Tabla 13. Comparación de los resultados de todos los métodos diagnósticos en las muestras de pacientes con criterios clínicos de IP. PCR y cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (CLSPA) positivos (n=20).	106
Tabla 14. Comparación de los resultados de todos los métodos diagnósticos en las muestras de pacientes con criterios clínicos de IP. Cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (CLSPA) positivo y PCR negativa (n=20).....	107

Tabla 15. Datos para calcular los parámetros estadísticos del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (CLSPA), PCR múltiple, cultivo del tejido periprotésico (CTP) y cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos (CLAFH) para el diagnóstico de IP.....	110
Tabla 16. Parámetros estadísticos de S, E, VPP y VPN (expresados en %) del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (CLSPA), PCR múltiple, cultivo del tejido periprotésico (CTP) y cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos (CLAFH) para el diagnóstico de IP.....	110
Tabla 17. Principales datos clínicos, epidemiológicos y analíticos de los pacientes con tubos de drenaje abdominales.....	114
Tabla 18. Patógenos potenciales aislados en el cultivo de tubos de drenaje abdominales sonicados y asociados estadísticamente con infección del sitio quirúrgico.	115
Tabla 19. Principales datos clínicos en comparación con el tipo de cultivo del tubo de drenaje: cultivo negativo (CN), aislamiento de un contaminante (C), o de un patógeno potencial (PP).	116
Tabla 20. Comparación de las PCR no basadas en el sistema Unyvero i60 ITI® usadas para el diagnóstico de IP.....	134
Tabla 21. Comparación de los tres grupos de trabajo que utilizan el sistema Unyvero i60 ITI® para diagnóstico de IP.	136

1 RESUMEN

Introducción

La sonicación para el diagnóstico de infecciones asociadas al uso de implantes es una técnica útil, si bien en infección del sitio quirúrgico tras implantación de tubo de drenaje abdominal no se dispone en la actualidad de diagnóstico microbiológico basado en el procesamiento del drenaje.

Hipótesis

- La recuperación de bacterias viables mediante sonicación es tiempo-dependiente.
- La sonicación de las prótesis articulares aumenta la sensibilidad manteniendo la especificidad para el diagnóstico de IP.
- La sonicación de espaciadores proporciona información útil sobre el pronóstico y diagnóstico de la infección.
- La sonicación de tubos de drenaje representa un método útil de diagnóstico y un marcador del pronóstico de la infección del sitio quirúrgico.

Objetivos

- Determinar *in vitro* el tiempo óptimo de exposición a ultrasonidos para la recuperación del mayor número posible de bacterias viables.
- Evaluar la eficacia de una PCR múltiple y del cultivo a partir del sonicado de la prótesis para el diagnóstico de IP.
- Analizar la utilidad del cultivo de espaciadores sonicados para el diagnóstico y pronóstico de esta infección.
- Evaluar la utilidad del cultivo de tubos de drenaje abdominales sonicados para el diagnóstico y pronóstico de infección del sitio quirúrgico.

Resumen

Material y métodos

En los estudios clínicos, los pacientes se dividieron en aquellos con infección y aquellos sin infección (grupo control).

En el estudio *in vitro* se utilizaron 5 cepas colección y discos de Ti6Al4Va.

Todas las muestras se sonicaron y el líquido obtenido tras sonicación se sembró cuantitativamente en medios de cultivo habituales, además de utilizarse para llevar a cabo la técnica de PCR Unyvero i60 ITI®.

Se calcularon los parámetros estadísticos de los métodos diagnósticos y se establecieron correlaciones clínico-microbiológicas estadísticamente significativas.

Resultados

En el estudio *in vitro* el único patrón regular en la cantidad de microorganismos liberados del biofilm se encontró entre el minuto 1 y el 5, ya que aumentó progresivamente.

El cultivo del líquido de sonicación de la prótesis articular fue estadísticamente más sensible que el resto de cultivos en IP crónica ($p < 0,03$). En conjunto con los cultivos tradicionales, la S aumentó significativamente en IP crónica ($p = 0,0005$).

Los pacientes con recuentos > 10.000 UFC/mL del cultivo del espaciador sonicado o con aislamientos de microorganismos diferentes a los de la primera cirugía tuvieron una peor evolución que el resto ($p < 0,01$). Estos mismos parámetros, junto con la positividad del cultivo del espaciador sonicado y la positividad del tejido periprotésico, se correlacionaron con infección ($p < 0,001$).

El sistema Unyvero i60 ITI® mejoró los parámetros de E y VPP (98% y 95,8%) con respecto al cultivo del líquido de sonicación de la prótesis articular (96% y 93,1%),

aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas con los del resto de cultivos.

El aislamiento de patógenos potenciales tras el cultivo de los drenajes sonicados se relacionó significativamente con la presencia de infección, complicaciones, mayor recuento de leucocitos, aspecto seroso del punto de inserción del implante y el uso del drenaje durante más de 3 días ($p \leq 0,04$).

Discusión

Diversos estudios han demostrado que tiempos de sonicación prolongados inactivan las bacterias. Cinco minutos es el tiempo óptimo para recuperar la mayor cantidad de bacterias viables que se encontraban formando un biofilm sobre la superficie de discos de Ti6Al4V.

El cultivo del líquido de sonicación de la prótesis articular fue más sensible que el resto de cultivos en IP crónica, probablemente porque los microorganismos se encuentran formando parte del biofilm. Cuando todos los cultivos (líquido de sonicación de la prótesis articular, tejido periprotésico y líquido articular) se llevaron a cabo, se incrementó notablemente el número de pacientes diagnosticados.

El cultivo del líquido de sonicación de los espaciadores se relacionó significativamente con infección y mala evolución del paciente a través de la positividad del cultivo, recuentos >10.000 UFC/mL, y/o aislamiento de un microorganismo diferente al inicial.

La S de la PCR fue menor que la del cultivo del líquido de sonicación de la prótesis articular. Por tanto, el cultivo de las distintas muestras sigue siendo necesario para el diagnóstico de IP. Por el contrario, la tasa de falsos positivos fue muy baja lo cual demuestra que los resultados positivos se corresponden con pacientes con IP.

Resumen

Durante la práctica clínica, recuentos superiores a 1.500 UCF/mL de patógenos potenciales en el cultivo de los tubos de drenaje sonicados indicarían la necesidad de retirar o recambiar el drenaje para evitar complicaciones.

Conclusiones

- El tiempo óptimo de exposición a ultrasonidos debe alcanzar los cinco minutos para recuperar la mayor cantidad de bacterias viables que forman parte de un biofilm.
- En infección protésica crónica el cultivo del líquido de sonicación de la prótesis articular presenta mayor sensibilidad que el cultivo del líquido articular y del tejido periprotésico, mientras que en aguda no ofrece ninguna ventaja. Llevado a cabo junto con los dos últimos, aumenta significativamente el número de pacientes diagnosticados de infección protésica crónica, por lo que sería recomendable llevar a cabo los tres tipos de cultivo.
- El cultivo del líquido de sonicación de los espaciadores es útil para diagnosticar y predecir la evolución de la infección a través de la positividad del cultivo, el recuento elevado y el aislamiento de un microorganismo diferente al detectado en muestras de la primera cirugía. Llevado a cabo junto con el cultivo del tejido periprotésico, aumenta el número de pacientes diagnosticados.
- La PCR Unyvero i60 ITI® ofrece buenos datos de especificidad y valor predictivo positivo por lo que debe utilizarse en la práctica clínica en casos con una alta sospecha de infección protésica para confirmar la infección. Sin embargo, un resultado negativo no permite nunca descartar una infección, por lo que el cultivo del líquido de sonicación debe seguir llevándose a cabo para el diagnóstico de infección protésica.

- Recuentos superiores a 1.500 UFC/mL de microorganismos considerados “patógenos potenciales” en el cultivo de los tubos de drenaje sonicados, se relaciona con infección del sitio quirúrgico y complicaciones. Los implantes deben ser retirados en cuanto el aspecto del punto de inserción se torne seroso estando su uso limitado a 3 días.

2 ABSTRACT

Introduction

Sonication for the diagnosis of implant related infections is a useful technique, although in surgical site infection (SSI) there is currently no microbiological diagnosis based on the processing of the bioimplant.

Hypothesis

- Recovery of viable bacteria through sonication is time dependent.
- Prosthesis sonication increases sensitivity while maintaining good specificity for the diagnosis of Prosthetic Joint Infection (PJI).
- Sonication of spacers provides useful information about prognosis and diagnosis of infection.
- Sonication of abdominal drains is a useful method for the diagnosis of SSI and a good marker of prognosis.

Objectives

- To determine, using an *in vitro* study, the optimal time of exposure to ultrasound waves to release the maximum number of viable bacteria.
- To evaluate a multiplex PCR technique and the culture performed from the sonicate fluid of prostheses, for the diagnosis of PJI.
- To evaluate the usefulness of sonicate fluid culture of spacers for the diagnosis and prognosis of infection.
- To evaluate the usefulness of sonicate fluid culture of abdominal drains for the diagnosis and prognosis of SSI.

Abstract

Materials and methods

As part of clinical trials, patients were divided into those with clinical criteria of infection and those without infection (control group).

In the *in vitro* study, 5 collection strains and Ti6Al4V discs were used.

Every sample was sonicated and the sonicate fluid was quantitatively cultured on habitual culture media and used to perform the multiplex PCR Unyvero i60 ITI®.

Statistical parameters of all diagnostic methods were calculated, and significant clinical-microbiological correlations were established.

Results

In the *in vitro* study, the number of microorganisms released from the biofilm increased progressively from minute 1 to minute 5.

Sonicate fluid culture of prosthesis was statistically more sensitive than the rest of cultures in delayed PJI ($p < 0.03$). When it was performed in addition to conventional cultures, sensitivity increased in delayed PJI ($p = 0.0005$).

Patients with counts above 10,000 CFU/mL (colony forming unit per mL) of sonicate fluid culture of spacer, or with isolation of different microorganisms to those obtained in the first surgery, had a worse outcome ($p < 0.01$). These parameters, together with having a positive result from the sonicate fluid culture of spacer and peri-implant tissue culture, were associated with infection ($p < 0.001$).

The Unyvero i60 ITI® system improved specificity and positive predictive value (98% and 95.8%) in relation to sonicate fluid culture of prosthesis (96% and 93.1%). However,

there were no significant differences when the sensitivity of PCR was compared to that of the rest of methods.

The isolation of potential pathogens in the sonicate fluid culture of abdominal drain was statistically related to SSI, complications, higher count of leukocytes, serous appearance of the surgical wound, and use of the device for more than 3 days ($p \leq 0.04$).

Discussion

Several studies have demonstrated that long exposure time to ultrasound waves inactivate bacteria. Five minutes is considered the optimal exposure time to recover the maximum number of viable bacteria from a biofilm on the surface of Ti6Al4V discs.

Sonicate fluid culture of prosthesis was more sensitive for delayed PJI than the rest of the cultures, probably because microorganisms form part of the biofilm. When 3 cultures (sonicate fluid culture of prosthesis, peri-implant tissue culture and synovial fluid culture) were carried out, the number of patients diagnosed increased.

Sonicate fluid culture of spacer was statistically related to infection and poor outcome of patients depending on having a positive result from the culture, counts above 10,000 CFU/mL and/or isolation of a microorganism different to the initial one.

PCR sensitivity was lower than that of sonicate fluid culture of prosthesis, though there were no statistically significant differences. Thus, culture of all samples remains necessary for the diagnosis of PJI. On the contrary, the rate of false positives was very low, which means that almost all positive data were indicative of PJI.

In routine clinical settings, pathogen counts above 1,500 CFU/mL appear to indicate the necessity of removing or replacing the drain to avoid complications.

Abstract

Conclusions

- Five minutes is the optimal exposure time to ultrasounds to recover the maximum number of viable bacteria from a biofilm.
- In delayed prosthetic joint infection, sonicate fluid culture of prosthesis shows higher sensitivity than peri-implant tissue culture and synovial fluid culture, whereas in early infection there are no such advantages. When carried out together with those 2 cultures, the number of patients diagnosed increased significantly in delayed prosthetic joint infection, and as a result it is recommended to perform 3 cultures.
- Sonicate fluid culture of spacer is useful for diagnosing and predicting the infection outcome, through having a positive result from culture, high counts and isolation of a microorganism different to that detected from first surgery. When carried out together with peri-implant tissue culture, the number of patients diagnosed increased.
- PCR Unyvero i60 ITI® shows good values of specificity and positive predictive value and must be carried out in the routine setting for simple and quick confirmation in cases of high suspicion of prosthetic joint infection. However, a negative result does not necessarily mean not having infection, reason why sonicate fluid culture of prosthesis remains necessary for the diagnosis of prosthetic joint infection.
- Pathogen counts above 1,500 CFU/mL in sonicate fluid culture of abdominal drain, are related to surgical site infection and complications. Implants must be removed once the insertion point turns serous and their use must be limited to 3 days.

3 INTRODUCCIÓN

El empleo de implantes quirúrgicos ha mejorado la calidad de vida de los pacientes y las tasas de supervivencia relacionadas con diferentes patologías[1]. Sin embargo, la alta tasa de infecciones asociadas al uso de implantes, que son aquellas infecciones que ocurren como consecuencia de la utilización de dispositivos biomédicos durante la práctica clínica, ha obligado a desarrollar nuevos métodos para su diagnóstico.

En las infecciones asociadas al uso de implantes está implicada la formación de un biofilm[1], ya que sobre estos dispositivos de composición variada (silicona, polivinilo, polipropileno, titanio, etc.) y utilizados con diferentes fines (terapéuticos en la mayoría de los casos), microorganismos de distinta índole pueden adherirse a ellos en un inicio, formando finalmente un biofilm sobre la superficie del material[2]. Las infecciones asociadas a la formación de biofilms pueden localizarse sobre tejidos vivos (infección del sitio quirúrgico, infección pulmonar tipo fibrosis quística, endocarditis, etc.) o más característicamente sobre los dispositivos biomédicos[3]. Entre los tipos de implantes más utilizados en medicina y que con mayor frecuencia originan infecciones asociadas a su uso se encuentran las prótesis articulares, espaciadores y material de osteosíntesis, y los catéteres vasculares.

En todas las infecciones asociadas al uso de implantes se establecen interrelaciones entre el material, los factores de patogenicidad del microorganismo, el tejido en el que se implanta el material y el sistema inmune del huésped[4]. Por un lado, los propios tejidos se adhieren a la superficie del material gracias a sus proteínas y glicoproteínas. Además el propio dispositivo puede dañar los tejidos circundantes y originar intolerancia o rechazo en forma de reacción crónica granulomatosa en la que las células multinucleadas fagocitan partículas del material. Y por último, los microorganismos presentes en la interfase entre el propio material y el implantado, activan una cascada de mecanismos

Introducción

enzimáticos así como células proinflamatorias, resultando en las manifestaciones clínicas de la infección[5].

El acceso de los microorganismos al implante es muy variado. Uno de los principales orígenes de la infección es la colonización del dispositivo por la microbiota cutánea del propio paciente en el caso de que la colocación del material conlleve un acto quirúrgico. Otro posible origen es la contaminación ambiental del dispositivo durante la cirugía. Infecciones por contigüidad o por diseminación hematógena constituyen otras causas[1]. Por tanto, queda reflejado que la etiología de las infecciones asociadas al uso de implantes abarca un gran número de microorganismos: aquellos que forman parte de la microbiota cutánea (*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* fundamentalmente), así como microbiota intestinal, orofaríngea o vaginal por contigüidad. En otras palabras, las infecciones en las que la formación de un biofilm está implicado (como son las infecciones asociadas al uso de implantes) pueden ser polimicrobianas[6]. En infecciones tempranas el agente causal suele ser *S.aureus* o BGN, mientras que las tardías se suelen asociar con bacterias menos virulentas como ECN[5].

3.1 Cuadros clínicos de infecciones asociadas al uso de implantes

3.1.1 Infección de prótesis articular

Se sospecha de IP cuando se cumple al menos uno de los criterios que Osmon y cols reconocen[7]:

- Presencia de fístula que comunique con la prótesis.
- Evidencia de inflamación aguda observada mediante examinación histopatológica del tejido periprotésico.
- Presencia de pus macroscópico alrededor del implante.
- Dos o más cultivos positivos de muestras de alta calidad (líquido sinovial, tejido periprotésico, hemocultivos).
- Dolor agudo o crónico en ausencia de un problema mecánico y al menos un parámetro analítico alterado (Velocidad de Sedimentación Globular, Proteína C Reactiva o recuento celular sinovial).

La IP se puede clasificar atendiendo a varios criterios:

a) Según el origen de la infección. Las posibles fuentes son aquellas descritas por Zimmerli y cols[8]:

- Durante el propio acto quirúrgico mediante la inoculación del microorganismo en la herida quirúrgica o inmediatamente después de la cirugía.
- Infección adquirida por contigüidad desde un foco cercano de infección o una infección de la herida quirúrgica por microorganismos que penetran cuando un traumatismo compromete la barrera de la piel.
- Diseminación hematógena desde un foco lejano de infección a través de la sangre.

Introducción

- b) En función de la localización, la infección puede afectar a las siguientes prótesis:
- Total de cadera.
 - Parcial de cadera.
 - Rodilla.
 - Hombro.
 - Codo.
- c) En función del momento de aparición con respecto a la cirugía y sintomatología, la clasificación más aceptada es la sugerida por los autores Tande y cols[6] y Tsukayama[9]:
- Aguda: aparece antes del mes 1 o 3 según los autores. Es muy sintomática.
 - Crónica: aparece entre el mes 1 o 3 y el mes 12 o 24. Es muy poco sintomática.
 - Hematógena: a diferencia de las anteriores, no está relacionada con la cirugía, sino con la diseminación a través de sangre de microorganismos hasta el implante, el cual colonizan. Es muy sintomática pero aparece entre el mes 6 o 12 y 24, por lo que es considerada una infección aguda de comienzo tardío.

Ilustración 1. Ejemplo de modelo de prótesis total cadera (izquierda) y parcial de cadera (derecha)[10].

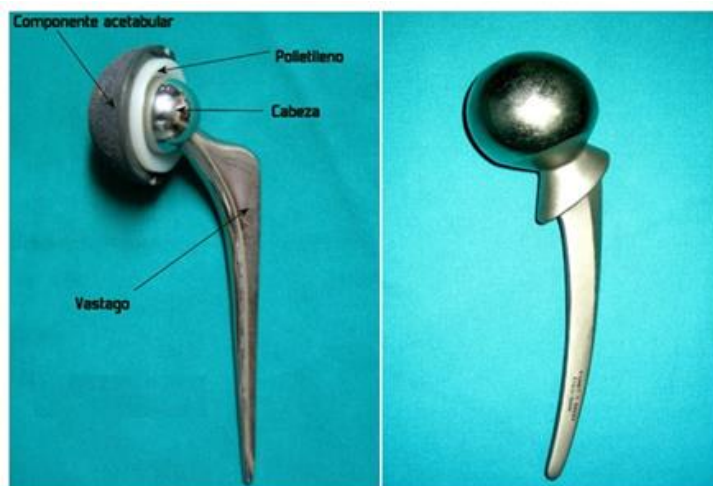


Ilustración 2. Ejemplo de modelo de prótesis de rodilla[11].



El tratamiento de la IP puede ser antimicrobiano o quirúrgico con retirada de la prótesis. El objetivo de todo procedimiento quirúrgico en este sentido es retirar el tejido infectado o disminuir la carga del biofilm en caso de que la prótesis no se retire. Las principales estrategias quirúrgicas son las siguientes[6, 12]:

- Desbridamiento, antibióticos, irrigación y retención del implante (DAIR). Consiste en una cirugía de irrigación y limpieza de material necrótico, tejido infectado, hematomas o pus alrededor de la prótesis, así como retirada de los componentes móviles de la prótesis (habitualmente polietileno). Tras la cirugía, el paciente recibe tratamiento antimicrobiano intravenoso durante 2-6 semanas (4-6 si no se usa la rifampicina) seguido de tratamiento oral hasta completar una duración total de 6 meses (en rodilla) o 3 meses (en el resto de prótesis). Las muestras tomadas durante la cirugía se cultivan, por lo que el tratamiento antimicrobiano se ajusta al perfil de sensibilidad del microorganismo aislado, o se da un tratamiento empírico en caso de que los cultivos sean negativos.

Introducción

- Recambio en un tiempo. Tras un desbridamiento, se retira la prótesis (y espaciadores en caso de que los hubiera) y se implanta una nueva, todo en el mismo acto quirúrgico. El esquema de terapia antimicrobiana es el mismo que en el caso anterior.
- Recambio en dos tiempos. Considerada la mejor alternativa para erradicar la infección y conservar la funcionalidad de la articulación, implica dos actos quirúrgicos. En el primero, se procede al desbridamiento tisular (con recogida de muestras), retirada de la prótesis infectada y colocación de un espaciador generalmente cargado con antibiótico. Tras esta primera cirugía, el paciente recibe terapia antimicrobiana intravenosa durante 4-6 semanas, seguido de un período de 2-6 semanas sin fármacos. La implantación de la nueva prótesis ocurre en otro acto quirúrgico diferente.

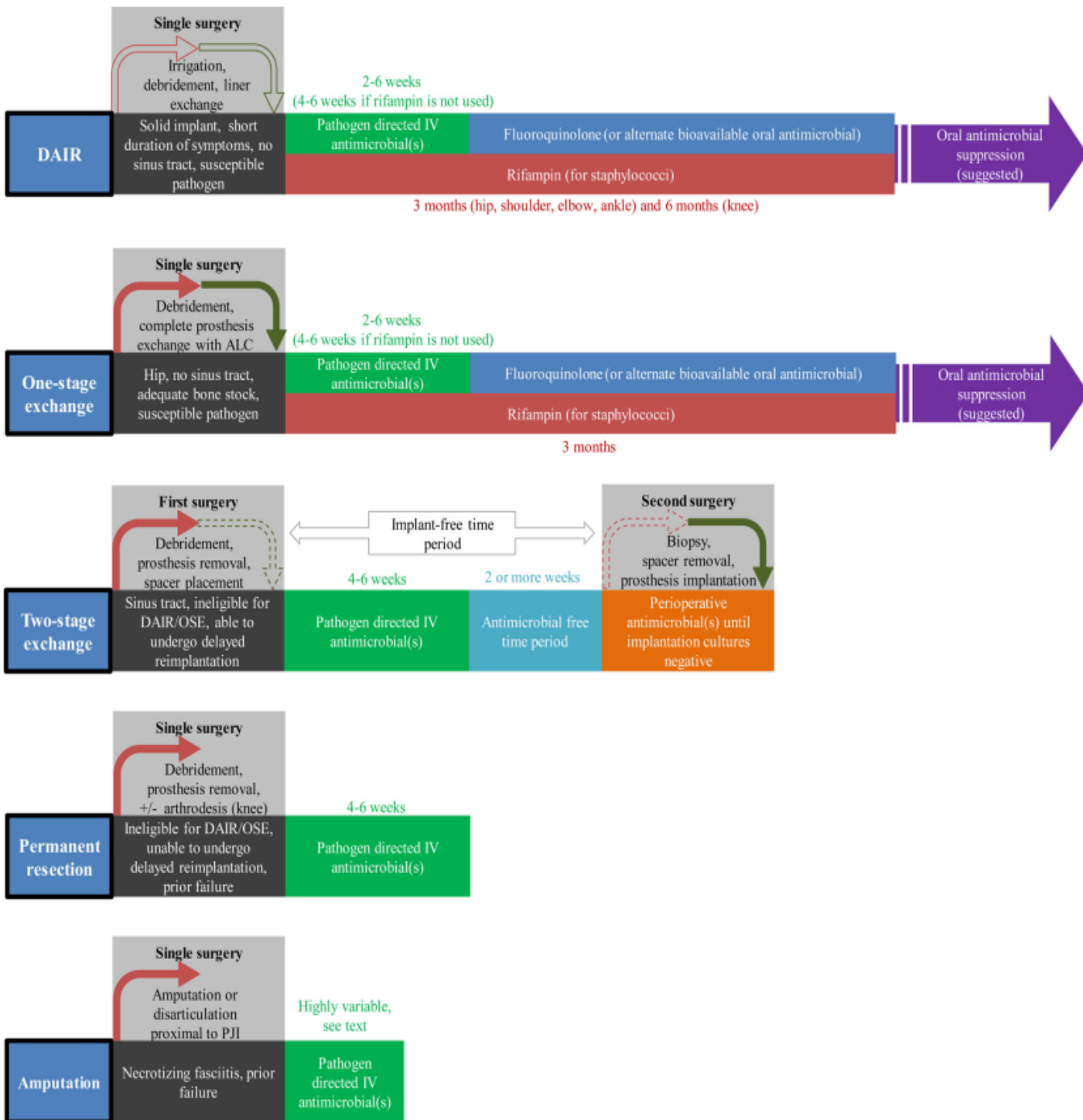
Los espaciadores colocados en el recambio en dos tiempos tienen dos funciones principales. La primera, proporcionar soporte mecánico, manteniendo la posición adecuada de la articulación y evitando contracturas musculares. Y la segunda es proporcionar terapia antimicrobiana local cuando van cargados con antibióticos (generalmente, vancomicina y/o un aminoglucósido).

- Artroplastia de resección (sin reimplantación). Se considera la última alternativa para evitar una amputación en pacientes con fracaso antimicrobiano o aquellos que no pueden o no quieren ser sometidos a una nueva cirugía. Consiste en la retirada total de la articulación, lo cual imposibilita su movilidad. La artroplastia total de cadera se conoce como técnica de Girdlestone[13].

Muchos médicos sugieren llevar a cabo una terapia oral supresora crónica tras la terapia antimicrobiana del DAIR o del recambio en un tiempo. Una vez finalizada la terapia antibiótica, el riesgo de fracaso aumenta considerablemente, especialmente durante los

primeros 4 meses tras el fin del antibiótico. Proporcionar una terapia supresora oral parece contribuir a la resolución del proceso por terminar de erradicar el biofilm. La situación ideal para prescribir esta terapia supresora crónica es que el microorganismo sea susceptible a un antibiótico oral bien tolerado, que el paciente no tenga dolor y que el implante permanezca estable. Sin embargo, este esquema debe considerarse sólo como última opción, debiendo plantearse sólo en situaciones en las que el resto de esquemas han fracasado o son imposibles de aplicar.

Ilustración 3. Estrategias médicas y quirúrgicas para el manejo de la IP[6].



En la IP aguda, los microorganismos se encuentran fundamentalmente en estado planctónico, mientras que en la IP crónica y hematógena se hallan formando un biofilm sobre la superficie del material[6, 14]. Es importante conocer de antemano los principales agentes etiológicos de la IP para dirigir la terapia antimicrobiana empírica, ya que los pacientes que reciben una adecuada terapia antes de disponer de los datos del laboratorio tienen menos probabilidad de fracaso[15]. Los agentes etiológicos de la infección aguda suelen ser microorganismos altamente virulentos (*Staphylococcus aureus*, BGN, anaerobios), mientras que las infecciones crónicas están causadas habitualmente por microorganismos menos virulentos (ECN, *Propionibacterium* spp, enterococos). Las infecciones hematógenas suelen ser debidas a *Staphylococcus aureus*, BGN o estreptococos β hemolíticos[16]. Aunque *S. aureus* es la principal causa de IP, en los últimos años ha habido un aumento considerable de la proporción de BGN como agentes etiológicos, siendo un porcentaje no despreciable de estos últimos multi-resistentes[17].

3.1.2 Infecciones asociadas al uso de drenajes abdominales

Los drenajes abdominales son dispositivos biomédicos colocados abdominalmente tras una cirugía a ese nivel (hepática, biliar, pancreática, intestinal, etc.), con el fin de favorecer la salida del líquido y evitar su acumulación, así como detectar sangrado y fuga anastomática postoperatorios[18]. A pesar de que existe una gran controversia acerca de si el uso de estos dispositivos conlleva más perjuicios que beneficios (tales como dolor, hemorragias, inflamación, migración retrógrada bacteriana, etc.),[19] se siguen utilizando en la práctica quirúrgica[20-22]. Una de esas complicaciones es la aparición de infección[23, 24]. De hecho, su uso está considerado un factor de riesgo para el desarrollo de infección del sitio quirúrgico[25].

Los drenajes pueden clasificarse en dos grupos según la forma de drenar que tengan[26]:

Introducción

- Pasivos o abiertos. Funcionan gracias a la gravedad. No extraen el líquido sino que permiten que este salga libremente por rebosamiento. Favorecen por tanto un flujo bidireccional, lo cual conlleva riesgo de infección.
- Activos o cerrados. Conectados a un dispositivo de aspiración que extrae el líquido. La evacuación del líquido es más eficaz y el riesgo de infección menor.

Dentro de estos se incluyen:

- Jackson Pratt: drenaje liso plano en el inicio y circular al final, multiperforado, de silicona. El sistema de vacío al que está conectado es tipo pera.
- Redon: drenaje redondo, rígido, multiperforado, de cloruro de polivinilo (PVC). Conectado a un frasco estéril al que previamente se le ha hecho el vacío.
- Blake: drenaje redondo de silicona que en su luz cuenta con 4 canales conectados por la parte central, lo cual evita que se colapse.

Ilustración 4. Drenaje Blake (imagen izquierda superior), Jackson Pratt (izquierda inferior) y Redon (derecha).



La definición universalmente aceptada de infección del sitio quirúrgico es la propuesta por el CDC (Centers for Disease Control and Prevention de EEUU).[19] Esta definición es compleja ya que tiene en cuenta varios factores[19, 27]:

- Tipo de procedimiento quirúrgico.
- Referencia temporal.
- Referencia anatómica: superficial, profunda y de órgano espacio.
- Criterios diagnósticos: clínicos, microbiológicos o criterio personal del sanitario que atiende al enfermo.

Las heridas quirúrgicas se pueden clasificar en cuatro clases, atendiendo al riesgo de infección de la cirugía[19, 27]:

- Clase I: limpia. Intervención realizada bajo condiciones de esterilidad en la que la incisión atraviesa la piel sana y no afecta a las mucosas ni a la cavidad orofaríngea. No hay signos de inflamación. Riesgo de infección bajo (1-5%).
- Clase II: limpia-contaminada. Hay apertura del tracto respiratorio, gastrointestinal o genitourinario pero de manera controlada y sin demasiado grado de contaminación. Riesgo de infección medio (5-15%).
- Clase III: contaminada. Intervención sobre una herida traumática reciente, incisión sobre tejido inflamado no infectado, derramamiento importante del contenido del tracto gastrointestinal en el campo operatorio, violación de la esterilidad o incisión sobre un tejido con inflamación aguda no purulenta. Riesgo de infección medio (5-15%).
- Clase IV: sucia-contaminada. Herida que acompaña a una infección clínica (pus) o a la perforación de una víscera; o herida traumática de más de 6 horas de evolución. Riesgo de infección alto (hasta 40%).

En este caso, cabe esperar que los principales agentes etiológicos sean microorganismos de la microbiota cutánea y de la microbiota intestinal.

3.1.3 Otras infecciones asociadas al uso de implantes

Además de las anteriormente descritas, existen otros dispositivos cuyo uso puede ocasionar infección, siendo algunos de ellos de gran relevancia a nivel epidemiológico (como catéteres vasculares o sondajes vesicales)[1], si bien no se describen en detalle al no ser objeto de estudio en la presente tesis:

- Dispositivos extravasculares: implantes mamarios, genitales, mallas quirúrgicas, implantes cocleares, neuroestimuladores, válvulas y drenajes del SNC, sondajes vesicales, etc.

Los cuadros clínicos varían desde un leve eritema alrededor de la zona donde se implanta el dispositivo a infección del sitio quirúrgico o cuadros más serios como infección del parénquima cerebral, otitis media, mastoiditis, meningitis etc.

Los agentes etiológicos suelen ser microorganismos de la microbiota cutánea ya que estos dispositivos se encuentran en contacto directo con la piel. Además, microorganismos de las microbiotas saprofitas del lugar donde se inserta el implante pueden causar infección, como *Streptococcus pneumoniae*.

- Dispositivos intravasculares: electroestimuladores cardíacos (marcapasos, desfibriladores, dispositivos de resincronización cardíaca), válvulas cardíacas, catéteres vasculares, etc.

En este caso los cuadros clínicos suelen ser más graves, con bacteriemia y endocarditis, aunque también puede haber síntomas y signos locales.

Los agentes etiológicos suelen ser cocos gram positivos, especialmente *S. aureus* y SCN, y los dispositivos se suelen contaminar durante la implantación del sistema o por vía hematológica.

3.2 Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas al uso de implantes

En las infecciones asociadas al uso de implantes el diagnóstico microbiológico básico consiste en[5]:

- Cultivo de muestras de colecciones y abscesos peri-implante.
- Cultivo de biopsias de tejido.
- Extracción de sangre para hemocultivo, serología o técnicas de PCR.
- Procesamiento del propio implante por sonicación. El líquido obtenido tras sonicación se siembra o se utiliza para llevar a cabo técnicas de PCR.

Como veremos más adelante, el biofilm supone un mecanismo de defensa para el microorganismo (protección frente a antimicrobianos, ante el sistema inmunológico, etc.). Por tanto el primer paso para el tratamiento de las infecciones asociadas al uso de implantes, siempre que fuera posible, sería el reemplazamiento del dispositivo y su procesamiento microbiológico para identificar los microorganismos responsables de la infección, así como llevar a cabo su estudio de sensibilidad antimicrobiana. No obstante, en muchos casos la sustitución del dispositivo es un proceso complejo que conlleva riesgos para el paciente, o tradicionalmente se ha considerado que el procesamiento del implante es de poca utilidad, por lo que el diagnóstico microbiológico debe basarse en el análisis de otras muestras (cultivo de líquido cefalorraquídeo, hemocultivos, líquido articular, etc.).

3.2.1 Diagnóstico microbiológico convencional de las infecciones asociadas al uso de implantes

3.2.1.1 Infección de prótesis articular

El diagnóstico de IP está basado en[6, 12]:

- Hallazgos clínicos (criterios previamente descritos[7]).
- Pruebas de imagen: radiografías, resonancias magnéticas, etc.
- Análisis histológico positivo en tejido periprotésico, observando cualquier hallazgo de inflamación aguda.
- Examen de sangre periférica: principalmente aumento de Velocidad de Sedimentación Globular y Proteína C Reactiva.
- Análisis del líquido articular: principalmente aumento del porcentaje de polimorfonucleares y prueba positiva de la esterasa leucocitaria.
- Análisis microbiológicos.

Dentro del diagnóstico microbiológico de la IP, este ha estado tradicionalmente basado en el cultivo del líquido articular y de biopsias de tejido periprotésico.

El líquido articular obtenido por artrocentesis, en un inicio era cultivado directamente en medios de cultivo habituales e incubado en atmósferas de aerobiosis o anaerobiosis. Sin embargo, para mejorar su baja sensibilidad debida a la pequeña cantidad de microorganismos presentes y/o presencia de inhibidores como antibióticos tomados previamente por el paciente, los líquidos articulares se inoculan actualmente en frascos de hemocultivos, siendo mayor el porcentaje de pacientes diagnosticados.[28]

Las muestras de tejido periprotésico tomadas durante la cirugía representan actualmente el *gold standar* según muchas guías y revisiones para el diagnóstico de IP[7, 29, 30]. Se

recomienda recoger entre 3 y 6 muestras de biopsia peri-implante y procesarlas por separado para comparar el resultado de cada una de ellas. Cuando, según los criterios de Atkins y cols[31], el mismo microorganismo se aísla en 3 o más muestras, se considera el agente etiológico de la infección. Al recoger varias muestras se aumenta igualmente la sensibilidad ya que la cantidad de microorganismos que puede haber en cada biopsia es pequeña. De hecho, cuando el microbio que se aísla es un patógeno muy probable (*Staphylococcus aureus*, estreptococos β hemolíticos, EB o BGNNF), debería tenerse en cuenta aunque se aislara en un número bajo de muestras o en un recuento bajo, o si ese mismo microorganismo se aislase en otras muestras como líquido sinovial o líquido de sonicación de la prótesis[6, 16].

Por otro lado, tal y como recomendó Schafer y cols[32], actualmente los medios de cultivo del tejido periprotésico se reincuban hasta 14 días para permitir el crecimiento y aislamiento de algunos microorganismos de crecimiento lento causantes de infección crónica (fundamentalmente *Propionibacterium acnes* pero también BGN aerobios y *Peptostreptococcus* spp.), si bien existe cierta controversia de acuerdo con algunos resultados[33].

3.2.1.2 Infecciones asociadas al uso de drenajes abdominales

Actualmente la sospecha de infección del sitio quirúrgico asociada al uso de drenajes abdominales se confirma por criterios clínicos (signos y síntomas), o criterios microbiológicos de los fluidos o tejidos circundantes al dispositivo[19]. Pero no hay evidencia científica de que los propios drenajes abdominales (sobre cuya superficie puede desarrollarse un biofilm) se procesen para establecer un diagnóstico microbiológico de la infección del sitio quirúrgico.

3.2.1.3 Otras infecciones asociadas al uso de implantes

En la bacteriemia o fungemia relacionada con el uso de catéteres vasculares, el diagnóstico microbiológico es diferente según se retire o no el dispositivo. El diagnóstico no basado en la retirada del catéter consiste en extraer hemocultivos simultáneamente a través del catéter y a través de venopunción. Los criterios diagnósticos para asumir que el agente causal de la infección es el aislado en el hemocultivo extraído a través del catéter (siempre que el microorganismo sea el mismo que el aislado en el hemocultivo extraído a través de venopunción) son dos: que exista una diferencia entre los tiempos de positivización de los hemocultivos superior a 120 minutos; o que la concentración microbiana sea de 3 a 5 veces superior en el hemocultivo del catéter[3]. El método basado en la retirada del dispositivo consiste en el cultivo semicuantitativo de la punta del catéter mediante la técnica de Maki[34], mediante la cual el segmento del catéter se hace rodar sobre la superficie de una placa de TSS. Cuando el recuento es superior a 15 UFC se asume que ese es el agente etiológico y que el foco de dicha infección es el catéter[3].

En el resto de infecciones asociadas al uso de implantes, el diagnóstico en muchos casos es clínico. Las pruebas de imagen pueden diagnosticar colecciones alrededor del implante (ecografías) y vegetaciones en las válvulas cardíacas (ecocardiogramas). El diagnóstico microbiológico suele estar basado en el análisis de la punción-aspiración de las colecciones, extracción de hemocultivos en casos de sepsis y cultivo de exudados purulentos así como de tejidos peri-implante[5].

3.2.2 Diagnóstico de las infecciones asociadas al uso de implantes basado en la técnica de sonicación

3.2.2.1 Fundamento físico-químico de la sonicación

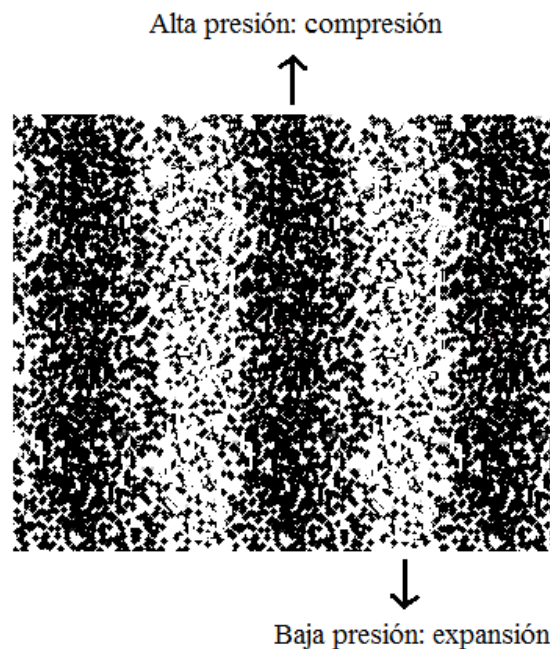
La sonicación como herramienta para el diagnóstico de infecciones asociadas al uso de implantes consiste en el uso de ultrasonidos de alta intensidad para liberar las bacterias que están formando parte de un biofilm sobre la superficie de un material.

Los ultrasonidos son ondas sonoras de presión cuya frecuencia supera los 20 kHz[35]. En el ámbito científico, los ultrasonidos tienen distintas aplicaciones en función de la intensidad y frecuencia con la que se utilicen. Los ultrasonidos de baja intensidad ($< 1 \text{ W/cm}^2$), que normalmente se usan a alta frecuencia ($>100 \text{ kHz}$), generan niveles bajos de energía[36] que no altera el material, es decir, es un tratamiento no destructivo, por lo que se han utilizado en la industria alimentaria para la monitorización no invasiva de procesos alimenticios así como una técnica analítica para determinar las propiedades físico-químicas de los alimentos[37]. Los ultrasonidos de alta intensidad ($>2 \text{ W/cm}^2$), utilizados generalmente a baja frecuencia (20-100 kHz), liberan una gran cantidad de energía[36] generando alteraciones y provocando reacciones químicas en el material al cual son aplicados[37]. Estos últimos se han utilizado tradicionalmente para limpiar superficies sólidas así como eliminar bacterias de ellas[35, 38-40]. El mecanismo mediante el cual eliminan la suciedad y las partículas es el mismo por el cual son capaces de arrancar las bacterias que forman parte de un biofilm sobre la superficie de un material, y está relacionado con eventos cavitacionales[35]. Aunque estos fenómenos se generen tanto con ultrasonidos de alta intensidad como de baja intensidad[36], los efectos son más notables con los ultrasonidos de alta intensidad ya que se libera mayor cantidad de energía.

Introducción

La vibración de las moléculas ocasionada por la propagación de las ondas de ultrasonidos en un medio líquido genera zonas de alta y baja presión. Las zonas de alta presión se generan durante la fase de compresión del medio, mientras que las de baja presión se producen durante la fase de expansión[35] (también llamada rarefacción[37]). Es decir, que en la fase de compresión existe una alta densidad molecular, mientras que en la fase de expansión la densidad molecular disminuye.

Ilustración 5. Compresión y expansión de un fluido por la propagación de ondas de ultrasonidos.



Se llama cavitación acústica al proceso de formación, crecimiento y colapso de microburbujas de gas generadas por cambios en la presión de un líquido[36]. Esas burbujas se generan en zonas de baja presión[6] y están en constante contracción y expansión debido a los ciclos de alta y baja presión respectivamente[35].

Una vez formada la burbuja, esta crece inicialmente de tamaño debido a un proceso conocido como difusión rectificadora[41] por el cual entra más vapor durante la fase de expansión que el que se puede liberar durante la fase de compresión. Las burbujas se expanden y contraen constantemente generando flujos alrededor de ellas.

Existen dos tipos de cavitación:

- Cavitación estable. Se llama así a la cavitación que ocurre a intensidades bajas. Las burbujas se expanden y contraen pero la intensidad no es lo suficientemente alta como para que colapse durante la compresión[35].
- Cavitación inestable. La intensidad de los ultrasonidos es lo suficientemente alta como para que la burbuja colapse tras pocos ciclos[35, 42].

3.2.2.2 Efectos de la sonicación sobre los microorganismos

Los efectos que la cavitación acústica tiene sobre los microorganismos son variados.

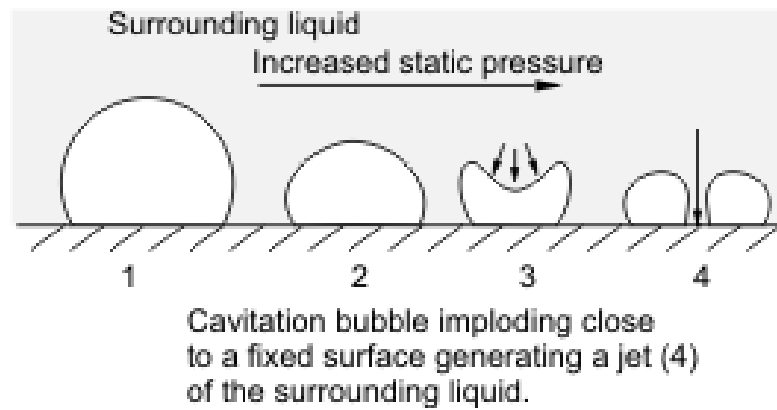
Durante la cavitación estable, aquella en la que la burbuja no colapsa, los flujos generados alrededor de las burbujas durante las fases de expansión y compresión, resultan en fuerzas de cizallamiento sobre las bacterias, que provocan su rotación[43].

Durante la cavitación inestable, el colapso de las burbujas genera una onda de choque que libera una gran cantidad de energía[44]. Además se genera un área de alta temperatura y presión llamada “hot spot”[42] durante la compresión adiabática de la burbuja. El aumento de temperatura conlleva un aumento en la energía cinética de las moléculas, es decir, aumenta la velocidad de choque de unas moléculas contra otras, lo cual supone que las moléculas de agua se rompan y se generen radicales libres, como radicales hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) que posteriormente se transforman en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) contribuyendo a la inactivación de la bacteria debido a su efecto biocida[45]. La alta temperatura generada en el hot spot se reparte por todo el sistema, produciendo un leve aumento de la temperatura del medio que puede debilitar la membrana bacteriana[37]. La cavitación inestable también genera efectos mecánicos como las fuerzas de cizallamiento, ocasionadas por flujos a gran velocidad perpendiculares a la superficie al colapsar una

Introducción

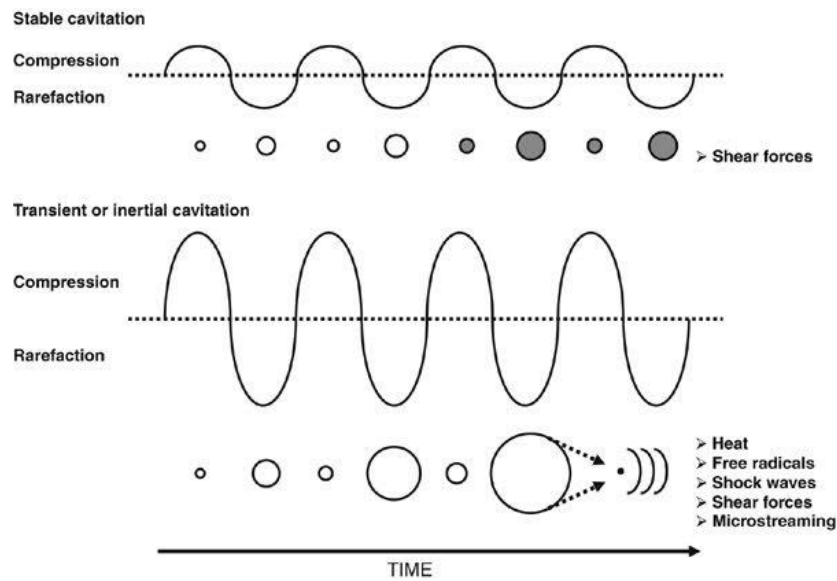
burbuja cerca de ella[46], y micro-flujos generados cuando una burbuja colapsa de forma no esférica o no simétrica cerca de una superficie[35].

Ilustración 6. Generación de micro-flujos durante el proceso de cavitación acústica[47].



Ambos efectos mecánicos son capaces de arrancar partículas y microorganismos de la superficie por alterar las interacciones establecidas entre las células y la matriz exopolisacáridica con la superficie, así como dañar las membranas celulares de los mismos[35, 43, 48-50].

En el siguiente esquema se representa gráficamente la expansión y compresión de las burbujas durante la cavitación, así como los efectos que este proceso tiene.

Ilustración 7. Tipos de cavitación y sus consecuencias[51].

Resumiendo, el efecto que los ultrasonidos (especialmente los de alta intensidad) tienen sobre los microorganismos que se encuentren en una superficie es doble: por un lado los elimina de dichas superficies y por otro altera sus estructuras celulares, lisándolas[52-54].

Por el contrario, Pitt y cols sostienen que el efecto que los ultrasonidos a bajas intensidades y frecuencias ejercen sobre los microorganismos de un biofilm es el favorecimiento de su crecimiento, por aumentar el transporte de oxígeno y nutrientes a las células[35]. No obstante, no se dispone en la actualidad de más bibliografía que apoye esta conclusión.

Someter los biomateriales sobre cuya superficie se ha formado un biofilm al proceso de vortear, también contribuye a liberar los microorganismos de dicho biofilm ya que los efectos físicos que produce son la generación de microburbujas y fuerzas de cizallamiento[55]. Este es el motivo por el cual numerosos protocolos incluyen el paso por el vórtex antes de la sonicación, para aumentar la formación de microburbujas de aire.

3.2.2.3 Baño de sonicación

En la práctica clínica se utiliza un equipo de baño de sonicación para el diagnóstico de infecciones asociadas al uso de implantes. El diseño de este sistema es sencillo y consta de las siguientes partes[56]:

- Generador de ultrasonidos. Está fijado a la base de un baño lleno de líquido (generalmente agua estéril destilada).
- Tanque de sonicación. Es el recipiente lleno de agua a través de la cual los ultrasonidos son transmitidos y en el que se introduce el material a sonicar.
- Recipiente de sonicación. Es el contenedor estéril en el que se incluye el implante que se va a sonicar.
- Tampón de sonicación. Es un tampón estéril que rellena el recipiente de sonicación, al cual las bacterias son liberadas tras el proceso de sonicación.

Ilustración 8. Esquema de un sistema de sonicación para el diagnóstico de infecciones asociadas al uso de implantes[56].

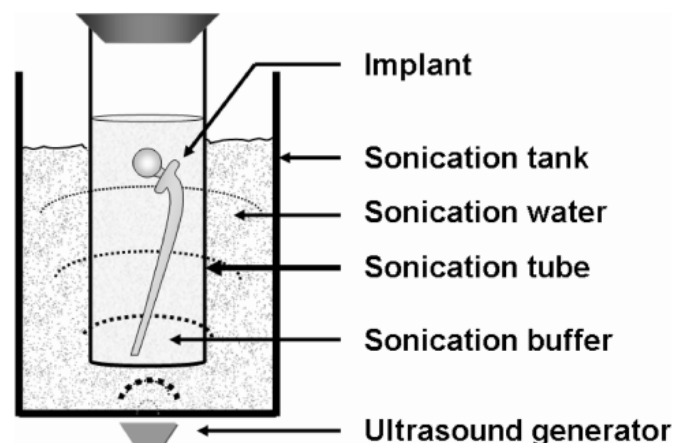


Ilustración 9. Baño de sonicación usado en el IIS-FJD.



La mayoría de los baños de sonicación cuentan con un regulador de temperatura así como del tiempo que durará el proceso. Es importante que estos dos factores externos se controlen ya que afectan al proceso de liberación de bacterias desde un material durante la sonicación. Además, la composición del material del que esté hecho el recipiente en el cual se introduce el implante así como el tipo de microorganismo que sufra los efectos de los ultrasonidos, también influyen en su mayor o menor liberación[56].

3.2.2.4 Diagnóstico de IP basado en sonicación

Tunney y cols fueron los primeros en utilizar el uso de ultrasonidos para liberar las bacterias que estaban formando un biofilm sobre la superficie de prótesis de cadera extraídas de pacientes con sospecha de IP[57]. Una década más tarde, Trampuz y cols evaluaron el uso de esta técnica para el diagnóstico de esta infección, demostrando que la sonicación es un método útil para ese fin, en comparación con el diagnóstico convencional[55]. Desde ese momento, muchos han sido los trabajos experimentales que han corroborado que el cultivo del líquido obtenido tras sonicación de la prótesis es

Introducción

indudablemente una técnica que ha aumentado el porcentaje de enfermos diagnosticados de IP (sensibilidad cercana al 80%) manteniendo una especificidad bastante elevada (entorno al 95%), como así lo recogen los meta-análisis de Zhai y cols[58] y Liu y cols[59]. En nuestro centro de trabajo IIS-FJD, varios trabajos experimentales realizados así lo demuestran también[33]. Sin embargo, la mayor parte todos estos estudios publicados tienen un tamaño muestral pequeño, y sobre todo son trabajos que se llevan a cabo antes de incorporarse a la rutina asistencial, en la que las condiciones de trabajo pueden verse afectadas por varios factores (variabilidad interindividual de todo el personal que participa en el proceso, condiciones de conservación de la muestra, etc.), y por tanto los resultados asistenciales pueden diferir a los obtenidos en los ensayos experimentales.

Por otra parte, el cultivo del líquido de sonicación del espaciador ha demostrado ser de utilidad para predecir el pronóstico de la infección asociada al uso de espaciadores[60-62].

3.2.2.5 Diagnóstico de otras infecciones asociadas al uso de implantes basado en la sonicación del dispositivo

En la mayoría de infecciones asociadas al uso de implantes (aparte de la IP) no está demasiado estudiada la utilidad de la sonicación del dispositivo para el diagnóstico de esas infecciones (como el caso de la infección asociada al uso de drenajes abdominales, prótesis mamarias, prótesis vaginales, etc.)[5], pero podría ser una herramienta útil ya que la sonicación es una técnica que fácilmente libera los microorganismos de un biofilm. No obstante, en cualquier caso es necesario ser rigurosos a la hora de interpretar los resultados obtenidos en el cultivo tras sonicación del implante, especialmente en aquellas infecciones cuyos dispositivos no se encuentren en ambientes corporales estériles, tales como mallas quirúrgicas abdominales o implantes vaginales. Además en muchas

ocasiones, los principales agentes etiológicos de las infecciones asociadas al uso de implantes son SCN, microorganismos que forman parte de la microbiota cutánea habitual del ser humano, por lo que los implantes pueden contaminarse durante su retirada, dificultando la distinción entre agente etiológico o contaminante.

Sin embargo, hay casos en los que la sonicación no ofrece ventajas con respecto al procesamiento convencional de la muestra. Por ejemplo, en la infección relacionada con el uso de catéteres vasculares, hay estudios que demuestran que el cultivo tras sonicación de la punta del catéter no es superior al cultivo mediante la técnica de Maki[63, 64].

3.2.3 Diagnóstico de las infecciones asociadas al uso de implantes basado en técnicas de biología molecular

Dentro de las infecciones asociadas al uso de implantes, son de destacar dado el tema de la presente tesis, las técnicas de biología molecular que se han desarrollado en el campo de la IP. Su aplicación al diagnóstico de IP surgió como un intento de aumentar la sensibilidad del diagnóstico microbiológico de esta infección, ya que a pesar de la incorporación del cultivo del líquido obtenido tras sonicación de la prótesis, un porcentaje no despreciable de pacientes permanecía sin diagnosticar[16, 58].

Las PCR para el diagnóstico microbiológico de IP pueden clasificarse atendiendo a varios criterios, el principal, en función de los microorganismos detectados:

- PCR de amplio espectro: basadas en el uso de primers universales para la amplificación del gen 16S rRNA presente en todas las bacterias y posterior comparación con una base de datos[65, 66] Aunque la principal ventaja es que no está limitada a ninguna bacteria en particular, la especificidad no es demasiado alta ya que es capaz de detectar cualquier microorganismo, incluso los

Introducción

procedentes de la manipulación incorrecta por parte del personal, por lo que han de seguirse estrictas normas para evitar la contaminación[67, 68].

- PCR específicas: basadas en el uso de un único primer, permiten identificar únicamente la bacteria objeto de estudio. Aunque la especificidad es mayor, este tipo de PCR no se utilizan tanto para el diagnóstico de IP como las anteriores[69].
- PCR múltiples: utilizan varios primers específicos, uno para cada microorganismo que el kit incluya, permitiendo la detección de todos ellos a la vez y por tanto el diagnóstico de infecciones polimicrobianas.

Además, las PCR pueden ser caseras o comerciales. La principal ventaja de las PCR comerciales, es que al estar el kit proporcionado por el fabricante, se garantiza la reproducibilidad de la técnica en todos los centros de trabajo.

Y por último, las PCR para el diagnóstico microbiológico de IP pueden llevarse a cabo a partir del líquido sinovial, tejido periprotésico o líquido obtenido tras sonicación de la prótesis.

Estas técnicas muestran en términos generales, buena especificidad y variable sensibilidad[6].

Los métodos basados en biología molecular suponen un gran avance para el diagnóstico de este tipo de infección, ya que son múltiples las ventajas aportadas en comparación con el diagnóstico basado en el cultivo. Ofrecen resultados en cuestión de horas sin estar tan influenciados por la toma de antimicrobianos por parte del paciente y son capaces de detectar microorganismos exigentes[67].

3.3 Adherencia microbiana y formación del biofilm sobre la superficie de implantes

Los microorganismos tienen la capacidad de adherirse a cualquier superficie, ya sea natural o sintética, y este es el primer paso para la formación de un biofilm sobre la superficie de un implante[70]. De acuerdo a la teoría de “la carrera por la superficie” de Gristina A[2], se establece una competición entre la integración por parte de células tisulares y las bacterianas por alcanzar la superficie. Si esa superficie es alcanzada en primer lugar por las bacterias, ocurre un complejo proceso de adherencia bacteriana y posterior formación del biofilm. En los ambientes acuosos, las sustancias orgánicas se acumulan cerca de las superficies, por lo que no es de extrañar que, en estos medios, los microorganismos tiendan a agregarse en esas zonas por ser ricas en nutrientes[71, 72].

3.3.1 Adherencia microbiana

La adherencia microbiana se divide en dos fases: una fase inicial, instantánea, reversible y en la que predominan las fuerzas físico-químicas; y una segunda fase celular, molecular tiempo dependiente e irreversible[73].

La primera fase comienza con la atracción de los microorganismos en estado planctónico hacia la superficie, seguido de adsorción y adherencia a ella. Las bacterias se mueven hacia la superficie del material por las fuerzas físico-químicas que se establecen: movimiento browniano, fuerzas de Van der Waals, gravitacionales, electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. Además, las bacterias se pueden mover por gradiente de concentración (quimiotaxis) o estableciendo uniones a la superficie mediante factores químicos como aminoácidos, azúcares u oligopéptidos (haptotaxis)[73, 74].

Introducción

En la segunda fase de la adherencia bacteriana, tiempo dependiente e irreversible, se establecen interacciones celulares y moleculares, tanto entre componentes de la superficie bacteriana con los del material, como entre las propias bacterias entre sí. Cápsulas, fimbrias, flagelos, pilis y matriz extracelular son las que permiten esas interacciones. De hecho, la parte funcional de esas estructuras son las adhesinas[73].

Algunos ejemplos son las adhesinas de *S.aureus*. Las MSCRAMM (Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules) son componentes del peptidoglicano expuestos en la superficie de la bacteria que reconocen componentes específicos de la matriz extracelular. Aunque no se encuentran únicamente en *S. aureus*, las de esta especie son las más conocidas. Su función, aunque no está totalmente clara, puede ser una de las siguientes: actuar como invasinas facilitando el proceso de internalización dentro de la célula huésped, o mediar la acumulación bacteriana celular contribuyendo a la formación del biofilm[75]. Otros ejemplos son adhesinas polisacáridicas de *S. epidermidis*: PS/A (un polisacárido capsular rico en galactosa); SSA (antígeno asociado a la matriz compuesto por N-acetil glucosamina); PIA (polisacárido de N-acetil glucosamina con residuos desacetilados) and APP (proteína de acumulación asociada). Las dos primeras participan en la interacción de la bacteria con el material, mientras que las dos últimas establecen interacciones entre las células del microorganismo[74]. En gram negativos también existen adhesinas que participan en el proceso de formación del mismo; por ejemplo, una variedad de CUP (Chaperone Usher Pili) que son pilis ensamblados por una chaperona periplásmica y una proteína que forma un poro llamada acomodadora (*usher* en inglés), están presentes en EB, *Acinetobacter* sp, *Haemophilus influenzae*, etc. Otro grupo de adhesinas excretadas por el sistema de excreción tipo I (TISS) llamadas genéricamente Bap (proteínas asociadas al biofilm), también están implicadas en la formación del biofilm en gram negativos; algunos

ejemplos son Lap A y Lap F (Large Adhesion Protein) presentes en algunas especies de *Pseudomonas*[76].

Tras esta dos fases, las bacterias que no se han adherido rápidamente a la superficie del implante son eliminadas por el sistema inmune del huésped[73]. Sin embargo, las que sí han conseguido adherirse comienzan a proliferar y formar el biofilm.

Varios factores afectan a este proceso de adherencia bacteriana[73, 74]:

- Dependientes de la propia bacteria: hidrofobicidad y carga superficial.
- Dependientes del material: composición química, carga superficial, hidrofobicidad, rugosidad y configuración física de la superficie.
- Dependientes del medio que las rodea: temperatura, tiempo de exposición, presencia de antibiótico, concentración bacteriana y condiciones de flujo.
- La presencia de determinadas proteínas unidas al material, a la bacteria o presentes en el medio, también influyen en este proceso.

Las bacterias hidrofóbicas tienden a adherirse a superficies hidrofóbicas, mientras que las bacterias con propiedades hidrofílicas lo hacen a superficies hidrofílicas[77]. Sin embargo, la hidrofobicidad del material parece tener más peso en la adherencia bacteriana que la hidrofobicidad de la bacteria[74]. La carga superficial bacteriana suele ser casi siempre negativa en suspensión acuosa debido a la ionización de las moléculas superficiales, pero no queda totalmente claro su influencia sobre el proceso de adherencia[74]. Tanto la hidrofobicidad bacteriana como la carga superficial bacteriana están influenciadas a su vez por el medio de cultivo, el pH y fuerza iónica del tampón del medio, la edad bacteriana y la estructura superficial bacteriana[73, 74].

Introducción

Las características del medio que rodea a los microorganismos también influyen en el proceso de adherencia. Algunos trabajos concluyen que la adherencia bacteriana aumenta con la temperatura[73], mientras que en otros se establece que la adherencia bacteriana es mayor a temperatura ambiente[56]. La adherencia bacteriana aumenta también con el tiempo[78, 79] y la concentración microbiana. La presencia de antibióticos en el medio disminuye la adherencia bacteriana[80], para lo cual evidentemente, el antibiótico debe tener efecto sobre el microorganismo. Sin embargo, las condiciones de flujo representan el principal factor ambiental que condiciona el proceso de adherencia bacteriana y por tanto la formación del biofilm[81]. Los microorganismos establecen interacciones con el material sobre el que se adhieren, y para romper dichas uniones es necesario aplicar una fuerza determinada. Con lo cual, cuando se alcanza dicha fuerza, mayor número de uniones se rompen, por lo que disminuye el número de bacterias adheridas[74].

Además, otros factores ambientales como el pH o la fuerza iónica del medio pueden afectar a la adherencia bacteriana a través de su influencia en la hidrofobicidad y carga superficial[74].

La presencia de proteínas séricas o tisulares también influye en el proceso de adherencia bacteriana. Esas proteínas pueden favorecer o disminuir la adherencia bacteriana a la superficie del material. Diversos estudios, la mayoría llevados a cabo sobre especies de *Staphylococcus*, han demostrado que algunas de esas proteínas, como fibronectina [82, 83], fibrinógeno[84] y trombina[85] favorecen la adherencia bacteriana, mientras que otras proteínas como albúmina[84] inhiben este proceso.

Puesto que las características de la bacteria no pueden ser modificadas, se pueden hacer variaciones en la fabricación del implante para disminuir la adherencia bacteriana y

posterior formación del biofilm[86], así como regular los factores externos, como tiempo de exposición o temperatura.

Los factores dependientes del material que influyen en la adherencia bacteriana son la composición química, la rugosidad y la configuración física de la superficie. La propia composición química a su vez establece que cada microorganismo se adhiere mejor a un tipo determinado de material, dependiendo de la hidrofobicidad y a la carga superficial del material. Las irregularidades en las superficies poliméricas favorecen la adherencia bacteriana y posterior formación de biofilm[87], debido a que las irregularidades aumentan el área sobre las que los microorganismos pueden adherirse. En cuanto a la configuración física de la superficie, la presencia de poros influye en la adherencia bacteriana, de tal forma que las bacterias tienden a adherirse y colonizar preferiblemente superficies porosas y con surcos en lugar de las lisas[87]. Estas irregularidades han de ser del orden de tamaño del microbio para aumentar así el área de contacto entre la bacteria y la superficie del material. Los materiales con poros muy grandes se asemejan a superficies lisas, y los demasiados pequeños ofrecen un área de contacto muy pequeño, por lo que la adherencia se ve reducida[88].

3.3.2 Formación del biofilm

Una vez que las bacterias se han adherido y han colonizado la superficie, comienzan a multiplicarse rápidamente y a agruparse formando una capa de varios sustratos sobre la superficie del material[74], así como a fabricar una matriz extracelular exopolisacáridica y compuesta también por ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, minerales, nutrientes, etc. que las mantiene unidas entre sí y a la superficie[89, 90]. Los biofilms son comunidades complejas y organizadas de microorganismos embebidos en la matriz extracelular sobre superficies sólidas vivas o muertas[91, 92]. Esta estructuración microbiana, en parte es

Introducción

debida a la aparición de gradientes fisiológicos y bioquímicos determinados por la disponibilidad de oxígeno, agua y nutrientes, y que se establecen desde la superficie hasta las capas más internas, lo cual explica en gran medida que los microorganismos que forman parte del biofilm tengan distintas tasas de crecimiento[3, 93].

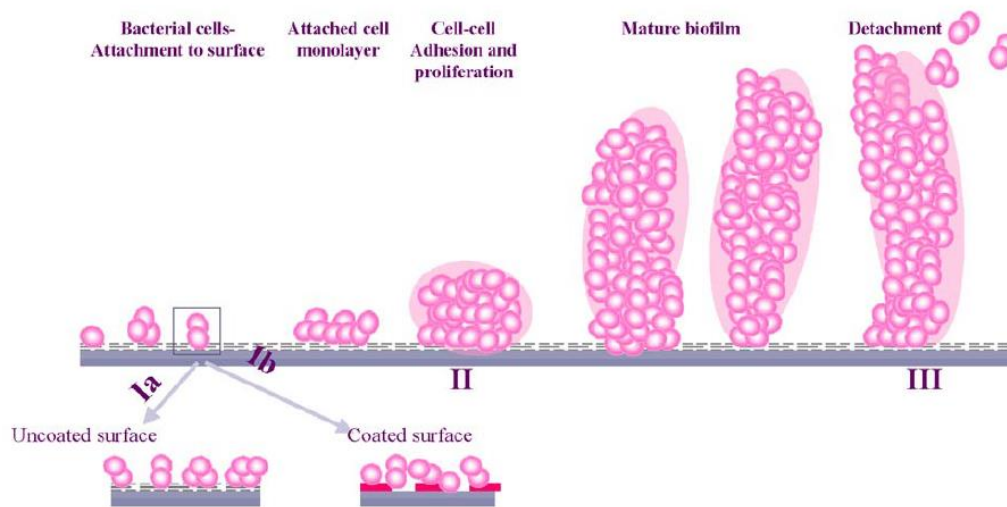
En el biofilm las bacterias pueden encontrarse en dos estados: formas sésiles, que forman parte del biofilm y están pegadas a la superficie del material; y formas planctónicas, que flotan libres por el medio[90, 94]. Sin embargo, las células sésiles pueden convertirse en células planctónicas, las cuales pueden dispersarse y multiplicarse rápidamente[94].

El proceso de formación del biofilm ocurre en 4 etapas[6, 94]:

- Adhesión inicial de las células microbianas a la superficie del biomaterial.
- Crecimiento inicial en la superficie formándose las capas.
- Maduración del biofilm.
- Desprendimiento y dispersión de las células planctónicas desde el biofilm.

A partir de este punto, un nuevo ciclo sobre otra superficie diferente puede tener lugar.

Ilustración 10. Modelo esquemático de las fases y los factores bacterianos implicados en la formación del biofilm en *S. epidermidis*[74].



3.3.3 Biofilm como mecanismo de patogenicidad

El biofilm podría considerarse un mecanismo de patogenicidad, ya que gracias a él, los microorganismos obtienen varios beneficios.

En el biofilm las bacterias están protegidas frente al aclaramiento mecánico, así como frente a cualquier agente externo que suponga una amenaza para ellos: agentes antimicrobianos, biocidas, bacteriófagos, leucocitos, etc.[3, 90, 93]. Un claro ejemplo lo constituye su defensa frente al sistema inmune del hospedador. Los anticuerpos formados como respuesta a la liberación de antígenos, no sólo no son efectivos frente a las bacterias del biofilm, sino que además pueden formar inmunocomplejos que dañen los tejidos circundantes[94, 95].

Por otro lado, su resistencia a agentes antimicrobianos tiene una gran importancia y repercusión a la hora de tratar farmacológicamente las infecciones relacionadas con la

Introducción

formación del biofilm. Las bacterias en estado planctónico son susceptibles a ellos, mientras que las bacterias sésiles son mucho más resistentes, (más de 100-1000 veces)[3, 93, 94]. Una de las posibles razones es un mecanismo de tolerancia física ya que el fármaco tiene dificultades para penetrar y atravesar completamente el biofilm, debido a que los componentes de la matriz retardan su difusión. Otra posible explicación está relacionada con un mecanismo de resistencia adaptativa, en el que las bacterias del biofilm pueden desarrollar respuestas de estrés que generarían enzimas destructoras de los antimicrobianos o bombas de expulsión del fármaco. Y por último, en el biofilm la entrada de nutrientes está limitada, por lo que las bacterias permanecen en un estado de crecimiento lento, el cual es menos susceptible a la acción de los agentes antimicrobianos (tolerancia fisiológica)[1, 3, 93, 94, 96]. Probablemente la resistencia se deba a una suma de todos los anteriores factores, e incluso de algún otro todavía no bien conocido.

Ilustración 11. Mecanismos implicados en la resistencia del biofilm a antimicrobianos[96].

TRANSLATIONAL MEDICINE

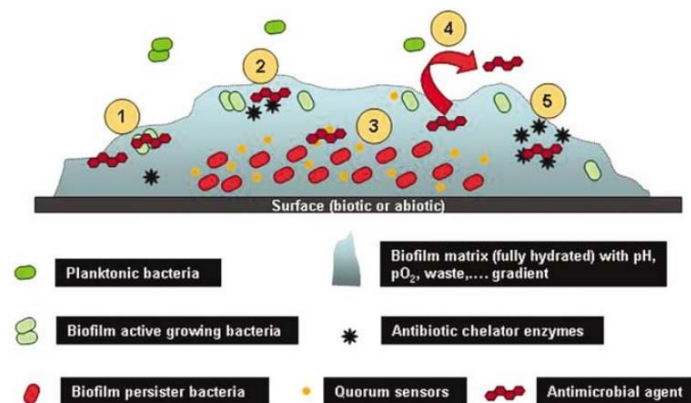


Figure 2 Some proposed-biofilm associated resistance mechanisms: (1) Antimicrobial agents may fail to penetrate beyond the surface layers of the biofilm. Outer layers of biofilm cells absorb damage. Antimicrobial agents action may be impaired in areas of waste accumulation or altered environment (pH, pCO₂, pO₂, etc). (2) Antimicrobial agents may be trapped and destroyed by enzymes in the biofilm matrix. (3) Altered growth rate inside the biofilm. Antimicrobial agents may not be active against nongrowing microorganisms (persister cells). (4) Expression of biofilm-specific resistance genes (e.g., efflux pumps). (5) Stress response to hostile environmental conditions (e.g., leading to an overexpression of antimicrobial agent-destroying enzymes).

Sin embargo la presencia de alimento, aunque limitada, está garantizada en parte por la matriz exopolisacarídica multiperforada con canales de agua que actúa como una resina

de intercambio iónico, favoreciendo la recogida y acumulación de nutrientes y minerales desde el medio que rodea al biofilm, y la eliminación de sustancias de desecho desde el interior del biofilm[1, 2, 71, 97].

La manera mediante la cual los microorganismos orquestan todos estos mecanismos de patogenicidad en el biofilm maduro, es un sistema de regulación llamado *quorum sensing*[6, 98], que permite la comunicación entre unas células bacterianas y otras.

4 HIPÓTESIS

Se establecen dos hipótesis principales:

1. Los tiempos de exposición a ultrasonidos de baja frecuencia y alta intensidad influyen en la viabilidad bacteriana, por lo que sería necesario ajustarlos para conseguir una alta tasa de recuperación de bacterias viables de los implantes sobre cuya superficie se ha formado un biofilm.
2. La sonicación de implantes es una herramienta especialmente útil en el diagnóstico de infecciones asociadas al uso de implantes.
 - a. En la IP la sonicación de las prótesis articulares aumenta la sensibilidad respecto a otros métodos diagnósticos, manteniendo la especificidad, ya sea por la realización de una técnica de biología molecular a partir del líquido de sonicación, o por el cultivo directo de dicho líquido.
 - b. En la infección asociada al uso de espaciadores, la sonicación de estos dispositivos no sólo proporciona información útil sobre el pronóstico de la infección, sino también acerca del diagnóstico.
 - c. En infecciones para las cuales no existe un diagnóstico microbiológico (infección del sitio quirúrgico por utilización de tubos de drenaje abdominales), la sonicación de las muestras representa un método novedoso de diagnóstico, sensible y específico, así como un marcador en el pronóstico de las mismas.

5 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar la utilidad de la técnica de sonicación para el diagnóstico microbiológico de infecciones asociadas al uso de implantes. Para ello, en algunos casos se comparará con técnicas utilizadas en la rutina asistencial, mientras que en otros casos al carecer de ellas, se comparará únicamente con los criterios clínicos de infección.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar en un estudio *in vitro* el tiempo óptimo de exposición a ultrasonidos para la recuperación del mayor número posible de diferentes tipos de bacterias a partir de un material de titanio en el que se encuentran formando parte de un biofilm.
2. Analizar la eficacia del cultivo cuantitativo de prótesis articulares tras sonicación de las mismas para el diagnóstico de IP, y compararlo con el cultivo de tejido periprotésico y líquido sinovial durante la rutina asistencial.
3. Analizar la utilidad del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de espaciadores para el diagnóstico, manejo y pronóstico de la infección articular asociada al uso de estos dispositivos, mediante una correlación entre el resultado del cultivo y criterios clínicos de infección.
4. Evaluar la eficacia de una nueva PCR múltiple (Unyvero i60 ITI®) recién comercializada para su incorporación como método diagnóstico de IP en la rutina asistencial, llevada a cabo a partir del sonicado de la prótesis articular, mediante su comparación con el cultivo cuantitativo del sonicado de la prótesis, líquido articular y biopsias sinoviales.
5. Determinar si la técnica de sonicación ofrece alguna ventaja en el diagnóstico microbiológico y/o pronóstico de infecciones asociadas al uso de drenajes

Objetivos

abdominales, mediante una correlación entre parámetros microbiológicos y clínicos o analíticos, ya que en la actualidad no existe un diagnóstico microbiológico basado en el uso del implante para este tipo de infección.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Estudio *in vitro* de la influencia del tiempo de sonicación de discos de Ti6Al4V en la liberación de bacterias desde el biofilm formado sobre la superficie del material

En el estudio *in vitro* llevado a cabo para evaluar el tiempo de exposición a ultrasonidos en la liberación de bacterias desde un biofilm, se utilizaron 5 cepas colección que representan patógenos implicados en infecciones asociadas al uso de implantes: *Staphylococcus aureus* 15981 (Valle y cols[99]), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Estas bacterias se mantuvieron a -70°C hasta que se realizaron los experimentos. Se utilizaron discos de Ti6Al4V sin modificación de la superficie, de 18 mm de diámetro y 2 mm de grosor[100].

Ilustración 12. Discos de Ti6Al4V utilizados en el estudio *in vitro*.



Para la reproducción de la formación del biofilm, las cepas una se inocularon en placas de TSS y se incubaron durante 24 horas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Dos colonias de cada cepa se suspendieron en 9 mL de caldo triptosa soja (TSB, bioMérieux Marcy-L'Etoile, France) y nuevamente se incubaron otras 24 horas en las mismas condiciones, para obtener una suspensión a partir de la cual poder preparar el inóculo necesario de

Material y métodos

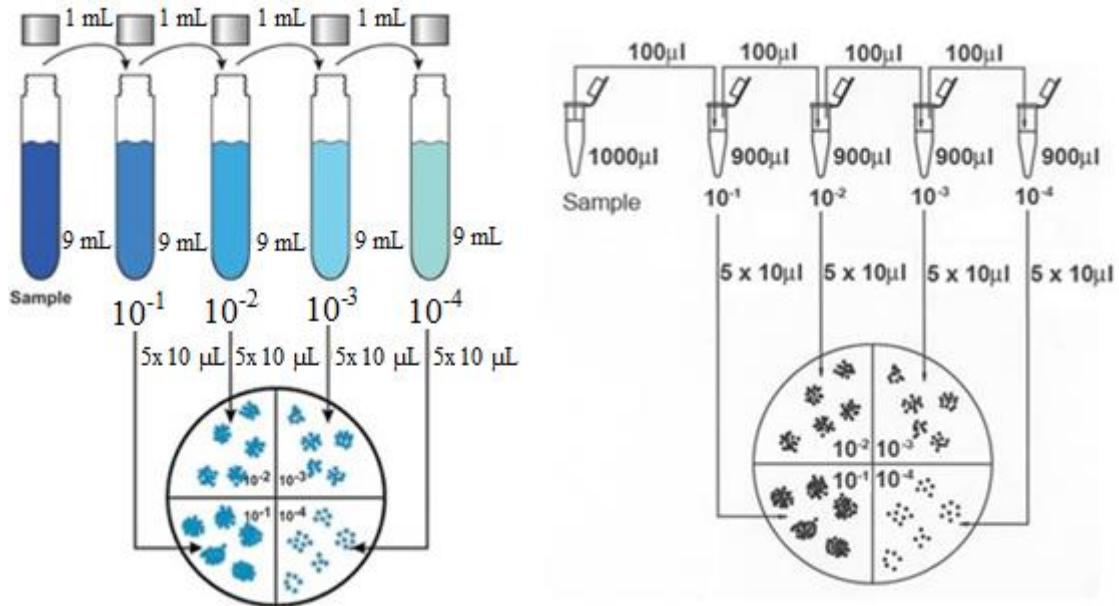
cada bacteria. Pasado ese tiempo, el caldo se centrifugó a 3500 x g durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 1 mL de PBS. El proceso de centrifugado se realizó 3 veces en total. El sedimento final se utilizó para preparar un inóculo bacteriano 0,5 McF (10^8 UFC/mL) medido con un turbidímetro. Los discos de Ti6Al4V se dispusieron en placas mini-Petri, se cubrieron con 10 mL del inóculo 0,5 McF y se incubaron 24 horas en las mismas condiciones. Posteriormente, el caldo de cultivo se desechó y los discos se lavaron 3 veces con PBS para eliminar las bacterias en estado planctónico. A continuación, se introdujeron en tubos Falcon cubiertos con 5 mL de PBS y se sonicaron desde 1 minuto a 10 minutos, con aumentos progresivos de un minuto. El baño de sonicación utilizado fue un sonicador de baja frecuencia: 50 KHz, 950W, J. P.Selecta, Abrera, España.

Tras la sonicación, los discos se retiraron y reciclaron para su uso posterior. Para ello, los materiales se sonicaron en PBS durante 15 minutos, se limpiaron con etanol al 70% y se autoclavaron a 121°C durante 15 minutos, seguido del secado de los mismos durante otros 15 minutos. Por su parte, el líquido de sonicación se sometió a 7 diluciones seriadas 1:10 en un volumen final de 1 mL. Para ello, 100 µL de esta primera suspensión se transfirieron a un segundo eppendorf que contenía 900 µL de PBS. A continuación, otros 100 µL de la segunda suspensión se volvieron a transferir a otro eppendorf que contenía otros 900 µL de PBS. Y así sucesivamente hasta llegar a la dilución número 7. Para cada minuto y cada bacteria, los experimentos se repitieron por triplicado.

La siembra se realizó mediante la metodología del Drop-plate[101] en un volumen final de 1 mL. Cinco gotas (de 10 µL cada una) de cada dilución, se inocularon en placas de TSS. En cada placa, se efectuó la siembra de 4 diluciones diferentes, cada una en un cuadrante de la placa. Estas se incubaron durante 24 horas a 37°C en atmósfera de 5% CO₂.

A continuación se representa un esquema de cómo se llevan a cabo las diluciones seriadas y la siembra por el método del drop plate, tanto por el modo estándar (volumen final 10 mL), como por el modo alternativo (volumen final 1 mL)[102].

Ilustración 13. Diluciones seriadas y siembra drop plate por el método estándar (10 mL) y el alternativo (1 mL)[103].



Se calculó la media del recuento de las 5 gotas para cada dilución, y la media de las 3 repeticiones. La dilución que se tuvo en cuenta fue aquella en la que crecían de 3 a 30 colonias[101] (por cada 10 µL sembrados). El recuento total está referido a UFC presentes en los 5 mL del líquido de sonicación.

6.2 Estudio retrospectivo de comparación del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular con el cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y el cultivo del tejido periprotésico para el diagnóstico de IP

Este estudio destinado a comparar el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular con el cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y el cultivo del tejido periprotésico durante la rutina asistencial, se llevó a cabo entre enero de 2011 y junio de 2014.

Los pacientes incluidos en este estudio eran aquellos con sospecha clínica de IP a los que se les había retirado la prótesis articular. En la mayor parte de ellos, además se disponía de muestras de líquido articular inoculado en frascos de hemocultivo, así como de tejido periprotésico. La sospecha clínica de IP estaba basada en los criterios de Osmon y cols previamente vistos[7]. Por tanto los pacientes se clasificaron en dos grupos: aquellos con criterios clínicos de IP, y aquellos sin dichos criterios, considerados como grupo control.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético del IIS-FJD. Se revisaron las historias clínicas de los pacientes utilizando un protocolo predefinido que reunía:

- Datos demográficos:
 - Edad.
 - Sexo.
- Datos microbiológicos:
 - Positividad o negatividad del cultivo.
 - Recuento y microorganismo/s aislado/s.
 - Sensibilidad antimicrobiana.

- Tipo de prótesis
 - Total de cadera.
 - Parcial de cadera.
 - Rodilla.
 - Hombro.

- Datos clínicos:
 - Tipo de infección: IP aguda, crónica o hematológica.
 - Tipo de cirugía: recambio en un tiempo, recambio en dos tiempos, recambio de componentes móviles o artroplastia de Girdlestone.
 - Tipo de tratamiento antibiótico previo y posterior a la cirugía: vía de administración, posología y familia de antibiótico.
 - Parámetros analíticos: leucocitos, plaquetas, hematíes, hemoglobina y RFA.
 - Evolución del paciente.

El protocolo seguido para el procesamiento de las prótesis fue el establecido previamente en el IIS-FJD[33, 104] y que se describe a continuación.

Hasta la llegada al laboratorio de Microbiología, las muestras se mantuvieron a 4°C, pero siempre fueron procesadas antes de las 24 horas desde su retirada. En una cabina de seguridad microbiológica, las prótesis articulares se introdujeron en contenedores estériles rígidos de plástico, se cubrieron por completo con el volumen de PBS necesario y se cerraron. Se sonicaron durante 5 minutos en el mismo sonicador que el estudio *in vitro* (50 KHz, 950W, J. P.Selecta, Abrera, España).

En algunos casos, durante la retirada de la prótesis, los cirujanos la separaron en sus diferentes componentes, considerándose muestras diferentes y sonicándose cada parte por

Material y métodos

separado (proceso denominado sonicación diferencial). Sin embargo, en la mayoría de los casos, las prótesis no se separaron en sus componentes y se procesaron como una única muestra.

Tras la sonicación, las prótesis se retiraron del recipiente, y el líquido de sonicación se centrifugó a 3000 x g durante 20 minutos, El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 5 mL de PBS. Tras vortear, se procedió a la siembra cuantitativa mediante la inoculación de 10 µL en diferentes medios de cultivo bacteriológicos: TSS, PVX, SCS y MCK; y micológicos: agar Sabouraud Cloranfenicol y agar Sabouraud Cloranfenicol Actidiona (todos los medios de cultivo de bioMérieux Marcy-L'Etoile, France). Las placas se incubaron a 37° C durante 7 días en las siguientes condiciones: 5% CO₂ (TSS Y PVX), atmósfera normal de O₂ (MCK), y atmósfera de anaerobiosis (SCS). Los medios para hongos se incubaron en atmósfera normal a 30° C.

Los medios de cultivo se revisaron a diario para comprobar el crecimiento de los microorganismos, y el resultado se expresó cuantitativamente en UFC/mL, salvo el crecimiento en Sabouraud Cloranfenicol y agar Sabouraud Cloranfenicol Actidiona, que se expresó como escaso, moderado o abundante.

El recuento total se calculó para los 5 mL de líquido de sonicación de prótesis articulares.

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{UFC \text{ en la placa}}{10 \mu L} \cdot \frac{1000 \mu L}{1 mL}$$

$$UFC \text{ total} = \frac{UFC}{mL} \cdot x \text{ mL}, \quad \text{donde } x = 5$$

Todos los microorganismos aislados por cultivo se identificaron mediante el sistema MALDI-TOF (Vitek MS®, bioMérieux Marcy-L'Etoile, France). El estudio de sensibilidad antimicrobiana se llevó a cabo mediante el sistema Vitek 2® (bioMérieux).

Además en la mayoría de los casos, de 3 a 6 muestras de tejido periprotésico, y/o líquido sinovial inoculado en frascos de hemocultivo del mismo paciente, fueron enviadas para su procesamiento. En el caso de las muestras de tejido peri-implante, las placas en las que se sembraron fueron las mismas que aquellas en las que se sembró la prótesis articular, pero añadiendo cultivo de micobacterias.

6.3 Estudio prospectivo de evaluación de la utilidad del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación del espaciador para el diagnóstico de infecciones asociadas a espaciadores

El estudio para evaluar la utilidad del cultivo cuantitativo de espaciadores de polimetilmetracilato (PMMA) tras sonicación para el diagnóstico de infección asociada al uso de estos dispositivos, se llevó a cabo entre octubre de 2010 y diciembre de 2013.

Los pacientes incluidos en este estudio fueron los diagnosticados de IP[7] y tratados con una cirugía de recambio protésico en dos tiempos. Durante el tratamiento, los pacientes fueron prospectivamente evaluados utilizando un protocolo predefinido que incluía el parámetro de Proteína C Reactiva, un registro de los síntomas clínicos, y su evolución. Definimos una infección asociada al uso de espaciadores cuando el paciente reunía al menos, uno de los siguientes criterios:

- Fístula o dehiscencia de la herida en el momento de la segunda cirugía.
- Dolor persistente alrededor de la articulación asociado con elevación de la Proteína C Reactiva.
- Tejido con apariencia clínica de infección durante la cirugía, de acuerdo al criterio del cirujano.

El protocolo seguido para el procesamiento de los espaciadores fue exactamente el mismo que para las prótesis articulares salvo por los cambios que se especifican a continuación:

- Las muestras se cubrieron con 100-500 ml de PBS.
- Las placas se reincubaron durante 15 días.

- Los microorganismos aislados se identificaron durante 2010 y 2011 mediante tests bioquímicos convencionales, y durante 2011-2013 mediante el sistema MALDI-TOF (Vitek MS®, bioMérieux Marcy-L'Etoile, France).

6.4 Estudio prospectivo de evaluación de la técnica de PCR Unyvero i60 ITI® a partir del líquido de sonicación de prótesis articulares para el diagnóstico microbiológico de IP

El estudio para evaluar la eficacia de una nueva técnica de biología molecular (Unyvero i60 implant and tissue infection (ITI) ® [Curetis AG, Holzgerlingen, Germany]) para el diagnóstico de IP a partir del líquido obtenido tras sonicación de la prótesis se llevó a cabo entre mayo de 2014 y mayo de 2015.

Este estudio tiene características comunes al estudio retrospectivo de comparación del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular con cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y cultivo del tejido periprotésico para el diagnóstico de IP (criterios de inclusión de los pacientes, tipos de prótesis estudiadas, tipos de muestras cultivadas, criterios de infección, etc.) Pero en este caso, de manera experimental y una vez realizado el diagnóstico de la rutina asistencial, se llevó a cabo la técnica de PCR a partir del líquido de sonicación. Normalmente, el test se realizó tras 24-48 horas de la llegada de la prótesis al laboratorio, por lo que en esos casos, el líquido de sonicación se conservó a -20°C. El sistema utilizado fue Unyvero i60 implant and tissue infection (ITI) ® (Curetis AG, Holzgerlingen, Germany), capaz de detectar 27 especies o grupos de microorganismos y 19 genes de resistencia a antimicrobianos.

Tabla 1. Microorganismos y mecanismos de resistencia detectados por el sistema Unyvero i60 ITI®.**MICROORGANISMOS**

Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
 Coagulase-negative *Staphylococcus*¹
Streptococcus mitis group²
Streptococcus anginosus group³
Streptococcus salivarius group⁴
Streptococcus agalactiae
*Streptococcus pyogenes*⁵
Enterococcus faecalis
*Enterococcus sp.*⁶
Propionibacterium acnes
Propionibacterium avidum/granulosum
Fingoldia magna
Bacteroides fragilis group¹⁰
Granulicatella adjacens
Abiotrophia defectiva
*Corynebacterium sp.*⁷
Escherichia coli
Enterobacter cloacae complex
Enterobacter aerogenes
*Proteus sp.*⁸
*Klebsiella pneumoniae*⁹
Pseudomonas aeruginosa
Acinetobacter baumannii
*Candida sp.*¹¹
Candida parapsilosis
Candida albicans

GENES DE RESISTENCIA

mecA
mecC (LGA251)
aac(6')/aph(2'')
ermA
ermC
vanA
vanB
rpoB
oxa-58
ctx-M
vim
imp
kpc
ndm
aacA4
gyrA
oxa-23
oxa-24
oxa-48

- 1: Incluye: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. hominis*.
 2: Incluye: *S. mitis*, *S. australis*, *S. cristatus*, *S. gordonii*, *S. infantis*, *S. oligofermentans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. parvulus*, *S. pseudopneumoniae*, *S. sanguinis*, *S. sinensis*.
 3: Incluye: *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius*
 4: Incluye: *S. salivarius*, *S. vestibularis*, *S. termophilus*
 5: Incluye *S. pyogenes*, *S. dysgalactiae* subsp. *Equisimilis*
 6: Incluye: *E. casseliflavus*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. faecalis*, *E. sulfurens*, *E. saccharolyticus*, *E. mundii*, *E. gallinarum*, *E. flavescens*, *E. durans*, *E. dispar*, *E. columbae*, *E. cecorum*, *E. asini*
 7: Incluye: *C. genitalium*, *C. casei*, *C. striatum*, *C. jeikeium*, *C. aurimucosum*, *C. singularis*, *C. simulans*, *C. accolens*, *C. amycolatum*, *C. minutissimum*, *C. macginleyi*, *C. auriscanis*
 8: Incluye: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri*
 9: Incluye: *K. pneumoniae* subsp. *Ozenae*
 10: Incluye: *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*
 11: Incluye: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. dublinensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*.

Material y métodos

El protocolo se detalla a continuación. Se transfirieron 180 μ L del líquido obtenido tras sonicación de la prótesis articular a un eppendorf y la muestra fue sometida a lisis durante 30 minutos. Tras ese período el eppendorf se colocó junto con el vial de la Master mix (que incluía la DNA polimerasa termoestable, los 4 dNTPs, $MgCl_2$ y el tampón de reacción), en un cartucho que contenía las sondas específicas de cada uno de los microorganismos incluidos en el kit. El cartucho cargado se introdujo en el dispositivo para su amplificación e hibridación. El tiempo total de duración de esta técnica fue de 4,5 horas, período tras el cual, los resultados tanto de los microorganismos identificados como de los genes de resistencia detectados aparecieron en la pantalla táctil del sistema. Esta técnica incluía un control interno para comprobar la validez de cada resultado.

6.5 Estudio prospectivo de evaluación del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de drenajes abdominales para el diagnóstico de infección del sitio quirúrgico

El estudio de evaluación de la sonicación de tubos de drenaje abdominales para el diagnóstico microbiológico de infección del sitio quirúrgico se llevó a cabo entre marzo y junio de 2013. Se retiraron los tubos de drenaje abdominales de pacientes sometidos a cirugías abdominales en el IIS-FJD, de manera aséptica, en condiciones de estabilidad clínica del paciente, es decir, sin que éste presentase sepsis intra-abdominal post-quirúrgica. Los pacientes se clasificaron en dos grupos: aquellos que reunían criterios clínicos de infección del sitio quirúrgico basados en los criterios de Mangran y cols vistos anteriormente[19], y aquellos sin criterios clínicos de infección, considerados como grupo control.

La parte del drenaje abdominal retirada fue la porción más distal del implante. Los tubos de drenaje estudiados en este caso fueron los activos: Jackson Pratt, Blake y Redon.

Cuando al paciente se le retiraron dos o más drenajes, todos ellos se procesaron microbiológicamente, pero para el cálculo de datos clínicos, epidemiológicos y correlación entre parámetros clínicos y analíticos con microbiológicos sólo se tuvo en cuenta un drenaje por paciente. Para ello se aplicó el siguiente algoritmo:

- En caso de que sólo hubiera un drenaje con cultivo positivo, ese era el que se consideraba.
- Si había dos o más drenajes con cultivo positivo:
 - Se tenía en cuenta aquel en el que se aislara un patógeno potencial.
 - Si en varios cultivos se aisló un patógeno potencial, se consideraba aquel en el que el recuento fuera mayor.

Material y métodos

Este estudio también fue aprobado por el Comité Ético del IIS-FJD. El protocolo predefinido utilizado en este caso reunía los siguientes datos:

- Datos demográficos:
 - Edad.
 - Sexo.
- Día postoperatorio en el que se retiró el implante.
- Datos microbiológicos:
 - Positividad o negatividad del cultivo.
 - Recuento y microorganismo/s aislado/s.
 - Sensibilidad antimicrobiana.
 - Cultivos positivos previos a la retirada del dispositivo.
- Tipo de drenaje:
 - Jackson Pratt.
 - Redon.
 - Blake.
- Datos clínicos:
 - Tipo de cirugía. Además de laparotomía o laparoscopia, se recogió el grado de contaminación de la cirugía.
 - Tipo de tratamiento antibiótico posterior a la cirugía (vía de administración, posología y familia de antibiótico).
 - Parámetros analíticos: leucocitos, plaquetas, hematíes, hemoglobina y RFA.
 - Evolución del paciente, incluyendo complicaciones postquirúrgicas y reintervenciones.

- Enfermedades de base: Diabetes Mellitus, cáncer, enfermedad cardiovascular, hepatitis, enfermedad renal, enfermedad pulmonar, VIH y coagulopatía.
- Aspecto de la herida quirúrgica en el momento de la retirada del implante:
 - Seroso.
 - Serohemático.
 - Purulento.
 - Biliar.

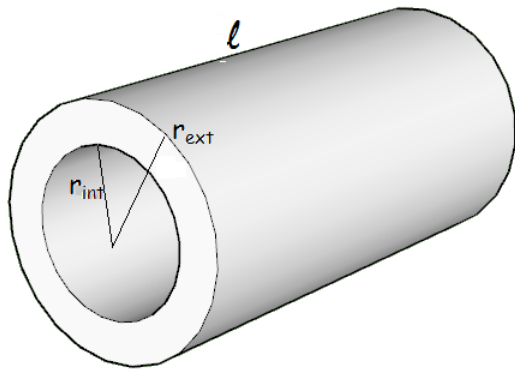
El protocolo seguido para el procesamiento de los tubos de drenaje fue exactamente el mismo que para las prótesis articulares salvo por los cambios que se especifican a continuación:

- Estos dispositivos se cubrieron con 50 mL de PBS.
- El líquido de sonicación se centrifugó a 2500 x g durante 10 minutos.
- El sedimento se resuspendió 1,5 mL de PBS.
- Los medios de cultivo en este caso incluyeron CAN2 (bioMérieux Marcy-L'Etoile, France), en lugar de agar Sabouraud Cloranfenicol y agar Sabouraud Cloranfenicol Actidiona. Estas placas se incubaron en atmósfera normal de O₂.
- El recuento total se calculó en este caso para los 1,5 mL de líquido de sonicación.
- El estudio de sensibilidad antimicrobiana se llevó a cabo mediante el sistema disco placa de acuerdo al EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

Ya que no todos los tubos de drenaje eran iguales en cuanto a longitud, el recuento se ajustó a la superficie (cm²), expresándose por tanto el resultado en $\frac{UFC}{mL \cdot cm^2}$ por lo que tuvieron que tomarse las medidas de longitud y radio en los drenajes de base circular, y longitud, anchura y altura en los drenajes de base rectangular.

Material y métodos

La superficie “útil” de los tubos de drenajes con base circular se calculó en función de la fórmula del área de un cilindro:



$$A_{\text{cilindro}} = 2 \cdot A_{\text{base}} + A_{\text{lateral}} = 2\pi r^2 + 2\pi r l$$

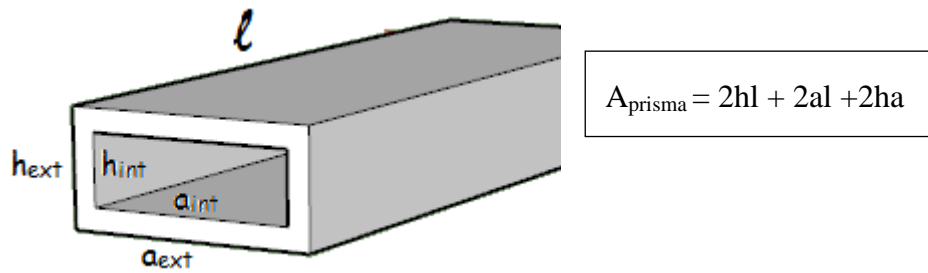
Donde l representa el largo, y r el radio del tubo de drenaje.

Pero al ser el tubo de drenaje hueco, la superficie sobre la cual las bacterias pueden adherirse y formar un biofilm posteriormente, no sólo es la superficie externa sino también la interna. La superficie de la base, sobre la que también puede existir adherencia, estaría representada por la superficie generada por el radio exterior menos la del radio interior.

Con lo cual, la fórmula utilizada para calcular la superficie total de cada tubo de drenaje cilíndrico fue la siguiente:

$$S_{\text{total drenajes circulares}} = 2\pi r_{\text{ext}} l + 2\pi r_{\text{int}} l + 2\pi (r_{\text{ext}}^2 - r_{\text{int}}^2)$$

La superficie “útil” de los tubos de drenajes de base rectangular se calculó en función de la fórmula del área de un prisma cuadrangular:



Donde a es la anchura, h la altura y l el largo.

Pero nuevamente, el drenaje es hueco, así que la superficie total sería la lateral externa, la lateral interna, y la de las bases, que se calcula como la diferencia entre la superficie generada por la exterior y la interior.

La fórmula utilizada por tanto para el cálculo de la superficie “útil” de los tubos de drenaje rectangulares fue la siguiente:

$$S_{\text{total drenajes rectangulares}} = 2h_{\text{ext}}l + 2a_{\text{ext}}l + 2h_{\text{int}}l + 2a_{\text{int}}l + 2(h_{\text{ext}} \cdot a_{\text{ext}} - h_{\text{int}} \cdot a_{\text{int}})$$

En todos los casos hemos despreciado las perforaciones de los tubos de drenaje para el cálculo de la superficie por ser demasiado pequeñas.

Todos los microorganismos aislados por cultivo se identificaron mediante el sistema MALDI-TOF o Vitek MS® (bioMérieux Marcy-L’Etoile, France).

6.6 Estudio estadístico

Se llevó a cabo un estudio descriptivo utilizando diferentes versiones del programa informático Stata. Las variables continuas se expresaron como la media y la desviación estándar en caso de que la población siguiese una distribución normal, o como la mediana y los cuartiles en el caso contrario. Los valores de las variables cualitativas se expresaron como valores absolutos y porcentajes.

Además, mediante el programa informático EPIDAT 3.1, se compararon los parámetros estadísticos de S, E, VPP y VPN de los métodos diagnósticos: cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular, cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos, cultivo del tejido periprotésico, cultivo cuantitativo del líquido de sonicación del espaciador, PCR a partir del líquido de sonicación de la prótesis articular y cultivo cuantitativo del líquido de sonicación del drenaje abdominal. Para calcular dichos parámetros, se tomaron como valores de referencia los criterios de infección clínica, de tal forma que los datos se calcularon utilizando tablas de contingencia 2x2, considerando la positividad o negatividad de los métodos diagnósticos en pacientes con infección. Las sensibilidades se compararon utilizando el test de McNemar de proporciones emparejadas cuando la técnica se llevó a cabo sobre el mismo número de pacientes, y el test de proporciones independientes cuando el número de pacientes sobre el que se realiza la técnica fue diferente. Se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de $p < 0,05$ con un intervalo de confianza del 95%.

Dichas relaciones estadísticamente significativas se buscaron entre datos microbiológicos y datos clínicos o analíticos. Las variables cualitativas se compararon mediante el test exacto de Fisher o prueba de Chi^2 a través de tablas de contingencia 2x2. El test no

paramétrico Mann-Whitney comparó una variable cualitativa y una cuantitativa. Y el coeficiente de correlación de Spearman, 2 variables cuantitativas.

En el estudio *in vitro*, se comparó la liberación media (de los 10 minutos) de todas las bacterias entre sí, así como la liberación en cada minuto de todas las bacterias entre sí, mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

7 RESULTADOS

7.1 Estudio *in vitro* de la influencia del tiempo de sonicación de discos de Ti6Al4Va en la liberación de bacterias desde el biofilm formado sobre la superficie del material

En la siguiente tabla se representan los datos del recuento medio (expresado en UFC) y la desviación estándar, de los 3 experimentos realizados para cada minuto y cada cepa, en los 5 mL de líquido de sonicado.

Tabla 2. Recuento medio y desviación estándar (expresado en UFC) de los 3 experimentos realizados para cada minuto y cepa, calculado en los 5 mL de líquido obtenido tras sonicación de discos de Ti6Al4Va.

Tiempo (min)	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	$4,3 \cdot 10^7 \pm 5,5 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^7 \pm 8,4 \cdot 10^6$	$6,2 \cdot 10^7 \pm 2,8 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^6 \pm 5,0 \cdot 10^5$	$3,8 \cdot 10^6 \pm 1,8 \cdot 10^6$
2	$5,3 \cdot 10^7 \pm 1,6 \cdot 10^7$	$3,3 \cdot 10^7 \pm 5,2 \cdot 10^6$	$6,4 \cdot 10^7 \pm 1,7 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^6 \pm 1,1 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^6 \pm 3,3 \cdot 10^6$
3	$5,4 \cdot 10^7 \pm 7,8 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^7 \pm 9,9 \cdot 10^6$	$7,4 \cdot 10^7 \pm 6,1 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6 \pm 2,5 \cdot 10^6$	$4,6 \cdot 10^6 \pm 1,3 \cdot 10^6$
4	$6,3 \cdot 10^7 \pm 6,2 \cdot 10^6$	$3,6 \cdot 10^7 \pm 2,7 \cdot 10^6$	$8,5 \cdot 10^7 \pm 1,1 \cdot 10^7$	$3,6 \cdot 10^6 \pm 9,5 \cdot 10^5$	$4,7 \cdot 10^6 \pm 2,1 \cdot 10^5$
5	$6,8 \cdot 10^7 \pm 1,1 \cdot 10^7$	$4,8 \cdot 10^7 \pm 2,4 \cdot 10^7$	$9,5 \cdot 10^7 \pm 2,7 \cdot 10^7$	$5,7 \cdot 10^6 \pm 6,2 \cdot 10^5$	$4,9 \cdot 10^6 \pm 1,9 \cdot 10^6$
6	$4,2 \cdot 10^7 \pm 2,2 \cdot 10^7$	$7,6 \cdot 10^7 \pm 2,2 \cdot 10^7$	$8,1 \cdot 10^7 \pm 3,3 \cdot 10^7$	$5,6 \cdot 10^6 \pm 3,2 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^6 \pm 1,9 \cdot 10^6$
7	$7,8 \cdot 10^7 \pm 1,4 \cdot 10^7$	$4,5 \cdot 10^7 \pm 8,7 \cdot 10^6$	$9,7 \cdot 10^7 \pm 1,6 \cdot 10^7$	$6,4 \cdot 10^6 \pm 2,9 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6 \pm 1,4 \cdot 10^6$
8	$6,7 \cdot 10^7 \pm 8,7 \cdot 10^6$	$8,2 \cdot 10^7 \pm 4,1 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^8 \pm 2,7 \cdot 10^7$	$9,4 \cdot 10^6 \pm 1,7 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^6 \pm 6,2 \cdot 10^5$
9	$6,2 \cdot 10^7 \pm 1,3 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^7 \pm 1,5 \cdot 10^7$	$8,3 \cdot 10^7 \pm 2,9 \cdot 10^7$	$9,5 \cdot 10^6 \pm 5,5 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^6 \pm 6,0 \cdot 10^5$
10	$2,6 \cdot 10^7 \pm 5,5 \cdot 10^6$	$7,9 \cdot 10^7 \pm 1,4 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^8 \pm 5,1 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^7 \pm 4,9 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^6 \pm 1,8 \cdot 10^6$

Y a continuación se muestran los datos relativos a la liberación media de cada bacteria durante todo el proceso.

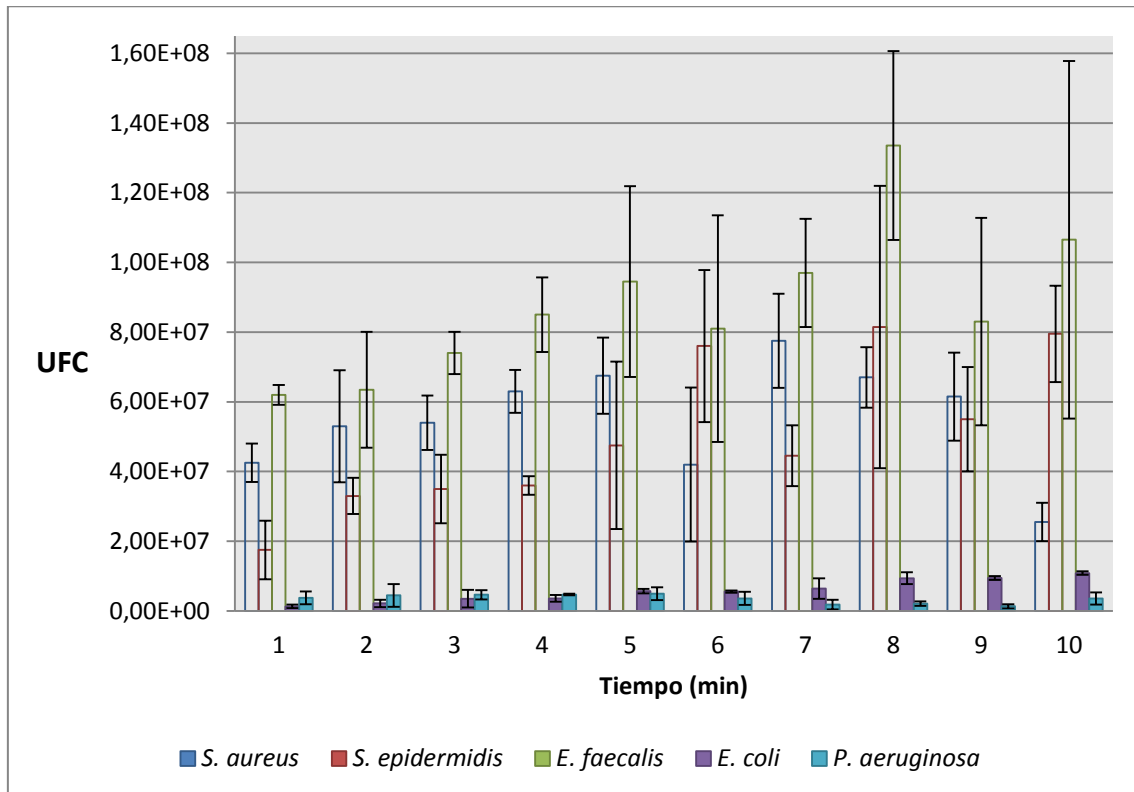
Tabla 3. Liberación media de los 10 minutos de sonicación para cada cepa tras la sonicación de discos de Ti6Al4Va.

Bacteria	Liberación media (UFC)
<i>S. aureus</i>	$5,54 \cdot 10^7$
<i>S. epidermidis</i>	$5,06 \cdot 10^7$
<i>E. faecalis</i>	$8,80 \cdot 10^7$
<i>E. coli</i>	$5,79 \cdot 10^5$
<i>P. aeruginosa</i>	$3,49 \cdot 10^5$

Resultados

En la siguiente gráfica se representa la cantidad total de bacterias en los 5 mL de sonificado respecto al tiempo de exposición a los ultrasonidos para cada una de las cepas.

Ilustración 14. Representación gráfica de la media y desviación estándar de la cantidad total de bacterias (expresadas en UFC) en los 5 mL de líquido obtenido tras sonicación de discos de Ti6Al4Va con respecto al tiempo de sonicación (en minutos) para las 5 cepas estudiadas.



Para todas las bacterias, la cantidad total de microorganismos liberados del biofilm, aumentó progresivamente desde el minuto 1 al minuto 5. Entre el minuto 6 y el 10, la recuperación fue irregular, ya que el pico máximo se obtuvo en períodos de tiempo diferentes en función de la cepa, sin seguir ningún patrón concreto. Por tanto, 5 minutos fue el tiempo de exposición a ultrasonidos en el que se recuperó la mayor cantidad de las 5 cepas en conjunto. Es decir, tiempos de sonicación superiores a 5 minutos en algunos casos consiguieron liberar mayor cantidad de microorganismos, pero en otros casos,

especialmente en gram negativas, la recuperación de bacterias viables fue mucho menor con respecto a los 5 minutos, ya que dichos tiempos consiguieron la lisis celular.

E. faecalis y *S. epidermidis* alcanzaron la liberación máxima en el minuto 8; *S. aureus* en el minuto 7 y *P. aeruginosa* en el minuto 10. *E. coli* fue el único microorganismo cuya liberación aumentó progresivamente a lo largo de los 10 minutos.

En global, la liberación desde los discos de Ti6Al4V de las bacterias gram positivas fue mayor que las de las gram negativas. Durante todo el proceso, *E. faecalis* fue la cepa con mayor recuperación global, mientras que *P. aeruginosa* y *E. coli* las de menor.

De hecho encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar la liberación media (de los 10 minutos) de las 5 bacterias estudiadas ($p < 0,00001$), y también al comparar la liberación de las 5 bacterias en cada minuto estudiado ($p < 0,021$).

7.2 Estudio retrospectivo de comparación del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular con el cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y el cultivo del tejido periprotésico para el diagnóstico de IP

Se estudiaron 276 muestras de 200 pacientes (1,38 muestras/paciente).

De los 200 pacientes, 118 reunían criterios clínicos de IP y 82 no (considerado grupo control). La media de edad fue de 70,9 años (rango de 24-98) y 125 eran mujeres mientras que 75 hombres. El tipo de infección más frecuente fue la crónica (n=63), seguida de la aguda (n=47) y hematógena (n=8).

Los tipos de prótesis articulares retiradas fueron: total de cadera (n=133), rodilla (n=119), hombro (n=16) y parcial de cadera (n=8). De las 276 muestras, 181 correspondían a pacientes con criterios clínicos de IP, mientras que 95 se obtuvieron de pacientes sin IP.

Además del cultivo del líquido de sonicación de la prótesis articular que se llevó a cabo en todos los pacientes, en 171 de ellos también se realizó el cultivo del tejido periprotésico y en 125 el cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos.

Datos de pacientes con IP aguda (n=47)

La media de edad fue de 71,2 años, siendo la mayoría mujeres (n=29). El tipo de prótesis retirada fue: total de cadera (n=25), rodilla (n=14), parcial de cadera (n=6) y hombro (n=2). Los síntomas más frecuentes fueron dolor (n=26) y manchado de la herida quirúrgica (n=22), seguidos de fístula (n=5) y derrame (n=4). Tres pacientes fueron diagnosticados finalmente de luxación y 2 de aflojamiento aséptico. El parámetro

analítico alterado fue el valor de la Proteína C Reactiva, tomado únicamente de 30 pacientes y con una media de 9,8 mg/dL.

El tratamiento recibido por los pacientes se clasificó en tratamiento farmacológico y quirúrgico. Casi la mayoría (n=44) recibieron tratamiento postquirúrgico antimicrobiano para tratar el microorganismo aislado en el cultivo, y sólo 8 lo recibieron antes de la cirugía. En cuanto al tratamiento quirúrgico, 34 pacientes fueron sometidos a cirugía de recambio de componentes móviles, 11 a recambio protésico en un tiempo, 1 de ellos a recambio protésico en dos tiempos con espaciador de vancomicina y gentamicina y otro a artroplastia tipo Girdlestone.

En la siguiente tabla se muestran los resultados del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular en comparación con el cultivo del tejido periprotésico y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos para los pacientes con IP aguda.

Tabla 4. Comparación del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (CLSPA) con el cultivo del tejido periprotésico y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos (CTP/CLAFH) para pacientes con IP aguda (n=47).

Resultado del cultivo	Nº pacientes	Tipo de cultivo	Microorganismos aislados (nº pacientes)
CLSPA + y CTP/CLAFH +	31	Monomicrobiano	<i>S. aureus</i> (14) <i>Klebsiella</i> sp (3) <i>E. cloacae</i> (2) SCN (2) <i>E. coli</i> (1) <i>Morganella morgannii</i> (1) <i>P. mirabilis</i> (1) <i>Providencia stuartii</i> (1) <i>P. aeruginosa</i> (1)
		Polimicrobiano	<i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> y <i>P. mirabilis</i> (1) <i>E. faecalis</i> y <i>P. aeruginosa</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> y <i>S. aureus</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> y <i>P. aeruginosa</i> (1) <i>M. morgannii</i> y <i>P. aeruginosa</i> (1)
CLSPA + y CTP/CLAFH -	5	Monomicrobiano	<i>E. coli</i> (1) <i>E. cloacae</i> (1) <i>Pseudomonas fluorescens</i> (1) <i>Serratia marcescens</i> (1) <i>S. epidermidis</i> (1)
CLSPA - y CTP/CLAFH +	5	Monomicrobiano	<i>P. aeruginosa</i> (1) <i>S. aureus</i> (2) <i>S. epidermidis</i> (2)
CLSPA - y CTP/CLAFH -	6		

Resultados

Cualquier resultado negativo del cultivo del tejido periprotésico y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos de los pacientes que reunían criterios clínicos de IP aguda, se consideraron falsos negativos. Hubo un total de 5 falsos negativos del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular: en 4 casos (2 debidos a *S. epidermidis* y 2 a *S. aureus*) el único cultivo positivo fue el del cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos; el otro caso fue debido a *P. aeruginosa* y el único cultivo positivo fue el del cultivo del tejido periprotésico. En 6 casos, todos los cultivos fueron negativos.

Datos de pacientes con IP crónica (n=63)

En este caso, la media de edad fue de 71,9 años, 33 eran mujeres y los tipos de prótesis extraídas fueron: total de cadera (n=30), rodilla (n=28), hombro (n=4) y parcial de cadera (n=1).

Aquí el principal síntoma fue dolor, presente en 54 de los pacientes, mientras que fístula y derrame fueron síntomas menos frecuentes (n=5 en ambos casos). Únicamente 1 paciente presentó manchado de la herida quirúrgica. Un total de 31 pacientes fueron finalmente diagnosticados de aflojamiento aséptico y 5 de luxación. El parámetro analítico alterado fue, igual que en IP aguda, la Proteína C Reactiva, pero en la IP crónica el valor fue menor (media de 5,4 mg/dL de 13 pacientes).

En este caso 53 pacientes recibieron tratamiento antimicrobiano postquirúrgico, y sólo 7 previo a la cirugía. A diferencia de la IP aguda, en la IP crónica, la medida quirúrgica más practicada fue el recambio en dos tiempos (n=30), seguido del recambio en un tiempo (n=24), y recambio de los componentes móviles (n=9).

A continuación se muestran los resultados del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular en comparación con el cultivo del tejido periprotésico

y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos para los pacientes con IP crónica.

Tabla 5. Comparación del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (CLSPA) con cultivo del tejido periprotésico y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos (CTP/CLAFH) para pacientes con IP crónica (n=63).

Resultado del cultivo	Nº pacientes	Tipo de cultivo	Microorganismos aislados (nº pacientes)
CLSPA + y CTP/CLAFH +	25	Monomicrobiano	<i>S. aureus</i> (8) <i>S. epidermidis</i> (5) SCN* (3) <i>P. acnes</i> (2) <i>E. cloacae</i> (1) <i>E. coli</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (1) <i>P. aeruginosa</i> (1)
		Polimicrobiano	<i>E. faecalis</i> y <i>P. acnes</i> (1) <i>E. faecalis</i> y <i>S. epidermidis</i> (1) <i>P. vulgaris</i> y <i>P. aeruginosa</i> (1)
CLSPA + y CTP/CLAFH -	15	Monomicrobiano	<i>S. epidermidis</i> (3) <i>Acinetobacter</i> sp (2) SCN* (2) <i>P. acnes</i> (2) <i>S. aureus</i> (2) <i>E. coli</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> (1) <i>Ralstonia pickettii</i> (1)
		Polimicrobiano	<i>E. cloacae</i> y <i>P. mirabilis</i> (1)
CLSPA - y CTP/CLAFH +	4	Monomicrobiano	<i>P. acnes</i> (2) <i>Micrococcus luteus</i> (1) <i>P. mirabilis</i> (1)
CLSPA - y CTP/CLAFH -	19		

*Otros SCN diferentes a *S. epidermidis*

Aquí encontramos más falsos negativos del cultivo del tejido periprotésico y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos (n=34) que en IP aguda. En este caso hubo 4 falsos negativos del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular y en 3 de ellos (2 debidos a *P. acnes* y 1 a *M. luteus*), el único cultivo positivo fue el del tejido periprotésico; el otro caso debido a *P. mirabilis*, creció sólo en cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos.

Resultados

Datos de pacientes con IP hematológica (n=8)

Sólo 5 hombres y 3 mujeres presentaron este tipo de infección, siendo la edad media 80,6 años. En 6 casos el tipo de prótesis extraída fue rodilla y en 2 casos total de rodilla. Los síntomas principales fueron dolor (n=7), derrame (n=3) y manchado de la herida quirúrgica (n=1). Dos pacientes fueron diagnosticados de aflojamiento aséptico. La proporción de leucocitos polimorfonucleares fue ligeramente superior y el de linfocitos inferior a los valores de referencia (76,6% y 14,5% respectivamente). El valor de la Proteína C Reactiva se tomó de 6 pacientes con un valor medio de 20,9 mg/dL.

Todos los pacientes recibieron tratamiento antimicrobiano después de la cirugía y sólo 3 antes de ella. El recambio en dos tiempos se practicó en 4 pacientes, el recambio de los componentes móviles en 3, y el recambio en un tiempo en 1.

Debido al bajo número de pacientes que compuso este grupo de infección, no se calcularon parámetros estadísticos ni asociaciones estadísticamente significativas.

Datos de pacientes sin IP (n=82)

Este grupo considerado grupo control, lo conformaron 58 mujeres y 24 hombres con una media de edad de 69,1 años. En 51 casos la prótesis estudiada fue rodilla, en 28 prótesis de cadera y en 3 de hombro.

Hasta 63 pacientes presentaron dolor como síntoma principal, 9 manchado de la herida quirúrgica y sólo 2 derrame. El 50% de ellos fueron diagnosticados de aflojamiento aséptico, 4 pacientes de luxación y 2 de fractura. El valor de la Proteína C Reactiva se tomó de 12 pacientes con una media de 6,7 mg/dL.

Muy pocos pacientes recibieron terapia antimicrobiana, ya fuera antes de la cirugía (n=3), o posteriormente (n=24). El tipo de cirugía más practicada fue el recambio en un tiempo (n=66), seguido de recambio de componentes móviles (n=11) y recambio en dos tiempos (n=5).

Parámetros estadísticos

Se calcularon los parámetros estadísticos de S, E, VPP y VPN del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular, cultivo del tejido periprotésico, cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos, y cultivo del tejido periprotésico y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos para IP aguda, crónica y total. Los datos para calcular estos parámetros, así como los valores finales se detallan en las siguientes tablas.

Tabla 6. Datos para calcular los parámetros estadísticos del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (CLSPA), cultivo del tejido periprotésico (CTP), cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos (CLAFH) y cultivo del tejido periprotésico y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos (CTP/CLAFH) para el diagnóstico microbiológico de IP aguda, crónica y total.

	Muestras de pac con IP aguda	Muestras de pac con IP crónica	Muestras de pac con IP total	Muestras de pac sin IP
CLSPA+	36	40	82	2
CLSPA -	11	23	36	80
Total	47	63	118	82
CTP +	26	26	56	6
CTP -	12	35	50	59
Total	38	61	106	65
CLAFH +	23	13	40	3
CLAFH -	8	21	33	49
Total	31	34	73	52
CTP/CLAFH +	36	29	70	8
CTP/CLAFH -	11	34	48	74
Total	47	63	118	82

Pac: pacientes

Tabla 7. Parámetros estadísticos del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (CLSPA), cultivo del tejido periprotésico (CTP), cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos (CLAFH), y cultivo del tejido periprotésico y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos (CTP/CLAFH) para el diagnóstico microbiológico de IP aguda, crónica y total (expresado en %).

		CLSPA	CTP	CLAFH	CTP/CLAFH
IP Aguda	S	76,6	68,4	74,2	76,6
	E	97,6	90,8	94,2	90,2
	VPP	94,7	81,2	88,4	81,9
	VPN	87,9	83,1	85,9	87,1
IP Crónica	S	63,5	42,7	38,2	46,0
	E	97,6	90,8	94,2	90,2
	VPP	95,2	81,2	81,2	78,4
	VPN	77,7	62,8	70,0	68,5
Infección total	S	69,5	52,8	54,8	60,2
	E	97,6	90,8	94,2	90,2
	VPP	97,6	90,3	93,0	89,8
	VPN	69,0	54,1	59,8	61,2

En todos los tipos de infección, los parámetros estadísticos del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular fueron superiores a los del resto de métodos diagnósticos. Los mejores valores fueron los del E y VPP. Sin embargo, la S y VPN no fueron demasiado altos. Aun así, la S del cultivo del líquido de sonicación de la prótesis articular fue la más alta de todos los métodos diagnósticos para todas las infecciones, seguida de la del cultivo del tejido periprotésico y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las especificidades de los distintos cultivos. Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas al comparar las sensibilidades en IP crónica y total. En IP crónica, la S del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular fue de 63,5% (la mayor de todas), seguida de la del cultivo del tejido periprotésico y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos, que tuvo un valor del 46% ($p=0,0192$), la

del cultivo del tejido periprotésico, que sólo fue de 42,7% ($p=0,0317$) y la del cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos, de 38,2% ($p=0,03$). En la infección total, el cultivo del líquido de sonicación de la prótesis articular fue significativamente más sensible que el cultivo del tejido periprotésico: 69,5% frente a 52,8% respectivamente ($p=0,0154$).

Además, cuando el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular se llevó a cabo en conjunto con el cultivo del tejido periprotésico y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos, el número de pacientes diagnosticados aumentó en todos los tipos de infección. A continuación se muestran los datos necesarios para calcular el aumento de sensibilidad.

Tabla 8. Datos para calcular el aumento del número de pacientes diagnosticados cuando el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (CLSPA) se llevó a cabo conjuntamente con los cultivos convencionales (cultivo del tejido periprotésico y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos) para las IP aguda, crónica y total.

	IP aguda (n=47)	IP crónica (n=63)	IP total (n=118)
CLSPA + y cultivos convencionales +	31	25	60
CLSPA + y cultivos convencionales -	5	15	22
CLSPA - y cultivos convencionales +	5	4	9
CLSPA - y cultivos convencionales -	6	19	27

En IP aguda, cuando el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular se añadió al cultivo del tejido periprotésico y/o cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos, la sensibilidad aumentó de un 76,6% a un 87,2%, aunque no se encontraron relaciones estadísticamente significativas. En IP crónica, la sensibilidad aumentó de un 46% a un 69,8% ($p=0,0005$). Y en IP total, aumentó de 58,5% a 77,1% ($p<0,0001$).

Resultados

En el grupo de pacientes con IP que recibieron terapia antimicrobiana previa a la cirugía (n=18), la S de todos los métodos diagnósticos disminuyó en comparación con los pacientes que la recibieron. En las siguientes tablas se muestran los datos necesarios para calcular dichas sensibilidades y los valores finales.

Tabla 9. Datos para calcular la S de todos los cultivos en IP total, en los pacientes que recibieron terapia antimicrobiana previa a la cirugía y aquellos que no.

	Antimicrobianos previos a la cirugía	No antimicrobianos previos a la cirugía	Total
CLSPA +	12	70	82
CLSPA -	6	30	36
Total	18	100	118
CTP +	8	48	56
CTP -	8	42	50
Total	16	90	106
CLAFH +	5	35	40
CLAFH -	6	27	33
Total	11	62	73
CTP/CLAFH+	10	62	72
CTP/CLAFH -	8	38	46
Total	18	100	118

CLSPA: cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular

CTP: cultivo del tejido periprotésico

CLAFH: cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos

Tabla 10. Valores de S de todos los cultivos en IP total, en los pacientes que recibieron terapia antimicrobiana previa a la cirugía y aquellos que no.

	Antimicrobianos previos a la cirugía	No antimicrobianos previos a la cirugía
CLSPA	66,7%	70%
CTP	50%	53,3%
CLAFH	45,5%	56,5%
CTP/CLAFH	55,6%	62%

CLSPA: cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular

CTP: cultivo del tejido periprotésico

CLAFH: cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos

Sin embargo, aunque el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular fue el método que más pacientes diagnosticó dentro del grupo que había recibido antimicrobianos previamente a la cirugía (S=66%), no se encontraron diferencias

estadísticamente significativas cuando se comparó con el resto de técnicas (el segundo mejor valor de S fue de 55,6%).

7.3 Estudio prospectivo de evaluación de la utilidad del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación del espaciador para el diagnóstico de infecciones asociadas a espaciadores

Se estudiaron 50 espaciadores de cemento cargados con antibiótico de 46 pacientes con IP, todos ellos tratados con una cirugía de recambio protésico en dos tiempos. La edad media fue de 71,1 años \pm 11,9, siendo 35 mujeres. Los tipos de prótesis articulares fueron: rodilla (n=32), cadera (n=13), codo (n=3) y hombro (n=2).

En 43 casos (correspondientes a 39 pacientes) se consiguió realizar el diagnóstico etiológico de la infección original, y por tanto, los pacientes se trataron con el antimicrobiano más adecuado según el estudio de sensibilidad del microorganismo aislado. En los 7 casos restantes (correspondientes a 7 pacientes) no se aisló ningún microorganismo, por lo que el tratamiento antimicrobiano que recibieron los pacientes fue una asociación empírica de varios fármacos. Esta terapia consistió en: vancomicina y ceftazidima en 3 casos; clindamicina y ciprofloxacino/levofloxacino en dos casos; linezolid y ciprofloxacino en 1 caso; y ciprofloxacino y rifampicina en otro. Todos los tratamientos tuvieron una duración mínima de 6 semanas.

De los 50 espaciadores, 30 se cargaron con vancomicina y gentamicina, 13 únicamente con gentamicina, 6 con clindamicina y gentamicina, y 1 con vancomicina, gentamicina y clindamicina.

El seguimiento medio de los pacientes tras el segundo tiempo fue de 12,66 \pm 5,4 meses. El seguimiento medio de los pacientes curados (excluyendo 1 paciente que murió a los 2 meses de la cirugía por motivos no relacionados) fue de 16,24 \pm 5,6 meses.

Los datos clínicos y microbiológicos de los pacientes aparecen en la siguiente tabla.

Tabla 11. Datos clínicos y microbiológicos de los pacientes incluidos en el estudio de la utilidad del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación del espaciador para el diagnóstico de infecciones asociadas a su uso.

Nº	Sexo	Edad (años)	Articul.	Meses seguimiento tras el 2º T	Aislamiento previo	Tratamiento antibiótico	Datos en el momento del 2º T				Cultivo del líquido de sonicación del espaciador		Cultivo del tejido periprotésico	Evolución
							Dolor	Fistula o dehiscencia	PCR*	ATB espaciador	Recuento (UFC/mL)	Microorganismo aislado		
1	H	84	Cadera	18		VA+CAZ	No	No	1,60	VA+GM			Curación	
2	M	71	Rodilla	2	<i>S. epidermidis</i>	CIP+RIF	Sí	Sí	1,90	VA+GM			Persistente	
2	M	71	Rodilla	9	<i>E. faecalis</i>	LZ+RIF	Sí	Sí	1,16	VA+GM	30.000	<i>C. albicans</i>	Persistente	
2	M	73	Rodilla	9	<i>C. albicans</i>	FLUC	No	Sí	0,38	VA+GM		<i>S. epidermidis</i> + <i>E. faecalis</i>	Persistente	
3	H	85	Cadera	19	<i>P. aeruginosa</i>	CAZ+CIP	Sí	No	0,25	VA+GM	30.000	<i>C. albicans</i>	Persistente	
4	H	49	Rodilla	23	<i>S. epidermidis</i>	VA+DOX	Sí	No	1,70	VA+GM	500	<i>S. epidermidis</i>	Curación	
5	H	86	Hombro	23	<i>S. aureus</i>	CIP+RIF	No	No	0,40	GM			Curación	
6	M	67	Rodilla	26	<i>S. epidermidis</i> + <i>R. pickettii</i>	CIP+FEP	No	No	0,20	GM	300	<i>R. pickettii</i>	Curación	
7	M	82	Cadera	12	<i>S. aureus</i>	CIP+RIF	Sí	No	6,00	GM	80.000	<i>E. faecalis</i>	Persistente	
8	M	44	Cadera	21	<i>P. aeruginosa</i> + <i>E. faecalis</i>	DPT+AK +ATM	Sí	No	0,87	VA+GM	200	<i>E. faecalis</i>	Curación	
9	M	69	Rodilla	20	<i>S. agalactiae</i> + <i>C. striatum</i>	LZ+RIF	Sí	Sí	1,02	VA+GM			Persistente	
10	M	58	Rodilla	20		VA+CAZ	No	No	1,39	VA+GM			Curación	
11	M	69	Cadera	24		CIP+LZ	No	No	0,60	VA+GM			Curación	
12	H	53	Rodilla	15	<i>R. pickettii</i> + <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	LX+FF	Sí	Sí	15,90	GM	>100.000	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	Persistente
13	M	86	Codo	20	<i>S. aureus</i>	CX+RIF	No	No	2,34	GM			Curación	
14	M	73	Rodilla	25	<i>S. lugdunensis</i>	LX+RIF	No	No	0,50	CC+GM			Curación	
16	M	79	Rodilla	11	<i>S. aureus</i>	CIP+SXT	No	No	2,12	VA+GM			Nueva infección	
16	M	80	Rodilla	18	<i>E. cloacae</i>	CIP+SXT	No	No	0,75	VA+GM			Curación	
17	M	80	Rodilla	12		VA+CAZ	No	No	1,50	GM			Curación	
18	H	65	Codo	5	<i>E. cloacae</i>	CIP	Sí	No	0,10	VA+GM	30.000	<i>Delftia acidovorans</i>	<i>D. acidovorans</i>	Persistente
19	M	69	Rodilla	4	<i>S. aureus</i> + <i>E. faecalis</i>	LX+RIF +AM	Sí	No	8,44	VA+GM			<i>S. epidermidis</i>	Reinfección
19	M	69	Rodilla	2	<i>S. aureus</i> + <i>S. epidermidis</i>	VA+SXT	No	No	2,50	VA+GM			<i>S. epidermidis</i>	Muerte no relacionada
20	M	79	Cadera	1	<i>S. epidermidis</i>	VA+DOX	Sí	No	0,34	VA+GM	400	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Persistente
20	M	79	Cadera	12	<i>K. pneumoniae</i> + <i>A. baumannii</i>	IPM+AK	Sí	Sí	3,60	VA+GM	1.000	<i>A. baumannii</i> + <i>S. epidermidis</i> + <i>P. fluorescens</i>	<i>S. epidermidis</i> + <i>E. faecalis</i>	Persistente
21	M	76	Rodilla	12	<i>P. acnes</i>	CC+RIF	Sí	No	3,10	CC+GM			<i>S. epidermidis</i>	Persistente

Resultados

Continuación

Nº	Sexo	Edad (años)	Articul.	Meses seguimiento tras el 2º T	Aislamiento previo	Tratamiento antibiótico	Datos en el momento del 2º T			Cultivo del líquido de sonicación del espaciador		Cultivo del tejido periprotésico	Evolución
							Dolor	Fistula o dehiscencia	PCR*	ATB espaciador	Recuento (UFC/mL)		
22	M	51	Rodilla	14	<i>S. epidermidis</i>	CIP+RIF	Sí	No	4,60	CC+GM	>100.000	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Curación
23	M	74	Rodilla	14	<i>S. epidermidis</i>	VA+DOX	No	No	0,39	VA+GM			Curación
24	M	46	Rodilla	18	<i>P. acnes</i>	CX+RIF	No	No	0,75	VA+GM			Curación
25	H	56	Rodilla	5	<i>S. lugdunensis</i>	LX+RIF	Sí	No	0,50	VA+GM		<i>S. epidermidis</i>	Persistente
26	M	79	Rodilla	18	<i>S. epidermidis</i>	CIP+RIF	No	No	0,50	CC+GM			Curación
27	M	82	Cadera	24	<i>S. epidermidis</i>	CC+RIF	Sí	No	1,90	VA+GM			Curación
28	H	69	Hombro	24	<i>P. acnes</i>	CLM	No	No	0,50	GM			Curación
29	M	70	Rodilla	18	<i>S. epidermidis</i>	CIP+RIF	No	No	0,50	CC+GM		<i>S. epidermidis</i>	Curación
30	H	56	Cadera	16	<i>S. aureus</i>	LX+RIF	No	No	0,25	VA+GM			Curación ⁽¹⁾
31	M	76	Cadera	18	<i>S. epidermidis</i>	SXT+RIF	No	No	0,40	GM			Curación
32	H	79	Rodilla	17		CC+CIP	No	No	1,85	VA+GM			Curación
33	H	75	Rodilla	17	<i>S. epidermidis</i>	LZ+CC	No	No	0,60	VA+GM			Curación
34	H	84	Cadera	12	<i>S. epidermidis</i>	LX+RIF	No	No	0,57	VA+GM			Curación
35	M	76	Rodilla	12	<i>S. aureus</i>	CIP+CC	No	No	0,10	VA+GM+CC			Curación
36	M	78	Rodilla	12	<i>S. gordonii</i>	LX+RIF+AK	Sí	No	0,70	CC+GM			Curación
37	M	61	Rodilla	12	<i>S. agalactiae</i>	AM+RIF	No	No	0,90	VA+GM			Curación
38	M	76	Rodilla	12	<i>S. aureus</i>	CIP+CC	No	No	7,10	VA+GM			Curación
39	M	78	Rodilla	12	<i>S. gordonii</i>	CIP+CC	No	No	3,60	GM			Curación
40	M	77	Codo	12		LX+CC	No	No	2,12	GM			Curación
41	M	41	Rodilla	12	<i>S. epidermidis</i>	LX+RIF	No	No	0,25	GM			Curación
42	H	80	Cadera	12	<i>S. epidermidis</i>	SXT+RIF	No	No	1,20	GM			Curación
43	M	80	Rodilla	12		CIP+RIF	No	No	0,30	GM			Curación
44	M	85	Rodilla	10	<i>S. aureus</i>	LX+RIF	No	No	2,71	VA+GM	2.000	<i>S. aureus</i>	Curación
45	H	57	Rodilla	10	<i>S. epidermidis</i>	LZ+FF	No	No	0,37	VA+GM			Curación
46	H	85	Cadera	5	<i>S. aureus</i>	SXT+RIF	Sí	No	1,20	VA+GM	80.000	<i>Chryseobacterium indologenes</i> + <i>D. acidovorans</i>	Persistente

Sexo H: hombre; M: mujer.

Artic: articulación

PCR*: Proteína C Reactiva.

VA: vancomicina; GM: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; LX: levofloxacino; CAZ: ceftazidima; RIF: rifampicina; LZ: linezolid; FLUC fluconazol; DOX doxiciclina; CC: clindamicina; FEP cefepima; DPT: daptomicina; AK: ampicilina; ATM: aztreonam; FF: fosfomicina; SXT: cotrimoxazol; CX: cloxacilina; AM: amoxicilina; IPM: imipenem; CLM: claritromicina.

⁽¹⁾ Paciente con una fistula que cerró. No presentó más síntomas.

En el momento de la segunda cirugía, 16 casos se diagnosticaron como infección relacionada con el uso de espaciadores de acuerdo a los criterios explicados en Material y Métodos. El principal síntoma fue el dolor, seguido de drenaje persistente. Todos los casos salvo uno se consideraron infecciones persistentes. En el caso restante los síntomas de infección aparecieron varias semanas después de la cirugía, por lo que se diagnosticó como un segundo episodio de infección. El valor medio de la Proteína C Reactiva antes de la retirada del espaciador fue de 1,85 mg/dL (rango 0,1-15,9).

Después de la segunda cirugía, 2 pacientes infectados se trataron con terapia supresora, 2 se sometieron a una artroplastia de resección, y uno a amputación. Un paciente presentó una fístula que desapareció tras varias semanas sin presentar ningún otro síntoma durante el seguimiento. Un paciente murió por enfermedades de base no relacionadas con la infección. El resto de pacientes se recuperó con éxito. La presencia de dolor o dehiscencia/fístula se asoció significativamente con una mala evolución de los pacientes ($p=0,00003$ en ambos casos).

Las principales características clínicas y microbiológicas de los pacientes con infección asociada al uso de espaciadores se muestran a continuación.

Resultados

Tabla 12. Características clínicas y microbiológicas de los pacientes con infección asociada al uso de espaciadores.

Nº	Edad	Sexo	Fecha cirugía 1º T	Síntomas entre las 2 cirugías	Tratamiento antibiótico	Fecha otras cirugías	Fecha cirugía 2º tiempo	PCR* antes del 2ºT	Evolución final
2	71	M	02/01/12	Drenaje persistente, dehiscencia herida	CIP+RIF		26/1/12	1,90	Infección persistente
2	71	M	26/01/12	Drenaje persistente, dehiscencia herida, dolor articular	LZ+RIF	Drenaje quirúrgico (8/3/2012)	14/6/12	1,16	Infección persistente
2	73	M	14/06/12	Dolor persistente, drenaje escaso	FLUC		25/3/13	0,38	Nueva infección aguda debida a SCN 15 días después de la 2ª cirugía
3	85	H	26/03/12	Numerosas dislocaciones del espaciador, dolor	CAZ+CIP		15/5/12	0,25	Técnica de Girdlestone
7	82	M	02/12/11	Drenaje persistente, dehiscencia herida	CIP+RIF		23/1/12	6	Tratamiento supresivo del implante infectado
9	69	M	01/01/12	Dehiscencia herida, dolor local persistente	LZ+RIF		11/4/12	1,02	Infección persistente. DAIR (24/5/2012)
12	53	H	28/08/12	Local dolor y aumento de síntomas inflamatorios el 9/9/12	LX+FF		12/9/12	15,9	Probable infección hematógena tratada con amputación
18	65	H	19/10/10	Dolor local osteolisis ósea en radiologías	CIP		14/12/10	0,1	Tratamiento supresivo. Pérdida a los 4 meses de seguimiento
19	69	M	22/04/13	Drenaje persistente, dehiscencia herida, dislocación del espaciador	AM+LX+RIF		10/5/13	8,44	Infección persistente. Nueva cirugía en 2 tiempos.
20	79	M	26/02/13	Dolor, fractura ósea local	VA+DOX		31/5/13	0,34	Nueva infección. DAIR y posterior cirugía en 2 tiempos
20	79	M	06/06/13	Drenaje persistente, dolor	IMP+AK. TIG añadida durante la semana previa a la cirugía		16/7/13	3,6	Técnica de Girdlestone
21	76	M	29/11/12	Dolor, parámetros serológicos elevados	CC+RIF		21/6/13	2,7	Infección persistente. Curación tras retirada del espaciador
22	51	M	19/10/12	Dolor, parámetros serológicos elevados	CIP+RIF		4/7/13	4,6	Nueva cirugía en 2 tiempos
25	56	H	20/03/13	Sinovitis persistente, dolor	LX+RIF	Artrocentesis (8/5/2013)	17/5/13	0,5	Nueva cirugía en 2 tiempos
46	85	H	30/01/14	Sinovitis persistente, dolor, dislocación del espaciador	SXT+RIF	Artrocentesis (3/4/2014)	10/4/14	1,2	Nueva cirugía en 2 tiempos

TIG: tigeiciclina

PCR*: Proteína C Reactiva

El cultivo cuantitativo del líquido de sonicación del espaciador fue positivo en 13 casos, 9 de ellos correspondientes a pacientes con infección y 4 a pacientes sin ella ($p=0,001$). En 6 casos el cultivo tuvo un recuento bajo (<10.000 UFC/mL) y en 7 casos el recuento fue alto (>10.000 UFC/mL). Todos los casos de recuentos altos se correspondieron con pacientes con infección ($p=0,001$). En 11 casos, el cultivo del tejido periprotésico fue también positivo (5 de ellos con un resultado positivo del cultivo del líquido de sonicación del espaciador, ver tabla 11). En 8 casos se identificó un microorganismo distinto del aislado en los cultivos originales, y todos ellos (salvo uno) se correspondieron con pacientes infectados ($p=0,00002$). La presencia de recuentos altos o el aislamiento de un microorganismo diferente al cultivo original, también se asoció con la infección, en este caso de una manera más potente ($p=0,000004$) que la asociación conjunta de los dos resultados ($p=0,0005$).

La mala evolución de los pacientes se asoció estadísticamente con la positividad del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación del espaciador ($p=0,01$), un recuento elevado ($p=0,004$ frente a la suma de recuentos bajos + cultivos negativos), el aislamiento de un microorganismo diferente al inicial ($p=0,0013$) y con el cultivo del tejido periprotésico positivo ($p=0,0013$). La asociación entre la mala evolución y recuentos elevados o el aislamiento de un microorganismo diferente fue aún mayor ($p=0,0003$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de Proteína C Reactiva previos a la retirada del espaciador y la presencia de infección, evolución, recuento elevado o aislamiento de un microorganismo diferente al del cultivo original.

La sensibilidad del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación del espaciador (56,3%), fue mayor que la del cultivo del tejido periprotésico (50%), pero la especificidad fue menor (88,2% Vs 94,1% respectivamente). La combinación de ambas técnicas permitió

Resultados

diagnosticar 13 de los 16 pacientes con infección (S=81,3%). Sin embargo, dicha especificidad aumentó hasta el 100% al considerar únicamente los resultados del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación del espaciador en los que se aisló una especie diferente, o en los que el recuento fue >10.000 UFC/mL, sin que por ello la sensibilidad disminuyera (56,3%).

7.4 Estudio prospectivo de evaluación de la técnica de PCR Unyvero i60 ITI® a partir del líquido de sonicación de prótesis articulares para el diagnóstico microbiológico de IP

Se estudiaron 88 muestras de 68 pacientes (1,29 muestras/paciente).

De los 68 pacientes, 29 reunían criterios clínicos de IP y 39 no. La media de edad de los pacientes fue de 72,75 años, siendo 44 mujeres y 24 hombres. El tipo de infección más frecuente fue crónica (n=15), seguida de aguda (n=12) y hematológica (n=2).

Los tipos de prótesis articulares retiradas fueron: rodilla (n=55), total de cadera (n=26), parcial de cadera (n=5) y hombro (n=2). De las 88 muestras, 38 se correspondían con pacientes con IP.

Datos relativos a las muestras de pacientes con criterios de IP (n=38)

En 20 casos, tanto el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular, como la PCR a partir del líquido de sonicación, resultaron positivos. En la siguiente tabla se muestran los resultados de ambos métodos, junto con los resultados del cultivo del tejido periprotésico y cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos.

Resultados

Tabla 13. Comparación de los resultados de todos los métodos diagnósticos en las muestras de pacientes con criterios clínicos de IP. PCR y cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (CLSPA) positivos (n=20).

CLSPA					
Tipo de infección	Recuento (UFC/mL)	Microorganismo	Resultado de la PCR	CLAFH	CTP
H	50.000	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	Negativo
C	100.000	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	No realizado	<i>K. pneumoniae</i>
C	3.000	<i>A. baumannii</i>	SCN	Negativo	Negativo
C	300	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	Negativo	Negativo
A	100	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
C	500	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. haemolyticus</i>	SCN	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. haemolyticus</i>	Negativo
C	20.000	<i>Staphylococcus simulans</i>	SCN	<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>
C	50.000	<i>S. epidermidis</i>	SCN	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
C	50.000	<i>S. epidermidis</i>	SCN	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
C	100	<i>S. simulans</i>	SCN	<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>
C	100.000	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> y <i>Enterococcus spp</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
C	100.000	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> y <i>Enterococcus spp</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
A	100.000	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
H	100.000	<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus spp</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
H	100.000	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> y <i>Enterococcus spp</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
C	1.400	<i>S. epidermidis</i>	SCN	Negativo	Negativo
A	100.000	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	Negativo	Negativo
A	2.000	<i>S. epidermidis</i>	SCN	No realizado	<i>S. epidermidis</i>
A	100.000	<i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
A	100.000	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> y <i>K. pneumoniae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. aerogenes</i>

Tipo de infección: A (aguda) C (crónica) H (hematógena)

CLAFH: cultivo de líquido articular inoculado en frasco de hemocultivo

CTP: cultivo de tejido periprotésico

En 7 casos, el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular fue positivo pero la PCR negativa. Las discrepancias se detallan a continuación:

- Recuento de 300 UFC/mL de *S. marcescens*, bacteria no detectada por la PCR por no estar incluida en el kit.
- Recuento de 100 UFC/mL de *S. epidermidis*, considerado como un contaminante, ya que el verdadero agente etiológico de la infección fue *Mycobacterium*

tuberculosis que creció 8 semanas después en medios de cultivo específicos de Micobacterias.

- Recuento de 10^5 UFC/mL de *S. agalactiae*.
- Recuento de 1.000 UFC/mL de *S. simulans*.
- Recuento de 7.000 UFC/mL de *Klebsiella oxytoca*.
- Recuento de 2.000 UFC/mL de *F. magna*.
- Recuento de 200 UFC/mL de *P. acnes*.

Los 5 últimos casos se tomaron como falsos negativos de la PCR ya que esas bacterias fueron consideradas los verdaderos agentes etiológicos de la IP. Además en algunos casos, también fueron detectados por cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y cultivo del tejido periprotésico. Todos estos datos quedan recogidos en la siguiente tabla.

Tabla 14. Comparación de los resultados de todos los métodos diagnósticos en las muestras de pacientes con criterios clínicos de IP. Cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (CLSPA) positivo y PCR negativa (n=20).

CLSPA					
Tipo de infección	Recuento (UFC/mL)	Microrganismo	Resultado de la PCR	CLAFH	CTP
C	100.000	<i>S. agalactiae</i>	Negativo	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. agalactiae</i>
A	7.000	<i>K. oxytoca</i>		Negativo	Negativo
A	300	<i>S. marcescens</i>		<i>S. marcescens</i>	Negativo
C	1.000	<i>S. simulans</i>		<i>S. simulans</i>	<i>S. simulans</i>
A	2.000	<i>F. magna</i>		Negativo	Negativo
C	200	<i>P. acnes</i>		<i>P. acnes</i>	Negativo
C	100	<i>S. epidermidis</i>		<i>S. epidermidis</i>	Negativo

Tipo de infección: A (aguda) C (crónica) H (hematógena)

CLAFH: cultivo de líquido articular inoculado en frasco de hemocultivo

CTP: cultivo de tejido periprotésico

Resultados

En 3 casos, la PCR fue positiva pero el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular negativo, por lo que se consideraron falsos negativos del cultivo. De nuevo, las discrepancias se explican a continuación:

- PCR positiva para *E. faecalis*, también aislado en cultivo del tejido periprotésico.
- PCR positiva para *S. aureus*, no aislado en otros cultivos.
- PCR positiva para *P. mirabilis*, aislado un mes antes de la cirugía de extracción de la prótesis, en un cultivo de cirugía de limpieza.

En 8 casos, las dos técnicas fueron negativas, y de ellas sólo 1 fue probablemente negativa debido al recibimiento de terapia antimicrobiana previo a la cirugía.

Datos relativos a las muestras de pacientes sin criterios de IP (n=50)

En un caso la PCR detectó *S. epidermidis*, el cual fue considerado como falso positivo de la técnica de biología molecular, al ser negativos todos los cultivos y no presentar el paciente criterios clínicos de IP. Ese paciente fue diagnosticado finalmente de aflojamiento aséptico.

Dos cultivos cuantitativos del líquido de sonicación de la prótesis articular positivos, cuyos resultados fueron 100 UFC/mL de *S. aureus* y 100 UFC/mL de *S. epidermidis*, y con resultado negativo de la PCR, fueron considerados falsos positivos del cultivo por varios motivos. El recuento fue muy bajo (<500 UFC/mL); el resto de cultivos fueron negativos; los pacientes no presentaron complicaciones a pesar de no recibir tratamiento antibiótico; y ante todo, porque no reunían criterios clínicos de IP.

En cuanto a los mecanismos de resistencia detectados por el sistema Unyvero i60 ITI®, tanto en pacientes con IP como en aquellos sin IP, la PCR encontró 9 mecanismos de resistencia en 5 de las muestras:

- 3 genes *mecA*
- 2 genes de resistencia a fluoroquinolonas: mutaciones en los genes *gyrA83* y *gyrA87*.
- El gen *ctx-M* (β -lactamasa de espectro extendido).
- El gen *aac A4* que confiere resistencia a los aminoglucósidos.
- Los genes *ermA* y *ermC*

Todos estos hallazgos se confirmaron mediante el estudio de sensibilidad antimicrobiana fenotípica por el sistema VITEK 2® (bioMérieux Marcy-L'Etoile, France) a partir del cultivo de las muestras. Sólo hubo un caso de discrepancia, en el que se aisló por cultivo *S. simulans*, que mediante el estudio de sensibilidad fenotípica era resistente a clindamicina y eritromicina, y la PCR no detectó el gen responsable.

Además de la técnica de biología molecular y el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular, en todos los pacientes se procesaron las muestras de tejido peri-implante, y en todos salvo en 3, muestras de líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos.

La positividad o negatividad de todos los métodos diagnósticos, incluidos el cultivo del tejido periprotésico y cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos, se muestran en la siguiente tabla, y son los datos utilizados para calcular los parámetros estadísticos de S, E, VPP y VPN de todas las técnicas.

Tabla 15. Datos para calcular los parámetros estadísticos del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (CLSPA), PCR múltiple, cultivo del tejido periprotésico (CTP) y cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos (CLAFH) para el diagnóstico de IP.

	Muestras de pacientes con IP	Muestras de pacientes sin IP	Total
CLSPA +	27	2	29
CLSPA -	11	48	59
Total	38	50	88
PCR Unyvero i60 ITI® +	23	1	24
PCR Unyvero i60 ITI® -	15	49	64
Total	38	50	88
CTP +	16	0	16
CTP -	22	50	72
Total	38	50	88
CLAFH +	20	2	22
CLAFH -	15	48	63
Total	35	50	85

De tal forma, que los parámetros estadísticos de los 4 métodos diagnósticos son los siguientes:

Tabla 16. Parámetros estadísticos de S, E, VPP y VPN (expresados en %) del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (CLSPA), PCR múltiple, cultivo del tejido periprotésico (CTP) y cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos (CLAFH) para el diagnóstico de IP.

	S	E	VPP	VPN
CLSPA	71,1	96	93,1	81,4
PCR Unyvero i60 ITI®	60,5	98	95,8	76,6
CTP	42,1	100	100	69,4
CLAFH	57,1	96	90,9	76,2

Aunque los valores de S y VPN de la PCR no fueron demasiado elevados (60,5% y 76,6%, respectivamente), los mismos parámetros para el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular, aunque fueron los mejores de las 4 técnicas diagnósticas, tampoco fueron demasiado altos (71,1% y 81,4%). La principal aportación que ofreció el sistema Unyvero i60 ITI® fue la mejoría en los parámetros de E y VPP

(98% y 95,8%) con respecto al cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular (96% y 93,1%), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Cuando se comparó con el cultivo del tejido periprotésico, la PCR presentó mejores parámetros estadísticos, porque aunque los valores de E y VPP del cultivo del tejido periprotésico fueran del 100%, sus valores de S y VPN fueron especialmente bajos. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En comparación con el cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos, la PCR presentó valores muy similares aunque ligeramente superiores. Aun así, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

7.5 Estudio prospectivo de evaluación del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de drenajes abdominales para el diagnóstico de infección del sitio quirúrgico

Se incluyeron en este estudio 45 tubos de drenaje de 35 pacientes. De las 45 muestras, 27 fueron del tipo Jackson Pratt, 13 Blake, y 5 Redon. Sin embargo, para el cálculo de datos clínicos, epidemiológicos y correlación entre parámetros clínicos y analíticos con microbiológicos, sólo 24 Jackson Pratt (68,6%), 8 Blake (22,8%) y 3 Redon (8,6%) se tuvieron en cuenta debido al algoritmo previamente descrito en el apartado de Material y Métodos.

Datos clínicos, epidemiológicos y analíticos

La edad media de los 35 pacientes fue $60,14 \pm 16,55$ años (rango 24-88), siendo 20 hombres y 15 mujeres. De los 35 pacientes, 16 reunían criterios clínicos de infección del sitio quirúrgico, mientras que 19 no, considerado grupo control.

Un total de 21 pacientes presentó alguna comorbilidad; en algunos casos sólo una enfermedad de base y en otros casos más de una. Estas fueron: Diabetes Mellitus (n=5), cáncer (n=5), enfermedad cardiovascular (n=5), hepatitis (n=5), enfermedad renal (n=3), enfermedad pulmonar (n=1), VIH (n=1) y coagulopatía (n=1).

Sólo 7 pacientes presentaron fiebre. Y 20 de ellos, una o más tipos de complicaciones después de la cirugía. A pesar de esto, únicamente dos personas necesitaron ser operadas de nuevo, y en ambos casos se practicó una laparotomía exploratoria. Dentro de las complicaciones directamente relacionadas con el procedimiento quirúrgico se incluyeron: íleo paralítico (n=6), infección de herida quirúrgica (n=3), fuga (n=2), fístula (n=2), pancreatitis (n=1) y hematoma (n=1). Otras complicaciones fueron: hidroneumotórax

(n=2), sepsis (n=2), anemia (n=2), dolor (n=2), neumonía nosocomial (n=1), hipocalcemia (n=1), hipoproteinemia (n=1), perforación vesical (n=1), infección del tracto urinario (n=1) y fuga (n=1).

En 8 casos la cirugía fue abierta (laparotomía) y 27 del tipo laparoscopia. El grado de contaminación de la cirugía fue: limpia contaminada (n=17), contaminada (n=11), sucia-contaminada (n=4) y limpia (n=3).

En cuanto al aspecto del punto de inserción del tubo de drenaje en el momento de la retirada del dispositivo, la apariencia predominante fue la serohemática (n=30), seguida de la serosa (n=3), purulenta (n=1) y biliar (n=1).

Los antibióticos más utilizados fueron los β -lactámicos. Los tubos de drenaje fueron utilizados durante una media de $6,4 \pm 4,4$ días. El valor medio de los leucocitos fue de 8.528 y el de la Proteína C Reactiva de 11,87 mg/dL.

Aunque el objetivo principal de este trabajo era establecer correlaciones microbiológicas-clínicas/analíticas, también se buscaron correlaciones entre parámetros clínicos o analíticos, y la presencia de infección del sitio quirúrgico. Y la única correlación encontrada fue que un uso superior a 3 días del tubo de drenaje se relacionaba con la presencia de infección del sitio quirúrgico ($p=0,022$).

Los principales datos clínicos, epidemiológicos y analíticos de los pacientes se detallan en la siguiente tabla, diferenciando entre pacientes con criterios clínicos de infección del sitio quirúrgico, y pacientes sin infección del sitio quirúrgico.

Tabla 17. Principales datos clínicos, epidemiológicos y analíticos de los pacientes con tubos de drenaje abdominales.

	ISQ (n=16)	No ISQ (n=19)
Edad media \pm DS (en años)	57,75 \pm 12,04	62,16 \pm 19,69
Sexo (hombres)	11 (68,8%)	9 (47,4%)
Comorbilidades	9 (56,2%)	12 (63,2%)
Fiebre	4 (25,0%)	3 (15,8%)
Complicaciones	14 (87,5%)	6 (31,6)
Aspecto seroso o serohemático de la herida quirúrgica	15 (93,8%)	18 (94,7%)
Uso del tubo de drenaje superior 3 días	16 (100%)	13 (68,4%)
Recuento leucocitos (media \pm DS)	8.814 \pm 3.669	8.288 \pm 3.228
Valor de PCR* (mg/dL) (media \pm DS)	12,85 \pm 9,35	11,04 \pm 5,44

ISQ: infección del sitio quirúrgico

PCR*: Proteína C Reactiva

Datos microbiológicos

En 37 casos el cultivo cuantitativo del tubo de drenaje tras sonicación fue positivo, de los cuales 10 fueron monomicrobianos y 27 polimicrobianos. El recuento medio fue de 310,6 UFC/cm² (rango inter-cuartílico: 98.5–824.2 CFU/cm²). El grupo de microorganismos más frecuentemente aislado fue SCN (n=26), pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre su aislamiento y la presencia de infección del sitio quirúrgico, por lo que se consideraron contaminantes o microbiota cutánea (al igual que *Micrococcus* spp y *P. acnes*), pero no agentes etiológicos. Por el contrario, en 11 casos (8 de ellos en pacientes con infección del sitio quirúrgico), se detectó un microorganismo que no forma parte de la microbiota cutánea, y se consideró un patógeno potencial (6 implantes con un solo patógeno, y 5 de ellos con dos patógenos). El recuento mínimo en el que estos microorganismos se aislaron fue de 1.500 UFC/mL. A continuación se detallan.

Tabla 18. Patógenos potenciales aislados en el cultivo de tubos de drenaje abdominales sonicados y asociados estadísticamente con infección del sitio quirúrgico.

Patógeno	n
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
<i>Escherichia coli</i>	4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2
<i>Candida</i> spp	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Enterococcus</i> spp	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Morganella morgannii</i>	1

Análisis estadístico

Se buscaron relaciones estadísticamente significativas entre los parámetros microbiológicos de cultivo positivo, recuento medio de los cultivos positivos, y aislamiento de un patógeno potencial, con cualquier parámetro clínico o analítico (incluida la presencia de infección del sitio quirúrgico).

El aislamiento de patógenos potenciales, independientemente de su recuento, se relacionó significativamente con la presencia de infección del sitio quirúrgico ($p=0,035$), complicaciones médicas ($p=0,004$), quirúrgicas ($p=0,0157$) y totales ($p\leq 0,001$), mayor recuento de leucocitos ($p=0,048$), aspecto seroso del punto de inserción del implante ($p=0,040$) y el uso del drenaje durante más de 3 días ($p=0,039$).

Sin embargo, no se encontraron relaciones estadísticamente significativas entre el aislamiento de un patógeno potencial y otros parámetros clínicos o analíticos como

Resultados

comorbilidades, grado de contaminación de la cirugía, fiebre, cirugía de laparotomía o valores de la Proteína C Reactiva.

También se encontró que el cultivo negativo para patógenos potenciales estuvo relacionado con la toma de antimicrobianos previos a la retirada del tubo de drenaje ($p=0,003$).

En la siguiente tabla se recogen los datos de los principales parámetros clínicos en función del tipo de cultivo del tubo de drenaje.

Tabla 19. Principales datos clínicos en comparación con el tipo de cultivo del tubo de drenaje: cultivo negativo (CN), aislamiento de un contaminante (C), o de un patógeno potencial (PP).

	CN (n=4)	C (n=20)	PP (n=11)
Infección del sitio quirúrgico	1 (25%)	7 (35%)	8 (72,7%)
Complicaciones	1 (25%)	8 (40%)	11 (100%)
Recuento leucocitos (media \pm DS)	8.258 \pm 2.758	8.066 \pm 3.133	9.072 \pm 3.122
Aspecto seroso de la herida quirúrgica	0	0	3 (100%)
Uso del tubo de drenaje durante más de 3 días	3 (75%)	15 (75%)	11 (100%)
Comorbilidades	3 (75%)	13 (65%)	5 (45,4%)
Cirugía contaminada o sucia contaminada	2 (50%)	8 (40%)	5 (45,5%)
Fiebre	2 (50%)	3 (15%)	2 (18,2%)
Laparotomía	2 (50%)	3 (15%)	3 (27,3%)
Valor de PCR* (mg/dL) (media \pm DS)	9,3 \pm 6,4	12,3 \pm 7,6	11,7 \pm 7,9
Antibiótico previo	1 (25,9%)	14 (70%)	1 (9,1%)

PCR*: Proteína C Reactiva

En cuanto al parámetro microbiológico de recuento medio, este se correlacionó únicamente con el valor de la Proteína C Reactiva ($p=0,048$), del tal forma que recuentos elevados se asociaron con valores elevados de este RFA.

Por el contrario, únicamente la positividad del cultivo con independencia del recuento o tipo de microorganismo aislado, no se relacionó de manera estadísticamente significativa con ningún parámetro clínico ni analítico.

Los resultados del estudio estadístico comparando la evolución de los pacientes en función de si tenían uno o más tubos de drenaje, demostraron que los últimos pacientes no presentaron un peor pronóstico.

Se calcularon los parámetros estadísticos del cultivo del líquido obtenido tras sonicación del tubo de drenaje y los resultados fueron los siguientes: S=50%, E=84,2%, VPP=72,7% y VPN=66,7%. Para ello, se tuvo en cuenta la presencia de criterios clínicos de infección del sitio quirúrgico así como el aislamiento de patógenos potenciales en el cultivo.

8 DISCUSIÓN

Los ultrasonidos representan una técnica muy utilizada en el ámbito científico general con distintos fines. Dentro del ámbito microbiológico son muy utilizados en la industria alimentaria. Debido a su capacidad para inactivar microorganismos y sus enzimas[105], se emplea junto con otras técnicas como aplicación de calor (termosonicación), para disminuir la contaminación microbiana de determinados alimentos, como zumos o leche[106, 107], manteniendo las propiedades organolépticas y frescura de los mismos, a diferencia del calor[108].

Como herramienta para llevar a cabo un diagnóstico microbiológico de infecciones asociadas al uso de implantes, ha sido utilizada para sonicar diferentes dispositivos como: implantes neurológicos[109], cardíacos[110, 111], craneales[112], ureterales[113] o vasculares[63, 64, 114].

Aunque la sonicación de catéteres vasculares no ha demostrado superioridad con respecto al cultivo semicuantitativo de la punta del catéter por la técnica de Maki, en el resto de infecciones asociadas al uso de implantes, la sonicación de los dispositivos ha sido de utilidad. Aunque en ningún caso, dicha utilidad ha sido tan estudiada y demostrada como en el diagnóstico de la IP.

8.1 Influencia del tiempo de sonicación de un dispositivo en la liberación de bacterias desde el biofilm formado sobre la superficie del material

La sonicación representa una herramienta útil en el diagnóstico microbiológico de algunas infecciones asociadas al uso de implantes al ser capaz de liberar o arrancar los microorganismos que forman parte del biofilm sobre la superficie del implante. Sin embargo, los ultrasonidos también pueden tener un efecto letal sobre ellos[53, 54]. Diversos estudios *in vitro* han demostrado que largos tiempos de exposición inactivan las bacterias[115] por lo que resulta de crucial importancia controlar el tiempo de exposición a los ultrasonidos durante el proceso de sonicación durante un diagnóstico microbiológico, para recuperar el mayor porcentaje de bacterias viables que puedan crecer posteriormente tras cultivarlas.

En este trabajo hemos concluido que 5 minutos fue el tiempo óptimo para recuperar la mayor cantidad de bacterias viables que se encontraban formando parte de un biofilm sobre la superficie de discos de Ti6Al4V. Por tanto, si extrapolamos los datos obtenidos en este trabajo a la práctica clínica para el diagnóstico microbiológico de infecciones asociadas al uso de implantes, donde los discos de Ti6Al4V representarían cualquier dispositivo al cual los microorganismos se han adherido y formado un biofilm, establecemos el tiempo de 5 minutos como el tiempo óptimo capaz de recuperar la mayor cantidad de bacterias viables adheridas a un biofilm.

Teniendo en cuenta que hoy en día la IP representa la principal infección asociada al uso de implantes, hemos decidido utilizar un material empleado en la fabricación de las prótesis articulares, como es el Ti6Al4V. Actualmente se utiliza para fabricación de implantes cuyo objetivo sea la osteointegración, tales como implantes dentales y prótesis

ostearticulares, ya que es un material inerte, biocompatible y con propiedades mecánicas similares a las del hueso[100, 116, 117]. Además, las aleaciones de titanio sufren modificaciones mediante la adición de sustancias que inhiben la adhesión bacteriana a la superficie del dispositivo, con el objetivo de disminuir la tasa de infecciones asociadas al uso de implantes. Plata, azufre, zinc cobre o flúor son algunas de las sustancias añadidas con capacidad antibacteriana[100].

Tunney y cols[57] y unos años más tarde Trampuz y cols[55], ya utilizaron los ultrasonidos para liberar las bacterias de prótesis de cadera y con un fin diagnóstico de IP, respectivamente. Y ambos grupos de trabajo ya empleaban 5 minutos de exposición a los ultrasonidos. Desde entonces, este es el protocolo que se lleva a cabo en prácticamente todos los laboratorios de microbiología para el diagnóstico microbiológico de IP. Sin embargo, no hemos encontrado bibliografía que apoye que 5 minutos es el tiempo óptimo de sonicación de las prótesis articulares, sino que probablemente ese tiempo fue elegido aleatoriamente, motivo por el cual decidimos realizar este experimento. Únicamente hay un artículo publicado en 2009 por Monsen y cols[56] similar a nuestro trabajo . Ellos llevaron a cabo un estudio “*in vitro*” en el que también estudiaron la influencia del tiempo de exposición a los ultrasonidos en la liberación de bacterias, pero sin reproducir previamente la formación de un biofilm, sino que aplicaron los ultrasonidos directamente a una suspensión de bacterias en estado planctónico. Con lo cual, nuestro experimento se ajusta más a lo que ocurre en las infecciones asociadas al uso de implantes, en las que las bacterias se encuentran formando parte de un biofilm en lugar de en estado planctónico. Aun así, ellos establecieron el tiempo óptimo en 7 minutos, tiempo muy similar al obtenido por nuestro grupo de trabajo, y además en ambos casos, la liberación de las bacterias gram positivas es mayor que la de las gram negativas. Una posible explicación a este hecho es que las gram positivas poseen una capa más gruesa de peptidoglicano[118],

Discusión

que podría protegerlas de los efectos de los ultrasonidos. Y otra posible explicación es que las gram positivas poseen más mecanismos de adherencia o establecen uniones más fuertes hacia el biofilm que las gram negativas[119, 120] por lo que las últimas se encontrarían en menor proporción en el biofilm y por tanto se recuperarían menos tras la sonicación.

Además Monsen y cols también demostraron que hay otros factores que afectan a la liberación de microorganismos utilizando la sonicación, como la temperatura (22° C es la temperatura óptima), el tipo de bacteria (gram positivas más resistentes que gram negativas), así como el material y composición del recipiente de sonicación (en materiales de vidrio se consigue mayor recuperación que en materiales de plástico). Aunque nosotros sólo evaluamos 2 de estos factores, el tiempo de exposición y la influencia del tipo de bacteria, todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura constante (22°C), y con el mismo tipo de contenedores estériles plásticos, que a pesar de ser los que menos recuperación de bacterias consiguen según Monsen y cols, son los utilizados en la rutina asistencial desde el protocolo establecido por Trampuz y cols[55].

Para llevar a cabo este experimento, elegimos especies de *Staphylococcus* ya que representan la principal causa de infecciones asociadas al uso de implantes[86]. Sin embargo, las otras cepas (*E. faecium*, *E. coli* y *P. aeruginosa*) son bacterias patógenas aisladas cada vez con mayor frecuencia en este tipo de infecciones[17], motivo por el cual también fueron empleadas en el experimento.

En cuanto al método de siembra, utilizamos la técnica del drop plate, ya que, a pesar de ser un método que aún no está totalmente estandarizado y que en función del autor puede llevarse a cabo de maneras diferentes[101, 121, 122], todas las formas han demostrado los mismos resultados que el método tradicional de siembra consistente en la expansión del

inóculo sobre la placa. Y además ofrece incuestionables ventajas, en esencia basadas en la necesidad de menos recursos, tanto en cuestión de materiales, como especialmente en cuestión de tiempo[122]. Sin embargo, puede ser considerada una limitación del estudio ya que se calcula el recuento de colonias en un volumen final 10 veces menor (10 μ L) que con el método tradicional (100 μ L), por lo que el recuento final es más aproximado en lugar de más exacto .

La principal limitación de este trabajo es el período de tiempo utilizado para la formación del biofilm, sólo 24 horas, lo cual no se corresponde con “la edad” de algunos biofilms en determinadas infecciones asociadas al uso de implantes. Por ejemplo en IP crónica, ya se ha visto que los biofilms pueden tener del orden de varios meses[9]. Por tanto, la extrapolación de estos datos a la práctica clínica podría ser errática al asumir que ambos biofilms van a presentar el mismo comportamiento en cuanto a la liberación de bacterias tras la exposición a ultrasonidos y quizás, tanta diferencia de tiempo, influya de alguna manera en dicha liberación.

Al igual que el tiempo de formación del biofilm puede que no se correlacione con los tiempos reales que transcurren en algunas infecciones asociadas al uso de implantes, dispositivos que no estén fabricados a base de aleaciones de titanio, en la práctica clínica pueden comportarse de manera diferente a los discos de Ti6Al4V utilizados en este experimento. No obstante, la influencia de la composición química del material afecta a la adherencia bacteriana, pero, una vez que ha transcurrido esa fase y ya se ha formado el biofilm, probablemente todos los biofilms (independientemente de sobre qué material esté formado) se comporten igual, con lo cual estos datos podrían extrapolarse a cualquier material.

Discusión

En el resto de infecciones asociadas al uso de implantes, algunos autores utilizan el trabajo de Trampuz[55] como referencia y también sonicán los dispositivos 5 minutos. Por ejemplo: dispositivos cardíacos[110, 111] o craneales[112]. Sin embargo, otros autores exponen los implantes a los ultrasonidos menos tiempo; por ejemplo: dispositivos neurológicos[109], o catéteres vasculares[64, 114]. De nuevo, tampoco hemos encontrado bibliografía que apoye que ese tiempo de exposición a los ultrasonidos sea el más adecuado, así que probablemente la elección de ese tiempo sea arbitraria teniendo en cuenta las diferencias de frecuencia e intensidad (o potencia) de los baños de sonicación utilizados.

8.2 Uso de la sonicación para el diagnóstico de infección de prótesis articular

Las IPs suponen una devastadora consecuencia de las cirugías de artroplastia, no sólo a nivel clínico, sino también a nivel económico. Aunque la incidencia de las IPs no es demasiado elevada (<3%)[6], estas infecciones implican un alto gasto del Sistema Nacional de Salud debido a que la práctica de estas cirugías está aumentando exponencialmente desde hace algunos años[123], por lo que se espera que en un futuro cercano, el número de pacientes con IP sea aún mayor. Además requieren largos períodos de antibioterapia, alargándose en algunos casos la estancia hospitalaria por fracaso terapéutico o necesidad de nuevas cirugías. Es necesario, por tanto, realizar un buen diagnóstico microbiológico de la infección, así como un estudio de sensibilidad antimicrobiana de los agentes etiológicos responsables, para dirigir el tratamiento farmacológico.

En este trabajo nos planteamos comparar, en un número poblacional elevado y durante la rutina asistencial, la utilidad del cultivo cuantitativo del líquido obtenido tras sonicación del implante, con ambas técnicas convencionales por separado y en conjunto. Es decir, comprobar si la sonicación ofrece ventajas en cuanto al diagnóstico microbiológico de IP frente al cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y/o el cultivo del tejido periprotésico, tanto para IP aguda, crónica y total.

Los datos obtenidos en nuestro trabajo demostraron que el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular presentó mejores parámetros estadísticos que ambas técnicas convencionales por separado y en conjunto, para todos los tipos de infección. En concreto, en infección crónica, el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular fue significativamente más sensible que ambas técnicas convencionales

Discusión

por separado e incluso cuando se llevan a cabo en conjunto. En infección total, el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular también fue significativamente más sensible que el cultivo del tejido periprotésico, pero probablemente esto sea debido a que la infección crónica fue la más representativa en cuanto a tamaño muestral en la infección total, por lo que parece lógico que los datos obtenidos en infección total sean de similares características que los de infección crónica. Por tanto, no consideramos apropiado establecer conclusiones sobre la utilidad del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular para el diagnóstico de IP total. Sin embargo, nuestros datos ponen de manifiesto la especial utilidad que el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular ofrece en el diagnóstico de IP crónica. Es sabido, que los cultivos de líquido articular inoculado en frasco de hemocultivo y el de tejido periprotésico, no son lo suficientemente sensibles para el diagnóstico de IP crónica[6, 14]. Por el contrario, en IP aguda, nuestros datos no demostraron superioridad del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular con respecto al cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y cultivo del tejido periprotésico en cuanto a términos de sensibilidad, lo cual concuerda con las conclusiones de otros autores[17, 124]. Esta idea está basada en el hecho de que, en infecciones crónicas, los microorganismos están embebidos en la matriz del biofilm sobre la superficie del material, y por tanto, el procesamiento del implante sí podría recuperar los microorganismos presentes.

Sin embargo, a pesar de la mayor sensibilidad del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular en comparación con el cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y cultivo del tejido periprotésico en IP crónica, encontramos que el primer método contó con 4 falsos negativos. Dos de ellos, debidos a *P. acnes* con crecimiento escaso, sí fueron diagnosticados mediante el cultivo del tejido

periprotésico. Una posible explicación a este hecho puede ser el bajo número de bacterias presentes en el implante que no resultaron viables tras la sonicación de la prótesis pero sí fueron viables tras el cultivo directo del tejido periprotésico. Por otra parte, el número de pacientes diagnosticados cuando las 3 técnicas se llevaron a cabo (cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular, cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y cultivo del tejido periprotésico) aumentó al compararlo con el número de pacientes diagnosticados por los métodos convencionales (cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y cultivo del tejido periprotésico). Este incremento de sensibilidad fue significativo en IP crónica y total, datos que concuerdan con el hecho de que el uso de ultrasonidos sea de utilidad en el diagnóstico de la infección crónica. Por tanto, se podría concluir que los tres métodos se complementan entre sí, incrementando notablemente el número de pacientes diagnosticados, en especial de IP crónica. Por ello que subrayamos la importancia de llevar a cabo los tres tipos de diagnóstico microbiológico de IP basados en el cultivo: cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular, cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y cultivo del tejido periprotésico.

También comparamos la sensibilidad de todos los métodos diagnósticos en pacientes que no habían tomado antibiótico previamente a la cirugía y aquellos que sí los habían recibido. En nuestro caso, aunque la sensibilidad disminuyó para los tres cultivos en el grupo de pacientes que recibió tratamiento antimicrobiano previo a la cirugía, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, probablemente debido al bajo tamaño muestral de ese grupo (n=18) en comparación al grupo que no recibió tratamiento antimicrobiano previo (n=100). Muchos autores han señalado que la toma de antibióticos previamente al procedimiento quirúrgico disminuye la sensibilidad del método diagnóstico, asociándose con cultivos negativos.^{20,[125-127]} Sin embargo, lo que no aún no

Discusión

está claramente establecido es el período durante el cual hay que interrumpir el tratamiento antimicrobiano antes de la cirugía para que la sensibilidad se reduzca lo menos posible[55, 127]. Aunque, de 2 a 4 semanas es el tiempo que la mayoría de autores cree conveniente[125, 127], Trampuz y cols encontraron que el tiempo óptimo era menor a dos semanas[55].

El pequeño tamaño muestral de algunos grupos ha sido una limitación de este trabajo, ya que ha impedido establecer ciertas asociaciones entre distintos parámetros. Además de no poder determinar relación entre la toma de antimicrobianos previos a la cirugía y la sensibilidad de los métodos diagnósticos, tampoco se ha podido determinar ninguna asociación concluyente en los pacientes con IP hematógena, ni concluir si los valores de RFA se correlacionaban con datos microbiológicos (por ejemplo, cultivos positivos o aislamientos de microorganismos más virulentos), a pesar de que inicialmente este estudio no estaba diseñado para comparar el diagnóstico microbiológico basado en el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular con parámetros analíticos o histológicos.

Cuando Trampuz y cols establecieron en 2007 el protocolo que hoy en día es ampliamente utilizado para el procesamiento de las prótesis articulares mediante sonicación[55], introdujeron el paso de vortear antes y después del proceso de la aplicación de ultrasonidos. En 2013, Portillo y cols[128] decidieron comparar este procedimiento estándar (vórtex más sonicación) con el procesamiento de las prótesis articulares únicamente mediante su paso por el vórtex. Aunque la sensibilidad del primer procedimiento fue notablemente superior (60% Vs 40%), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Además la especificidad fue del 99% en ambos casos, por lo que únicamente vortear las muestras se ha convertido en una alternativa considerable para el diagnóstico de IP cuando no es posible disponer de un baño de sonicación.

Debido al éxito que el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular había demostrado en diversos trabajos en el diagnóstico de la IP, decidimos aplicar el uso de ultrasonidos a los espaciadores para el diagnóstico de infección asociada al uso de estos dispositivos. Varios estudios han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la positividad del cultivo y la mala evolución de los pacientes[60, 62], lo cual también ha sido demostrado en nuestro trabajo. En 2014 Nelson y cols[61] llevaron a cabo un estudio similar al nuestro, con un enfoque semicuantitativo y con resultados similares pero con un número de pacientes menor. Sin embargo, todos estos estudios, aunque analizaron los resultados del cultivo del líquido de sonicación del espaciador no evaluaron la asociación entre el microorganismo aislado en el cultivo del líquido de sonicación del espaciador y el responsable de la primera infección.

En nuestro estudio, no sólo evaluamos datos microbiológicos, sino también una correlación entre esos datos microbiológicos y la presencia de infección clínica cuando se llevó a cabo la segunda cirugía del recambio en dos tiempos. En este sentido, la relación entre los datos clínico-microbiológicos y la mala evolución, no sólo se refirió a procesos infecciosos sino también funcionales, ya que dos pacientes necesitaron artroplastia de resección y uno amputación. No se detectó evidencia serológica de infección dentro de estos pacientes, lo cual probablemente signifique que la respuesta inflamatoria se inhibió debido al tratamiento antibiótico, a la naturaleza crónica de la nueva infección o a ambas razones.

Todos los nuevos microorganismos aislados excepto uno, presentaron resistencia a los antibióticos que recibieron los pacientes, así como a los que se incluyeron en el espaciador. En este mismo sentido, se aislaron microorganismos no tan comunes, como *Candida* spp y *Mycobacterium* spp, que presentan resistencia constitutiva a los antibióticos usados. Además, todos estos microbios crecieron antes de 7 días. Nuestro

Discusión

grupo de trabajo previamente encontró el mismo resultado en un estudio con muestras de tejido periprotésico y material de osteosíntesis[33], lo cual parece restarle importancia a las recomendaciones de Schafer y cols[32]. En la mayoría de los pacientes, los signos y síntomas persistieron, por lo que especulamos que una posible razón fuese la selección de microorganismos resistentes. Nuevos métodos diagnósticos sugieren que las infecciones polimicrobianas pueden ser más comunes de lo que eran previamente, e incluso, en las infecciones monomicrobianas es común detectar distintos clones con diferente sensibilidad antimicrobiana[129].

Una limitación del estudio fue que inicialmente los espaciadores se enviaban al laboratorio sólo cuando existía sospecha de infección, y durante el último año se enviaron todos los espaciadores para su procesamiento. Este hecho puede explicar la reducción en el número de resultados positivos y el porcentaje de pacientes con una mala evolución cuando la sonicación de espaciadores se introdujo en la rutina asistencial (pacientes 26-46).

De acuerdo a nuestra experiencia, la sonicación de los espaciadores aumenta la utilidad del cultivo del tejido periprotésico para el diagnóstico de infecciones asociadas al uso de espaciadores. Los pacientes con recuentos elevados del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación del espaciador tuvieron una peor evolución (ya sea funcional o relacionada con procesos de infección) que el resto. En los casos de recuentos bajos, la detección de microorganismos diferentes a aquellos obtenidos en el cultivo de muestras tras el primer tiempo, se asoció a peor evolución. Por ello consideramos que el espaciador actúa como un nuevo cuerpo extraño sobre el que los microorganismos, ya sean persistentes o nuevos, pueden desarrollar un nuevo biofilm. Por consiguiente, el uso de espaciadores de cemento en prótesis de rodillas puede ser un factor relacionado con la persistencia de infección. En prótesis de cadera, aunque la técnica de Girdlestone transitoria supone una

pérdida funcional importante para el paciente, existe la posibilidad de no utilizar el espaciador, por lo que puede tener un efecto protector. Sin embargo, hoy en día no se han desarrollado alternativas a la utilización de espaciadores para las rodillas por una limitación funcional (la retracción de los ligamentos, y en especial de los tendones, es una complicación no reversible), excepto realizar una cirugía en un tiempo en los casos de infección. En casos en los que un dolor inesperado, drenaje purulento, un aumento en los valores de la Proteína C Reactiva y otros signos y síntomas (como luxación del espaciador) ocurran, hay que sospechar de infección, y el paciente debe ser manejado como en otras infecciones asociadas al uso de implantes.

A pesar de que el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular ha mejorado la sensibilidad con respecto al diagnóstico microbiológico convencional basado en el cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y cultivo del tejido periprotésico, un número no despreciable de pacientes con infecciones asociadas al uso de implantes, permanece sin diagnosticar[6, 16, 58], por lo que se han comenzado a utilizar técnicas de biología molecular que tienen una sensibilidad notable, desde hace algunos años, llevadas a cabo a partir de tejido periprotésico o líquido obtenido tras sonicación de la prótesis. En concreto las PCR comerciales garantizan la reproducibilidad entre distintos centros por lo que suelen ser muy utilizadas. Sin embargo, inicialmente no se disponía de ningún kit comercial de PCR diseñado específicamente para el diagnóstico de IP, por lo que se utilizaron kits diseñados para detectar microorganismos a partir de hemocultivos, ya que estos kits incluían la mayoría de los agentes etiológicos de IP. Estos kits son: “SeptiFast multiplex PCR®” (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)[130, 131], “GenoType BC®” (una PCR universal) (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany)[132], y “FilmArray multiplex PCR” (bioMérieux Marcy-L’Etoile, France)[133]. Todos ellos se llevaron a cabo a partir del líquido obtenido tras sonicación

Discusión

de la prótesis. Sin embargo la sensibilidad y especificidad obtenida en estos trabajos fue muy variable y no incluían microorganismos como *P. acnes* o *Corynebacterium* spp.

Fue necesario por tanto diseñar kits comerciales para el diagnóstico de infección protésica osteoarticular. El primero de ellos, “Prove-it Bone and Joint StripArray assay”[134] es una PCR universal llevada a cabo a partir de tejido periprotésico, que a pesar de contar con una sensibilidad en torno al 80%, tiene una alta tasa de falsos positivos, además de que no incluye *P.acnes*, *S.viridans* ni *Mycoplasma* spp.

A continuación se muestran en la siguiente tabla las diferencias entre los distintos kits comerciales vistos hasta ahora.

Tabla 20. Comparación de las PCR no basadas en el sistema Unyvero i60 ITI® usadas para el diagnóstico de IP.

	PCR diseñadas para detectar microorganismos a partir de hemocultivos			PCR diseñada para el diagnóstico de IP
	SeptiFast (Roche)	GenoType BC (Hain)	Filmarray (bioMérieux)	Prove-it Bone
Tipo de PCR	Múltiple	Universal	Múltiple	Universal
Muestra	Líquido de sonicación de la prótesis	Líquido de sonicación de la prótesis	Líquido de sonicación de la prótesis	Tejido periprotésico
Tamaño muestral	37 y 86 ^(I)	258 prótesis de 126 pac	98	142 muestras de 61 pac
Sensibilidad	78% y 96% ^(II)	71,6%	<60%	82%
Especificidad	--- ^(III) y 100%	81,9%	99%	74%
Principales microorganismos no incluidos	<i>P.acnes</i> <i>Corynebacterium</i> spp Anaerobios <i>S. lugdunensis</i> ^(III)	<i>P.acnes</i> <i>Corynebacterium</i> spp Anaerobios <i>S. lugdunensis</i> Hongos	<i>P.acnes</i> <i>Corynebacterium</i> spp	<i>P.acnes</i> <i>S.viridans</i>
Mecanismos de resistencia	No	mecA van ^(IV)	mecA	No

^(I) El kit SeptiFast fue probado por dos grupos de trabajo diferentes.

^(II) El primer grupo de trabajo no incluyó grupo control por lo que la especificidad no pudo ser calculada.

^(III) Se incluye dentro del grupo SCN.

^(IV) Mecanismos de resistencia no evaluados en ese estudio.

El último kit comercial disponible en el mercado es el sistema “multiplex PCR Unyvero i60 implant and tissue infection” (ITI) ® cartridge (Curetis AG, Holzgerlingen,

Germany). Se trata de una PCR múltiple, fácil de ejecutar, especialmente diseñada para el diagnóstico de IP y que ofrece resultados rápidamente (alrededor de 5 horas). Los materiales a partir de los cuales se puede llevar a cabo son tejido periprotésico, líquido articular o líquido obtenido tras sonicación del implante. Además permite identificar los principales agentes etiológicos de IP así como los principales genes de resistencia antimicrobiana[135].

Varios grupos de trabajo han probado este kit. Borde y cols[136] llevaron a cabo un estudio piloto utilizando como muestra inicial biopsias de tejido peri-implante, y compararon esta PCR múltiple con una PCR universal y el diagnóstico basado en el cultivo. Aunque la especificidad obtenida fue muy buena, alrededor de un 95% y era un kit capaz de detectar mecanismos de resistencia, tuvo muchas limitaciones. En primer lugar la sensibilidad fue menor al 50%; no incluía algunos de los microorganismos más frecuentemente implicados en IP (*Staphylococcus lugdunensis*); y el pequeño tamaño muestral (79 muestras de tejido periprotésico de 28 pacientes) no permitió sacar conclusiones respecto a la utilidad del kit para detectar mecanismos de resistencia. Como conclusión global, este trabajo no estableció una superioridad de las técnicas de biología molecular con respecto al cultivo.

A pesar de las limitaciones que el kit Unyvero i60 ITI® presentó en este estudio piloto, cuenta con un potencial bastante elevado para el diagnóstico de IP, por lo que, nuestro grupo de trabajo decidió llevar a cabo un estudio de comparación de esta técnica de biología molecular con el cultivo cuantitativo de dicho líquido, cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y cultivo del tejido periprotésico en un número más elevado de pacientes. Además nos propusimos evaluar la utilidad de la detección de genes codificantes de mecanismos de resistencia que este método ofrece. Al haber llevado a cabo un estudio preliminar de comparación del cultivo del tejido

Discusión

periprotésico, cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular para el diagnóstico de IP, y comprobar que el último método es el más sensible, decidimos llevar a cabo la PCR a partir del líquido obtenido tras sonicación de la prótesis.

Los datos de sensibilidad y especificidad obtenidos fueron mayores que los del estudio piloto (60,5% y 98%, Vs 42,9% y 95,2%) además de que el tamaño muestral fue mayor y los mecanismos de resistencia detectados con esta PCR se correlacionaron bien con los del cultivo. Hischebeth y cols[137] llevaron a cabo otro estudio con el sistema Unyvero i60 ITI® unos meses antes. Los datos de sensibilidad y especificidad fueron ligeramente superiores a los nuestros (66,7% y 100%), aunque el tamaño muestral fue considerablemente más pequeño, reduciéndose a más de la mitad los pacientes incluidos (62 muestras de 31 pacientes). No estudiaron si existía una buena correlación entre los mecanismos de resistencia detectados por la PCR y los detectados mediante cultivo. Igual que en el trabajo de Borde y cols, no concluyeron que esta técnica de biología molecular fuera muy superior al diagnóstico basado en el cultivo.

Tabla 21. Comparación de los tres grupos de trabajo que utilizan el sistema Unyvero i60 ITI® para diagnóstico de IP.

	Prieto y cols	Borde y cols	Hischebeth y cols
Muestra	Líquido de sonicación de la prótesis	Tejido periprotésico	Líquido de sonicación de la prótesis y líquido articular
Tamaño muestral	88 muestras de 68 pac.	79 muestras de 28 pac.	62 muestras de 31 pac.
Sensibilidad	60,5%	< 50%	66,7%
Especificidad	98%	95,2%	100%
Mecanismos de resistencia	Buena correlación con los datos del cultivo	Datos no concluyentes	Correlación no estudiada

Encontramos 7 casos de pacientes con criterios de infección clínica en los que la técnica de biología molecular fue negativa pero alguno de los cultivos positivos (considerados falsos negativos de la PCR). Pero uno de ellos fue debido a *S. marcescens*, microorganismo no incluido en el kit, y el otro a *S. epidermidis* en un recuento muy bajo por lo que se consideró un contaminante y no el agente etiológico de la infección. Por tanto, asumimos que la técnica de biología molecular contó con 5 falsos negativos.

Resumiendo, la sensibilidad de la PCR fue menor que la del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular, pero mayor a la del cultivo del tejido periprotésico y cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y no se encontraron relaciones estadísticamente significativas cuando se comparó la sensibilidad de la PCR con la de los otros tres cultivos. Así que tal y como apoyan los otros grupos de trabajo que han ensayado con Unyvero i60 ITI®, [136, 137] esta técnica de biología molecular no es superior a los cultivos en términos de sensibilidad, por lo que el cultivo de las distintas muestras sigue siendo necesario para el diagnóstico de IP.

Por el contrario, la tasa de falsos positivos fue muy baja (E=98% y VPP=95,8%). Lo cual demuestra que prácticamente todos los resultados positivos se correspondieron con pacientes con IP.

Teniendo en cuenta estos datos, esta prueba estaría especialmente indicada en aquellos casos de pacientes con una altísima sospecha de infección clínica en los que se quiere obtener un resultado rápido que comprometa la decisión terapéutica del equipo médico encargado de estos pacientes, y que hayan recibido tratamiento antibiótico previo o haya sospecha de multi-resistencia, siempre que el resultado sea positivo. Sin embargo, un resultado negativo no descarta una infección en ningún caso.

Discusión

Se han llevado a cabo estudios económicos que evalúan el coste-beneficio del sistema Unyvero i60 ITI®. Aunque aún no se han publicado, sí se han comunicado a los congresos internacionales ECCMID[138] (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) e ISPOR[139] (International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research). Dichos estudios demuestran que en los casos en los que haya una alta sospecha de IP, es muy rentable económicamente llevar a cabo la PCR ya que se reduce el coste por paciente de manera significativa al poder realizar un diagnóstico rápido y dirigir el tratamiento antibiótico, por lo que la estancia hospitalaria disminuye.

Sin embargo, los principales inconvenientes que esta técnica presenta son, por un lado, la baja sensibilidad obtenida, lo cual significa que un resultado negativo no es concluyente para asegurar que el paciente no tiene IP, así como el hecho de que algunos mecanismos de resistencia y algunos microorganismos como *S. marcescens*, no estén incluidos en el kit. Y además son necesarios más estudios para evaluar la utilidad de esta PCR para el diagnóstico de IP en la rutina clínica utilizando otras muestras clínicas, especialmente líquido sinovial y tejido periprotésico.

8.3 Estudio prospectivo de evaluación del cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de drenajes abdominales para el diagnóstico de infección del sitio quirúrgico

En la actualidad, los tubos de drenaje se siguen empleando tras una cirugía abdominal para evitar la acumulación de líquido a ese nivel, a pesar de la controversia que existe acerca de si su uso conlleva más perjuicios que beneficios, especialmente, riesgo de infección del sitio quirúrgico[18, 20, 21, 25].

La sonicación de los tubos de drenaje y posterior cultivo tiene utilidad clínica. Por un lado, el cultivo cuantitativo llevado a cabo, se correlacionó de manera significativa con el valor del parámetro analítico de la Proteína C Reactiva. De tal forma que valores elevados de UFC/cm² se correspondieron con valores elevados de la Proteína C Reactiva. Si bien es cierto que este es un RFA considerado como un indicador de inflamación y no de infección necesariamente, recuentos elevados de UCF/mL, podrían asociarse con infección del sitio quirúrgico.

Por otro lado, se estableció una correlación entre datos microbiológicos y datos clínicos, en concreto, cuando el microorganismo aislado tras cultivo fue uno de los considerados patógenos potenciales. A pesar de que hemos encontrado que la toma de antimicrobianos previa a la retirada del dispositivo evitó el aislamiento de patógenos en el cultivo, la presencia de estos se relacionó con criterios clínicos de infección, complicaciones clínicas, y mayor recuento de leucocitos.

Por tanto, debido a que el aislamiento de patógenos es el parámetro microbiológico que se correlaciona con infección del sitio quirúrgico, podríamos considerar el recuento de 1.500 UFC/mL (que es el recuento mínimo en el que se aisló un patógeno), como el punto de corte que indica infección del sitio quirúrgico, al igual que recuentos superiores

Discusión

a 10^5 UCF/mL se correlacionan con infección urinaria,[140] o recuentos superiores a 15 UFC por placa según el cultivo semicuantitativo de la punta del catéter por la técnica de Maki, se correlaciona con datos sugestivos de bacteriemia asociada al uso de catéteres intravasculares[141]. Por tanto, nuestra recomendación es que, durante la práctica clínica, cuando se aísle un patógeno potencial en un recuento superior a 1.500 UFC/mL hay que tratarlo con el fármaco más adecuado según el estudio de sensibilidad antimicrobiana, incluso en pacientes que no presenten datos clínicos de infección, pero sí factores de riesgo, para evitar las complicaciones.

Además el aspecto seroso del punto de inserción del drenaje y su utilización durante 3 días o más, se relacionaron significativamente con el aislamiento de un patógeno, y en el caso de su uso durante 3 días o más, con criterios clínicos de infección de manera directa. Por tanto, concluimos que el drenaje ha de ser retirado tan pronto como el aspecto del punto de inserción se torne seroso y que su uso debe estar limitado a 3 días, debiendo ser recambiado tras este período de tiempo, si sigue siendo necesario su uso. Estos datos concuerdan con las conclusiones establecidas por otros grupos de trabajo, los cuales coinciden en que la retirada temprana del tubo de drenaje[142], en particular antes del cuarto[143] o décimo[144] día, evita el desarrollo de infección del sitio quirúrgico.

Cuando se aislaron en el cultivo microorganismos de la microbiota cutánea, no se encontró ninguna asociación clínico-microbiológica. Chisena y cols llegaron a la misma conclusión a través de un trabajo que llevaron a cabo sonicando la punta del drenaje. Establecieron que *S. epidermidis* era el principal microorganismo aislado de estos implantes, pero ninguno de los pacientes presentó criterios de infección clínica[145]. Teniendo en cuenta que los tubos de drenaje están en continuo contacto con los microorganismos que forman parte de la microbiota cutánea, cabe esperar que encontremos dichos microbios tras cultivar el líquido obtenido tras sonicación del

implante. Es decir, que estos microbios, ya de por sí poco virulentos, se encuentran colonizando los tubos de drenaje, pero no infectando.

También concluimos que los pacientes con dos tubos de drenaje o más no presentaron peor evolución que aquellos que tienen sólo uno, al igual que establecieron Shrikhande y cols[146]. Sin embargo, en nuestro trabajo, la proporción de ambos grupos no fue equitativa, ya que sólo un 22,9% de los pacientes tenían dos o más tubos de drenajes, frente al 77,1% que tenía sólo uno, con lo cual esta asociación debería ser estudiada nuevamente en un grupo poblacional más grande.

Es bien conocido que la composición química del material influye en la mayor o menor adherencia de los microorganismos al dispositivo, y por tanto, en la mayor o menor liberación de los mismos cuando el dispositivo es sonificado[73]. Por tanto la composición del tubo de drenaje podría influir en la adherencia bacteriana de determinados microorganismos sobre su superficie y por tanto, en la mayor o menor tasa de infección del sitio quirúrgico. Sin embargo, una vez más la proporción de los distintos tipos de tubos de drenaje no fue equitativa, ya que sólo un 8,6% eran de polivinilo y un 91,4% de silicona, y probablemente este fue el motivo de que no encontráramos ninguna relación estadísticamente significativa entre el tipo de material y la presencia de criterios de infección del sitio quirúrgico, ni con el aislamiento de patógenos en el cultivo.

Por tanto, el tamaño muestral fue una de las principales limitaciones de este estudio. Sería interesante en un futuro, ampliar el grupo poblacional para corroborar nuestras conclusiones, y comparar el cultivo cuantitativo del tubo de drenaje tras sonicación, con otras técnicas diagnósticas microbiológicas, como hemocultivos o cultivo de la herida quirúrgica.

9 CONCLUSIONES

1. El tiempo óptimo de exposición a ultrasonidos de baja frecuencia debe alcanzar los cinco minutos para recuperar la mayor cantidad de bacterias viables que forman parte de un biofilm.
2. Se deben de considerar variables cómo la “edad” del biofilm así como sus características monodérmicas o didérmicas para valorar diferentes tiempos de sonicación.
3. En infección protésica crónica el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular tiene una mayor sensibilidad que el cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y cultivo del tejido periprotésico.
4. En infección protésica aguda el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular no ofrece ninguna ventaja en cuanto a parámetros estadísticos (especialmente sensibilidad) con respecto al cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y cultivo del tejido periprotésico.
5. El cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular llevado a cabo junto con el diagnóstico convencional de infección protésica (cultivo del líquido articular inoculado en frasco de hemocultivos y cultivo del tejido periprotésico) aumenta significativamente el número de pacientes diagnosticados en infección crónica, por lo que sería recomendable llevar a cabo los tres tipos de cultivo para el diagnóstico de infección protésica.
6. El cultivo cuantitativo del líquido de sonicación del espaciador es útil para predecir la evolución de los pacientes con infección asociada al uso de estos dispositivos, ya que la positividad del cultivo, el recuento elevado y el aislamiento de un microorganismo diferente al detectado en muestras de la primera cirugía, se relacionan significativamente con mala evolución.

Conclusiones

7. Recuentos elevados y el aislamiento en el cultivo cuantitativo del líquido de sonicación del espaciador de un microorganismo diferente al detectado en muestras de la primera cirugía, se relacionan estadísticamente con infección. Por tanto, estos parámetros son útiles para el diagnóstico de infección asociada al uso de espaciadores.
8. El cultivo cuantitativo del líquido de sonicación del espaciador llevado a cabo junto con el cultivo del tejido periprotésico aumenta el número de pacientes diagnosticados de infección asociada al uso de espaciadores.
9. PCR Unyvero i60 ITI® ofrece buenos datos de especificidad y valor predictivo positivo por lo que debe utilizarse en la práctica clínica en casos donde exista una alta sospecha de infección protésica para confirmar la infección de manera sencilla y en cuestión de horas. Además esto permite disminuir la estancia hospitalaria y dirigir el tratamiento antimicrobiano, reduciéndose el coste por paciente.
10. PCR Unyvero i60 ITI® no ofrece clara mejoría con respecto al cultivo cuantitativo del líquido de sonicación de la prótesis articular, por lo que este debe seguir llevándose a cabo para el diagnóstico de infección protésica.
11. Un resultado negativo de PCR Unyvero i60 ITI® no permite nunca descartar una infección protésica.
12. Recuentos superiores a 1.500 UFC/mL de microorganismos considerados “patógenos potenciales” en el cultivo cuantitativo de los tubos de drenaje sonicados, se relaciona con criterios clínicos de infección, complicaciones clínicas y peor evolución del paciente. Incluso aunque el paciente no presente datos de infección, si presenta factores de riesgo y se aísla un patógeno en el cultivo, hay que tratarlo con antimicrobianos para evitar la aparición de complicaciones.

13. La duración del uso de los tubos de drenaje es un factor independiente para el desarrollo de infección del sitio quirúrgico. Para evitarla, los dispositivos deben ser retirados tan pronto como sea posible y en especial, en cuanto el aspecto del punto de inserción se torne seroso estando su uso limitado a 3 días. Si pasado este tiempo sigue siendo necesario su uso, el dispositivo ha de cambiarse.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. de Cueto-Lopez, M., et al., [*Microbiological diagnosis of medical device-associated infections*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2016. **34**(10): p. 655-660.
2. Gristina, A.G., *Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration*. *Science*, 1987. **237**(4822): p. 1588-95.
3. Ariza, J., et al., *Executive summary of management of prosthetic joint infections. Clinical practice guidelines by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC)*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2017. **35**(3): p. 189-195.
4. Christensen GD, B.L., Simpson WA., *Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci*, in *Infections associated with indwelling medical devices*, B.A. Waldvogel FA, Editor. 1994.
5. Fernández Viladrich P, G.L.J., Riera Jaume M. *Guía de recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de las infecciones asociadas a biomateriales*. 2006; Available from: https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/guiasclinicas/seimc-GuiaClinica2_2006_Biomateriales.pdf.
6. Tande, A.J. and R. Patel, *Prosthetic joint infection*. *Clin Microbiol Rev*, 2014. **27**(2): p. 302-45.
7. Osmon, D.R., et al., *Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America*. *Clin Infect Dis*, 2013. **56**(1): p. e1-e25.
8. Zimmerli, W., A. Trampuz, and P.E. Ochsner, *Prosthetic-joint infections*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(16): p. 1645-54.
9. Tsukayama, D.T., R. Estrada, and R.B. Gustilo, *Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections*. *J Bone Joint Surg Am*, 1996. **78**(4): p. 512-23.
10. *Cirugía articular-prótesis de cadera*. Available from: <http://www.cirugiaarticular.com/protesis/cadera/>.
11. *Exactech*. Available from: <https://www.exac.com/iberica/productos/knee/primary/optetrak-posterior-stabilized-es>.
12. Cobo, J. and J.L. Del Pozo, *Prosthetic joint infection: diagnosis and management*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2011. **9**(9): p. 787-802.
13. Maguire, N., B. Robertson, and P. Henman, *Girdlestone procedure for avascular necrosis of the hip in an intravenous drug user*. *J Surg Case Rep*, 2014. **2014**(8).
14. Font-Vizcarra, L., et al., *Blood culture flasks for culturing synovial fluid in prosthetic joint infections*. *Clin Orthop Relat Res*, 2010. **468**(8): p. 2238-43.
15. Peel, T.N., et al., *Early onset prosthetic hip and knee joint infection: treatment and outcomes in Victoria, Australia*. *J Hosp Infect*, 2012. **82**(4): p. 248-53.
16. Esteban, J., et al., *Conventional and molecular diagnostic strategies for prosthetic joint infections*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2014. **14**(1): p. 83-96.
17. Benito, N., et al., *Time trends in the aetiology of prosthetic joint infections: a multicentre cohort study*. *Clin Microbiol Infect*, 2016. **22**(8): p. 732 e1-8.

Bibliografía

18. Giovinazzo, F., et al., *Drain management after pancreatic resection: state of the art*. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2011. **18**(6): p. 779-84.
19. Mangram, A.J., et al., *Guideline for prevention of surgical site infection, 1999*. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Infect Control Hosp Epidemiol, 1999. **20**(4): p. 250-78; quiz 279-80.
20. Buchler, M.W. and H. Friess, *Evidence forward, drainage on retreat: still we ignore and drain!?* Ann Surg, 2006. **244**(1): p. 8-9.
21. Bassi, C., et al., *Early versus late drain removal after standard pancreatic resections: results of a prospective randomized trial*. Ann Surg, 2010. **252**(2): p. 207-14.
22. Yeo, C.J., *Pancreatic surgery 101: drain, no drain, early drain removal, or late drain removal. What are the data? Where do we go from here?* Ann Surg, 2010. **252**(2): p. 215-6.
23. Monson, J.R., et al., *Cholecystectomy is safer without drainage: the results of a prospective, randomized clinical trial*. Surgery, 1991. **109**(6): p. 740-6.
24. Raves, J.J., M. Slifkin, and D.L. Diamond, *A bacteriologic study comparing closed suction and simple conduit drainage*. Am J Surg, 1984. **148**(5): p. 618-20.
25. Tang, R., et al., *Risk factors for surgical site infection after elective resection of the colon and rectum: a single-center prospective study of 2,809 consecutive patients*. Ann Surg, 2001. **234**(2): p. 181-9.
26. C., S.M.V., *Sistema drenaje tipo Redón: retirar con vacío frente a retirar sin vacío*, in *Enfermería basada en la evidencia 2014*, Escuela universitaria de Enfermería de Leioa. p. 37.
27. Burillo, A., A. Moreno, and C. Salas, *[Microbiological diagnosis of infections of the skin and soft tissues]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2007. **25**(9): p. 579-86.
28. Hughes, J.G., et al., *Culture with BACTEC Peds Plus/F bottle compared with conventional methods for detection of bacteria in synovial fluid*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(12): p. 4468-71.
29. Bauer, T.W., et al., *Diagnosis of periprosthetic infection*. J Bone Joint Surg Am, 2006. **88**(4): p. 869-82.
30. Trampuz, A. and A.F. Widmer, *Infections associated with orthopedic implants*. Curr Opin Infect Dis, 2006. **19**(4): p. 349-56.
31. Atkins, B.L., et al., *Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(10): p. 2932-9.
32. Schafer, P., et al., *Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy*. Clin Infect Dis, 2008. **47**(11): p. 1403-9.
33. Esteban, J., et al., *Prolonged incubation time does not increase sensitivity for the diagnosis of implant-related infection using samples prepared by sonication of the implants*. Bone Joint J, 2013. **95-B**(7): p. 1001-6.
34. Maki, D.G., C.E. Weise, and H.W. Sarafin, *A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection*. N Engl J Med, 1977. **296**(23): p. 1305-9.

35. Pitt, W.G. and S.A. Ross, *Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth*. Biotechnol Prog, 2003. **19**(3): p. 1038-44.
36. Gao, S., et al., *Inactivation of bacteria and yeast using high-frequency ultrasound treatment*. Water Res, 2014. **60**: p. 93-104.
37. Cruz-Cansino Ndel, S., et al., *Effect of ultrasound on survival and growth of Escherichia coli in cactus pear juice during storage*. Braz J Microbiol, 2016. **47**(2): p. 431-7.
38. Chang, C.C. and K. Merritt, *Microbial adherence on poly(methyl methacrylate) (PMMA) surfaces*. J Biomed Mater Res, 1992. **26**(2): p. 197-207.
39. Stickler, D. and P. Hewett, *Activity of antiseptics against biofilms of mixed bacterial species growing on silicone surfaces*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1991. **10**(3): p. 157-62.
40. Oulahal-Lagsir, N., et al., *The development of an ultrasonic apparatus for the noninvasive and repeatable removal of fouling in food processing equipment*. Lett Appl Microbiol, 2000. **30**(1): p. 47-52.
41. Cádiz, U.d. *Sonogeles*. Available from: <http://www2.uca.es/grup-invest/geles/paginas/sonogeles.html>.
42. Koda, S., et al., *Inactivation of Escherichia coli and Streptococcus mutans by ultrasound at 500kHz*. Ultrason Sonochem, 2009. **16**(5): p. 655-9.
43. Wu, J. and W.L. Nyborg, *Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(10): p. 1103-16.
44. Erriu, M., et al., *Microbial biofilm modulation by ultrasound: current concepts and controversies*. Ultrason Sonochem, 2014. **21**(1): p. 15-22.
45. Gao, S., et al., *Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 2. A simple model for the inactivation mechanism*. Ultrason Sonochem, 2014. **21**(1): p. 454-60.
46. Maisonhaute, E., et al., *Surface acoustic cavitation understood via nanosecond electrochemistry. Part III: Shear stress in ultrasonic cleaning*. Ultrason Sonochem, 2002. **9**(6): p. 297-303.
47. Krishnamurthy, B. *Linkedin. Vacuum Pump - Importance of the Seal Water in Paper Industry*. 2014; Available from: <https://www.linkedin.com/pulse/20141103102348-56298564-vacuum-pump-importance-of-the-seal-water-in-paper-industry>.
48. Collis, J., et al., *Cavitation microstreaming and stress fields created by microbubbles*. Ultrasonics, 2010. **50**(2): p. 273-9.
49. Brennen, C.E., *Cavitation and Bubble Dynamics*. 1995: Oxford University Press New York.
50. Zuo, Y.Y., et al., *Quantification of high-power ultrasound induced damage on potato starch granules using light microscopy*. Ultrason Sonochem, 2012. **19**(3): p. 421-6.
51. Newman, C.M. and T. Bettinger, *Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer*. Gene Ther, 2007. **14**(6): p. 465-75.

Bibliografía

52. Cochran, S.A. and M.R. Prausnitz, *Sonoluminescence as an indicator of cell membrane disruption by acoustic cavitation*. *Ultrasound Med Biol*, 2001. **27**(6): p. 841-50.
53. Singer, A.J., et al., *The effects of low-frequency ultrasound on Staphylococcus epidermidis*. *Curr Microbiol*, 1999. **38**(3): p. 194-6.
54. Vollmer, A.C., et al., *Bacterial stress responses to 1-megahertz pulsed ultrasound in the presence of microbubbles*. *Appl Environ Microbiol*, 1998. **64**(10): p. 3927-31.
55. Trampuz, A., et al., *Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(7): p. 654-63.
56. Monsen, T., et al., *In vitro effect of ultrasound on bacteria and suggested protocol for sonication and diagnosis of prosthetic infections*. *J Clin Microbiol*, 2009. **47**(8): p. 2496-501.
57. Tunney, M.M., et al., *Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem*. *J Bone Joint Surg Br*, 1998. **80**(4): p. 568-72.
58. Zhai, Z., et al., *Meta-analysis of sonication fluid samples from prosthetic components for diagnosis of infection after total joint arthroplasty*. *J Clin Microbiol*, 2014. **52**(5): p. 1730-6.
59. Liu, H., et al., *The application of sonication in diagnosis of periprosthetic joint infection*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2017. **36**(1): p. 1-9.
60. Sorli, L., et al., *The relationship between microbiology results in the second of a two-stage exchange procedure using cement spacers and the outcome after revision total joint replacement for infection: the use of sonication to aid bacteriological analysis*. *J Bone Joint Surg Br*, 2012. **94**(2): p. 249-53.
61. Nelson, C.L., et al., *Sonication of antibiotic spacers predicts failure during two-stage revision for prosthetic knee and hip infections*. *Clin Orthop Relat Res*, 2014. **472**(7): p. 2208-14.
62. Mariconda, M., et al., *Sonication of antibiotic-loaded cement spacers in a two-stage revision protocol for infected joint arthroplasty*. *BMC Musculoskelet Disord*, 2013. **14**: p. 193.
63. Erb, S., et al., *Sonication for diagnosis of catheter-related infection is not better than traditional roll-plate culture: a prospective cohort study with 975 central venous catheters*. *Clin Infect Dis*, 2014. **59**(4): p. 541-4.
64. Slobbe, L., et al., *Comparison of the roll plate method to the sonication method to diagnose catheter colonization and bacteremia in patients with long-term tunnelled catheters: a randomized prospective study*. *J Clin Microbiol*, 2009. **47**(4): p. 885-8.
65. Rak, M., et al., *Detection of bacteria with molecular methods in prosthetic joint infection: sonication fluid better than periprosthetic tissue*. *Acta Orthop*, 2016. **87**(4): p. 339-45.
66. Gomez, E., et al., *Prosthetic joint infection diagnosis using broad-range PCR of biofilms dislodged from knee and hip arthroplasty surfaces using sonication*. *J Clin Microbiol*, 2012. **50**(11): p. 3501-8.

67. Cazanave, C., et al., *Rapid molecular microbiologic diagnosis of prosthetic joint infection*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(7): p. 2280-7.
68. Levy, P.Y. and F. Fenollar, *The role of molecular diagnostics in implant-associated bone and joint infection*. Clin Microbiol Infect, 2012. **18**(12): p. 1168-75.
69. Hartley, J.C. and K.A. Harris, *Molecular techniques for diagnosing prosthetic joint infections*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69 Suppl 1**: p. i21-4.
70. Busscher, H.J. and H.C. van der Mei, *How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state?* PLoS Pathog, 2012. **8**(1): p. e1002440.
71. Carpentier, B. and O. Cerf, *Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry*. J Appl Bacteriol, 1993. **75**(6): p. 499-511.
72. Costerton, J.W., et al., *Microbial biofilms*. Annu Rev Microbiol, 1995. **49**: p. 711-45.
73. An, Y.H. and R.J. Friedman, *Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces*. J Biomed Mater Res, 1998. **43**(3): p. 338-48.
74. Katsikogianni, M. and Y.F. Missirlis, *Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions*. Eur Cell Mater, 2004. **8**: p. 37-57.
75. Montanaro, L., et al., *Scenery of Staphylococcus implant infections in orthopedics*. Future Microbiol, 2011. **6**(11): p. 1329-49.
76. Berne, C., et al., *Adhesins Involved in Attachment to Abiotic Surfaces by Gram-Negative Bacteria*. Microbiol Spectr, 2015. **3**(4).
77. Hogt, A.H., et al., *Adhesion of coagulase-negative staphylococci to biomaterials*. J Gen Microbiol, 1983. **129**(9): p. 2959-68.
78. Fletcher, M. and K.C. Marshall, *Bubble contact angle method for evaluating substratum interfacial characteristics and its relevance to bacterial attachment*. Appl Environ Microbiol, 1982. **44**(1): p. 184-92.
79. Satou, N., et al., *Adherence of streptococci to surface-modified glass*. J Gen Microbiol, 1988. **134**(5): p. 1299-305.
80. Kohnen, W., et al., *Development of a long-lasting ventricular catheter impregnated with a combination of antibiotics*. Biomaterials, 2003. **24**(26): p. 4865-9.
81. Isberg, R.R. and P. Barnes, *Dancing with the host; flow-dependent bacterial adhesion*. Cell, 2002. **110**(1): p. 1-4.
82. Vaudaux, P.E., et al., *Adsorption of fibronectin onto polymethylmethacrylate and promotion of Staphylococcus aureus adherence*. Infect Immun, 1984. **45**(3): p. 768-74.
83. Herrmann, M., et al., *Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material*. J Infect Dis, 1988. **158**(4): p. 693-701.

Bibliografía

84. Dickinson, R.B., et al., *Quantitative comparison of shear-dependent Staphylococcus aureus adhesion to three polyurethane ionomer analogs with distinct surface properties*. J Biomed Mater Res, 1997. **36**(2): p. 152-62.
85. Baumgartner, J.N. and S.L. Cooper, *Influence of thrombus components in mediating Staphylococcus aureus adhesion to polyurethane surfaces*. J Biomed Mater Res, 1998. **40**(4): p. 660-70.
86. Kinnari, T.J., et al., *Bacterial adherence to SiO₂-based multifunctional bioceramics*. J Biomed Mater Res A, 2009. **89**(1): p. 215-23.
87. Scheuerman, T.R., A.K. Camper, and M.A. Hamilton, *Effects of Substratum Topography on Bacterial Adhesion*. J Colloid Interface Sci, 1998. **208**(1): p. 23-33.
88. Edwards KJ, R.A., *Microbial response to surface microtopography: the role of metabolism in localized mineral dissolution*. Chemical Geology, 2001. **180**(1-4): p. 19-32.
89. Flemming, H.C. and J. Wingender, *Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects*. Water Sci Technol, 2001. **43**(6): p. 1-8.
90. Dunne, W.M., Jr., *Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?* Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(2): p. 155-66.
91. Stoodley, P., et al., *Biofilms as complex differentiated communities*. Annu Rev Microbiol, 2002. **56**: p. 187-209.
92. Elder, M.J., et al., *Biofilm-related infections in ophthalmology*. Eye (Lond), 1995. **9 (Pt 1)**: p. 102-9.
93. del Pozo León JL, D.A.M., Guinea Ortega J, Macià Romero M. *Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas*. 2017; Available from: <http://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia60.pdf>.
94. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1318-22.
95. Cochrane, D.M., et al., *Antibody response to Pseudomonas aeruginosa surface protein antigens in a rat model of chronic lung infection*. J Med Microbiol, 1988. **27**(4): p. 255-61.
96. del Pozo, J.L. and R. Patel, *The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections*. Clin Pharmacol Ther, 2007. **82**(2): p. 204-9.
97. Costerton, J.W., et al., *Bacterial biofilms in nature and disease*. Annu Rev Microbiol, 1987. **41**: p. 435-64.
98. Lauderdale, K.J., et al., *Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus on orthopedic implant material*. J Orthop Res, 2010. **28**(1): p. 55-61.
99. Valle, J., et al., *SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol, 2003. **48**(4): p. 1075-87.

100. Perez-Jorge, C., et al., *In vitro* assessment of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* adhesion on TiO(2) nanotubes on Ti-6Al-4V alloy. *J Biomed Mater Res A*, 2012. **100**(7): p. 1696-705.
101. Herigstad, B., M. Hamilton, and J. Heersink, *How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria*. *J Microbiol Methods*, 2001. **44**(2): p. 121-9.
102. *Drop Plate Method for Counting Biofilm Cells - Instructions for Students*. Available from: http://biofilmbok.hypertextbookshop.com/public_version/contents/appendices/appendix002/pages/page007.html.
103. *Biofilm book. Drop Plate Method for Counting Biofilm Cells - Instructions for Students*. Available from: http://biofilmbok.hypertextbookshop.com/public_version/contents/appendices/appendix002/pages/page007.html.
104. Esteban, J., et al., *Evaluation of quantitative analysis of cultures from sonicated retrieved orthopedic implants in diagnosis of orthopedic infection*. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(2): p. 488-92.
105. Baumann, A.R., S.E. Martin, and H. Feng, *Power ultrasound treatment of *Listeria monocytogenes* in apple cider*. *J Food Prot*, 2005. **68**(11): p. 2333-40.
106. Kiang, W.S., et al., *Effects of thermosonication on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis in mango juice*. *Lett Appl Microbiol*, 2013. **56**(4): p. 251-7.
107. Czank, C., K. Simmer, and P.E. Hartmann, *Simultaneous pasteurization and homogenization of human milk by combining heat and ultrasound: effect on milk quality*. *J Dairy Res*, 2010. **77**(2): p. 183-9.
108. Song, H.P., et al., *Effect of gamma irradiation on the microbiological quality and antioxidant activity of fresh vegetable juice*. *Food Microbiol*, 2006. **23**(4): p. 372-8.
109. Jost, G.F., et al., *Sonication of catheter tips for improved detection of microorganisms on external ventricular drains and ventriculo-peritoneal shunts*. *J Clin Neurosci*, 2014. **21**(4): p. 578-82.
110. Oliva, A., et al., *Sonication of explanted cardiac implants improves microbial detection in cardiac device infections*. *J Clin Microbiol*, 2013. **51**(2): p. 496-502.
111. Inacio, R.C., et al., *Microbial diagnosis of infection and colonization of cardiac implantable electronic devices by use of sonication*. *Int J Infect Dis*, 2015. **38**: p. 54-9.
112. Thomaidis, P.C., et al., *Sonication assisted microbiological diagnosis of implant-related infection caused by *Prevotella disiens* and *Staphylococcus epidermidis* in a patient with cranioplasty*. *BMC Res Notes*, 2015. **8**: p. 307.
113. Bonkat, G., et al., *Improved detection of microbial ureteral stent colonisation by sonication*. *World J Urol*, 2011. **29**(1): p. 133-8.
114. Sherertz, R.J., et al., *Three-year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory*. *J Clin Microbiol*, 1990. **28**(1): p. 76-82.

Bibliografía

115. Stanley, K.D., et al., *Inactivation of Escherichia coli O157:H7 by high-intensity ultrasonication in the presence of salts*. Foodborne Pathog Dis, 2004. **1**(4): p. 267-80.
116. Lee, B.A., et al., *Osteoblastic behavior to zirconium coating on Ti-6Al-4V alloy*. J Adv Prosthodont, 2014. **6**(6): p. 512-20.
117. Ganapathy, P., et al., *Wear studies on plasma-sprayed Al₂O₃ and 8mole% of Yttrium-stabilized ZrO₂ composite coating on biomedical Ti-6Al-4V alloy for orthopedic joint application*. Int J Nanomedicine, 2015. **10** Suppl 1: p. 213-22.
118. Vollmer, W. and S.J. Seligman, *Architecture of peptidoglycan: more data and more models*. Trends Microbiol, 2010. **18**(2): p. 59-66.
119. Krishnan, V., *Pilins in gram-positive bacteria: A structural perspective*. IUBMB Life, 2015. **67**(7): p. 533-43.
120. Foster, T.J., et al., *Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus*. Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(1): p. 49-62.
121. Chen, C.Y., G.W. Nace, and P.L. Irwin, *A 6 x 6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of Campylobacter jejuni, Listeria monocytogenes, and Escherichia coli*. J Microbiol Methods, 2003. **55**(2): p. 475-9.
122. Naghili, H., et al., *Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests*. Vet Res Forum, 2013. **4**(3): p. 179-83.
123. Kurtz, S.M., et al., *Infection burden for hip and knee arthroplasty in the United States*. J Arthroplasty, 2008. **23**(7): p. 984-91.
124. Ludemann, C.M., N. Schutze, and M. Rudert, *[Diagnosis of periprosthetic hip infections]*. Oper Orthop Traumatol, 2015. **27**(3): p. 237-50; quiz 251.
125. Berbari, E.F., et al., *Culture-negative prosthetic joint infection*. Clin Infect Dis, 2007. **45**(9): p. 1113-9.
126. Trampuz, A., et al., *Sonication of explanted prosthetic components in bags for diagnosis of prosthetic joint infection is associated with risk of contamination*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(2): p. 628-31.
127. Malekzadeh, D., et al., *Prior use of antimicrobial therapy is a risk factor for culture-negative prosthetic joint infection*. Clin Orthop Relat Res, 2010. **468**(8): p. 2039-45.
128. Portillo, M.E., et al., *Sonication versus vortexing of implants for diagnosis of prosthetic joint infection*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(2): p. 591-4.
129. De-la-Fuente, M., et al., *Detection of Polyclonality among Clinical Isolates from Prosthetic Joint Infections*. J Clin Microbiol, 2015. **53**(12): p. 3766-72.
130. Achermann, Y., et al., *Improved diagnosis of periprosthetic joint infection by multiplex PCR of sonication fluid from removed implants*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(4): p. 1208-14.
131. Portillo, M.E., et al., *Multiplex PCR of sonication fluid accurately differentiates between prosthetic joint infection and aseptic failure*. J Infect, 2012. **65**(6): p. 541-8.

132. Esteban, J., et al., *PCR-hybridization after sonication improves diagnosis of implant-related infection*. Acta Orthop, 2012. **83**(3): p. 299-304.
133. Vasoo, S., et al., *Evaluation of the FilmArray Blood Culture ID Panel on Biofilms Dislodged from Explanted Arthroplasties for Prosthetic Joint Infection Diagnosis*. J Clin Microbiol, 2015. **53**(8): p. 2790-2.
134. Metso, L., et al., *Efficacy of a novel PCR- and microarray-based method in diagnosis of a prosthetic joint infection*. Acta Orthop, 2014. **85**(2): p. 165-70.
135. *Curetis Presents First Data on Novel Unyvero™ i60 ITI Application for Implant and Tissue Infections*. Available from: http://www.curetis.com/uploads/tx_news/20131022_Curetis_PR_i60_DGHM_EN_final.pdf.
136. Borde, J.P., et al., *Diagnosis of prosthetic joint infections using UMD-Universal Kit and the automated multiplex-PCR Unyvero i60 ITI((R)) cartridge system: a pilot study*. Infection, 2015. **43**(5): p. 551-60.
137. Hischebeth, G.T., et al., *Unyvero i60 implant and tissue infection (ITI) multiplex PCR system in diagnosing periprosthetic joint infection*. J Microbiol Methods, 2016. **121**: p. 27-32.
138. Torres C, O.I., Prieto-Borja L, Rodríguez-Sevilla G, Esteban J., *Cost analysis in patients with suspected chronic infection at musculoskeletal implants: PCR UNYVERO i60-ITI versus traditional technique*, 2017: 27° ESCMID, Viena.
139. Torres C, O.I., Prieto-Borja L, Rodríguez-Sevilla G, Esteban J., *Costs analysis of PCR Unyvero™ i60-ITI technique for detecting microorganisms in patients with suspected chronic infection at musculoskeletal implants”* 2015: 18° ISPOR, Milán
140. Kwon, J.H., et al., *Impact of laboratory-reported urine culture colony counts on the diagnosis and treatment of urinary tract infection for hospitalized patients*. Am J Clin Pathol, 2012. **137**(5): p. 778-84.
141. Bouza E, L.J., Pascual A. *Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a catéteres intravasculares. Procedimientos en Microbiología Clínica*. 2004; Available from: <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia15.pdf>.
142. Vecchio, R., et al., *Surgical drain after open or laparoscopic splenectomy: is it needed or contraindicated?* G Chir, 2015. **36**(3): p. 101-5.
143. Kawai, M., et al., *Early removal of prophylactic drains reduces the risk of intra-abdominal infections in patients with pancreatic head resection: prospective study for 104 consecutive patients*. Ann Surg, 2006. **244**(1): p. 1-7.
144. Fan, Y., et al., *[Risk factors of surgical site infection in definitive surgery of intestinal fistulas]*. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi, 2015. **18**(7): p. 646-50.
145. Chisena, S., et al., *[Importance of Staphylococcus epidermidis in the bacterial colonization of abdominal drains in surgical patients]*. Minerva Chir, 1991. **46**(6): p. 269-72.
146. Shrikhande, S.V., et al., *Post-operative abdominal drainage following major upper gastrointestinal surgery: single drain versus two drains*. J Cancer Res Ther, 2013. **9**(2): p. 267-71.

11 ANEXOS

RELACIÓN DE PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS

PUBLICACIONES

Prieto-Borja L, Rodriguez-Sevilla G, Auñon A, Pérez-Jorge C, Sandoval E, García-Cañete J, Gadea I, Fernandez-Roblas R, Blanco A, Esteban J. **Evaluation of a commercial multiplex PCR (Unyvero i60®) designed for the diagnosis of bone and joint infections using prosthetic-joint sonication.** *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016 Oct 18

Prieto-Borja L, Pérez-Tanoira R, Levano-Linares DC, Celdrán A, Mahillo-Fernández I, Esteban J. **Sonication of Abdominal Drainages: Clinical Implications of Quantitative Cultures for the Diagnosis of Surgical Site Infection.** *Surg Infect (Larchmt).* 2016 Aug 17

Esteban J, Gadea I, Pérez-Jorge C, Sandoval E, García-Cañete J, Fernandez-Roblas R, Blanco A, **Prieto-Borja L**, Cordero-Ampuero J. **Diagnosis of spacer-associated infection using quantitative cultures from sonicated antibiotics-loaded spacers: implications for the clinical outcome.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016 Feb

Prieto-Borja Laura, Conde A, Arenas M, de Damborenea J, Esteban J. **Influence of exposure time on the release of bacteria from a biofilm on Ti6Al4V discs using sonication. An in vitro model.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2017 May. Aceptado con cambios.

Prieto-Borja Laura, Auñón A, Blanco A, Fernández-Roblas R, Gadea I, García-Cañete I, Parrón R, Esteban J. **Evaluation of the use of sonication of retrieved implants for diagnosis of prosthetic joint infection in a routine setting: results of a 3-year experience.** Enviado

CAPÍTULOS EN LIBROS

Prieto-Borja L, Pérez-Jorge C, Esteban J. *Chapter 14: Microbiological Diagnosis of Prosthetic Joint Infections.* The Microbiology of Skin, Soft Tissue, Bone and Joint Infections.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Mayo 2017: 21º SEIMC, Málaga “**Influencia del tiempo de sonicación en la liberación de bacterias de un biofilm en discos de titanio aluminio vanadio**” **Laura Prieto-Borja**, Ana Conde, María Ángeles Arenas, Juan José De Damborenea, Jaime Esteban Moreno.

Noviembre 2016: 27º ESCMID, Viena. “**Cost analysis in patients with suspected chronic infection at musculoskeletal implants: PCR UNYVERO i60-ITI versus traditional technique**” Covadonga Torres, Itziar Oyagüez, **Laura Prieto**, Graciela Sevilla, Jaime Esteban.

Noviembre 2015: 18º ISPOR, Milán “**Costs analysis of PCR Unyvero™ i60-ITI technique for detecting microorganisms in patients with suspected chronic infection at musculoskeletal implants**” Covadonga Torres, Itziar Oyagüez, **Laura Prieto**, Graciela Sevilla, Jaime Esteban.

Abril 2015: 25° ESCMID, Copenhagen. **“Evaluation of a new multiplex PCR assay of the sonicated implant for the diagnosis of Prosthetic Joint Infection”** Rodríguez-Sevilla G, **Prieto-Borja** L, Blanco A, Cimas D, Fernández-Roblas R, Gadea I, García-Cañete J, Sandoval E, Martínez-Pérez M, Esteban Jaime.

Mayo 2015: 16° EFFORT, Praga **“Evaluation of the use of sonication for the diagnosis of prosthetic joint infection in a routine setting: results of a 3-year experience”** **Prieto-Borja** L, García-Coca M, González-Pallarés Iris, Sandoval E, Garcia Cañete J, Gadea I, Cimas D, Blanco A, Esteban J

Mayo 2014: 24° ESCMID, Barcelona **“Evaluation of sonication of drainage tubes. Clinical implications of quantitative cultures”** **Prieto-Borja** L, Ramón Pérez-Tanoira, Dennis-César Levano-Linares, Ángel Celdrán, Jaime Esteban.

Abril 2016: 26° ESCMID, Amsterdam **“Bacterial adherence on titanium-coated meshes and other commercial prosthetic meshes used in abdominal surgery”** Laura **Prieto-Borja**, Ramón Pérez-Tanoira, Dennis-César Levano-Linares, Ángel Celdrán, Jaime Esteban.

OTRAS COMUNICACIONES A CONGRESOS RELACIONADAS CON LA SONICACIÓN DE IMPLANTES

Abril 2016: 26° ESCMID, Amsterdam **“Bacterial adherence on titanium-coated meshes and other commercial prosthetic meshes used in abdominal surgery”** Laura **Prieto-Borja**, Ramón Pérez-Tanoira, Dennis-César Levano-Linares, Ángel Celdrán, Jaime Esteban.

Mayo 2014: 24° ESCMID, Barcelona “Evaluation of *Staphylococcus sp* adherence to titanium-coated prosthetic mesh”. Prieto-Borja L, Ramón Pérez-Tanoira, Dennis-César Levano-Linares, Ángel Celdrán, Jaime Esteban

