

Diagnóstico etiológico de las mastitis infecciosas: propuesta de protocolo para el cultivo de muestras de leche humana

R. Arroyo, P. Mediano, V. Martín, E. Jiménez, S. Delgado, L. Fernández, M. Marín, J.M. Rodríguez
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid

Resumen

En condiciones fisiológicas, la microbiota mamaria de una mujer lactante se caracteriza por la presencia de una población relativamente heterogénea, dominada por ciertas bacterias grampositivas, en una concentración moderada (<1.000 unidades formadoras de colonias/mL de leche). Sin embargo, hay ciertas circunstancias que pueden conducir a una auténtica disbiosis de la microbiota normal de la glándula mamaria y a una mastitis. Se trata de un problema infravalorado, en gran medida por la ausencia de protocolos para la recogida de este fluido biológico, por la falta de tradición en el análisis microbiológico de la leche humana y por las dudas que suelen surgir a la hora de interpretar los resultados. En este artículo se presenta un protocolo básico para la recogida de muestras de leche humana para su análisis microbiológico y se ofrecen unas pautas sencillas para la interpretación de los resultados.

Palabras clave

Mastitis, leche humana, análisis microbiológico, protocolo, cultivo

Abstract

Title: Etiological diagnosis of infectious mastitis: proposal of a protocol for the culture of human milk samples

During lactation, the physiological mammary microbiotas characterized by the presence of a relatively heterogeneous population, dominated by certain Gram-positive bacteria, at a moderated concentration (<1,000 CFU/mL milk). However, there are circumstances that may lead to a disbiotic process of the mammary gland microbiota, leading to mastitis. This is a widely underrated condition, partly due to the absence of uniform protocols for the collection of this biological fluid, the lack of tradition in microbiological analysis of human milk, and the doubts that sometimes arise when the results interpretation is being done. In this article, we present a basic protocol for the collection of human milk samples for their microbiological analysis and simple guidelines in order to facilitate the interpretation of the results.

Keywords

Mastitis, human milk, microbiological analysis, protocol, culture

Introducción

Tradicionalmente, se había considerado que la leche humana era estéril mientras se encontraba dentro de la glándula mamaria. Sin embargo, actualmente sabemos que constituye una fuente de bacterias para el intestino infantil¹⁻⁴, y uno de los factores clave en la iniciación y el desarrollo de la microbiota intestinal del neonato⁵⁻⁷. En su mayor parte, estas bacterias no provienen de la contaminación a partir del contacto con la piel, sino que constituyen una auténtica microbiota mamaria, que se empieza a formar durante el último tercio del embarazo y que desaparece tras el destete⁸. En condiciones fisiológicas, los cultivos de leche se caracterizan, cualitativamente, por la presencia de una población relativamente heterogénea, dominada por estafilococos, estreptococos, bifidobacterias, bacterias lácticas y algunas otras bacterias grampositivas; todas ellas parecen desempeñar funciones importantes para la homeostasis mamaria y del lactante. Desde un punto de vista cuantitativo, la concentración bacteriana en leche fresca obtenida de

una mujer sana (y en las condiciones que se comentarán posteriormente) es muy moderada, y habitualmente se sitúa en torno a 100-300 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, aunque en algunos casos se pueden alcanzar valores de hasta aproximadamente 1.000 UFC/mL.

Sin embargo, hay ciertas circunstancias que pueden conducir a una auténtica disbiosis de la microbiota normal de la glándula mamaria, con un aumento notable y rápido de la concentración de los agentes causales de mastitis (habitualmente estafilococos y estreptococos) y la progresiva desaparición del resto de las bacterias «fisiológicas» de la leche (lactobacilos, lactococos, enterococos, bifidobacterias...) mediante procesos de exclusión competitiva⁹. Esta alteración conduce a la inflamación y la posterior obstrucción de los conductos galactóforos, dando lugar a una mastitis^{10,11}. Algunas mastitis pueden cursar de forma aguda y con una sintomatología florida, tanto local como general (fiebre, escalofríos, infartación de ganglios, malestar general, cefaleas...), e incluso derivar en un absceso

so¹²; el agente etiológico de tales casos es, casi invariablemente, *Staphylococcus aureus*¹³. Sin embargo, en la mayoría de las mastitis, los síntomas se restringen a la glándula mamaria y se caracterizan por un dolor intenso en forma de pinchazos, calambres o sensación de quemazón, acompañado o no de lesiones en el pezón. En algunas ocasiones, la mastitis puede incluso ser subclínica y caracterizarse por una falsa sensación de disminución en la producción de leche (cuando en realidad está afectada la secreción debido a la obstrucción de conductos). En estos casos, los agentes responsables suelen ser estafilococos coagulasa-negativos (fundamentalmente *Staphylococcus epidermidis*)¹⁴ y algunas especies de estreptococos, como *Streptococcus mitis* o *Streptococcus salivarius*.

Necesidad de los cultivos de leche humana para el diagnóstico de mastitis

La mastitis humana constituye un problema tan infravalorado como infradiagnosticado^{10,11}. Este hecho se debe, por una parte, a que únicamente se suelen considerar como tales los casos agudos que cursan con enrojecimiento del pecho y fiebre elevada y, por otra parte, a que los casos en que se realiza un cultivo de leche son verdaderamente excepcionales y, cuando se hacen, la recogida de la muestra y/o la interpretación de los resultados suele ser errónea. En tales circunstancias, el diagnóstico de «mastitis» se suele basar en la inspección visual del pecho, lo que no sólo excluye a la mayoría de los casos, sino que fomenta falsas creencias, como el mito de las candidas (la popular frase «tiene hongos»)^{10,15}. Por tanto, la posibilidad de un error en el diagnóstico es muy elevada.

Pero el cultivo de leche no sólo es esencial para el diagnóstico etiológico de una mastitis, sino que suele ser clave para el éxito del abordaje terapéutico. Habitualmente, el tratamiento de la mastitis se instaura de forma empírica y suele consistir en la prescripción de cloxacilina, amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, mupirocina o eritromicina. Desafortunadamente, un porcentaje cada vez más elevado de cepas implicadas en la mastitis son resistentes a estos antibióticos, una situación que se ha descrito previamente para las cepas asociadas con la mastitis bovina. Por este motivo, una parte de las mastitis tratadas con antibióticos derivan en una infección crónica o recurrente. Además, en los cultivos de leche es frecuente aislar dos o más especies implicadas en un mismo caso de mastitis y, si todas ellas no son sensibles al antibiótico elegido, se puede eliminar uno de los agentes causales pero fomentar el crecimiento de la bacteria resistente. En conclusión, el tratamiento de las mastitis infecciosas debería instaurarse tras un análisis microbiológico que determine el agente causal y su sensibilidad a los antibióticos.

Ante la ausencia de un diagnóstico etiológico y la frecuente prescripción de un tratamiento inadecuado, las mujeres con este problema suelen enfrentarse a un difícil dilema: a) seguir amamantando a su hijo aguantando el dolor y el resto de síntomas lo mejor posible y, en muchos casos, ante la incompre-

sión de su propio entorno médico y/o familiar, o b) abandonar la lactancia. Sin embargo, un número creciente de mujeres lactantes que se encuentran ante este problema exigen una tercera vía: un correcto diagnóstico y un tratamiento acorde con su caso particular. En este contexto, la implantación sistemática de los cultivos de leche en los servicios de microbiología de los hospitales puede ofrecer una solución para un buen porcentaje de casos. Este hecho no es caprichoso ni banal, ya que la lactancia materna está siendo objeto de un renovado interés en los países desarrollados debido a los beneficios que este tipo de alimentación proporciona a la pareja madre-hijo a corto, medio y largo plazo^{16,17}.

Obtención y conservación de las muestras

Las instrucciones para la recogida de la muestra son responsabilidad directa del médico que solicita el cultivo, quien debe proporcionarlas (él o el personal sanitario encargado de la paciente) de forma clara y sencilla, cerciorándose de su adecuada comprensión. En general, las muestras de leche se deben recoger siguiendo las siguientes instrucciones (figura 1):

1. Las muestras se deben recoger inmediatamente antes de una toma y, si es posible, tras haber transcurrido al menos 2 horas desde la toma anterior. Si se van a procesar en el servicio de microbiología de un hospital público, el mejor momento para su recogida sería tras la primera toma de la mañana (6.00-9.00 h); de este modo, la recogida se sincronizaría con el periodo habitual para otro tipo de muestras biológicas (orina, sangre...) en los centros de atención primaria; por otra parte, se evitarían posibles fluctuaciones relacionadas con el ritmo circadiano.
2. Tras la toma anterior a aquella en la que se vayan a recoger las muestras para el cultivo, no se debe aplicar ningún tipo de pomada o solución tópica (lanolina, antibióticos, antisépticos, antiinflamatorios, productos de homeopatía...) ni tampoco utilizar ningún tipo de accesorio (conchas...) que provoque una acumulación de leche en contacto directo con las areolas mamarias y los pezones; en caso contrario, se deben lavar dichas partes del pecho con agua templada y jabón neutro, y secarlos con una toalla limpia o una toallita de un solo uso inmediatamente antes de la recogida.
3. Inmediatamente antes de la recogida, la paciente debe lavarse las manos con agua caliente y jabón (o un producto similar) y secárselas con una toalla limpia o una toallita de un solo uso.
4. Tras la estimulación previa del pecho, la recogida de muestras de leche destinadas a un análisis microbiológico se debe efectuar mediante presión manual, sin la ayuda de ningún tipo de accesorio (pezoneras, formadores de pezones...). En ningún caso se deben emplear extractores (sacaleches). Todos estos utensilios pueden ser una fuente importante de microorganismos ajenos a la glándula mamaria, que persisten tras la aplicación de los protocolos de limpieza y/o desinfección recomendados por los fabricantes¹⁸⁻²⁰. Por tanto, su

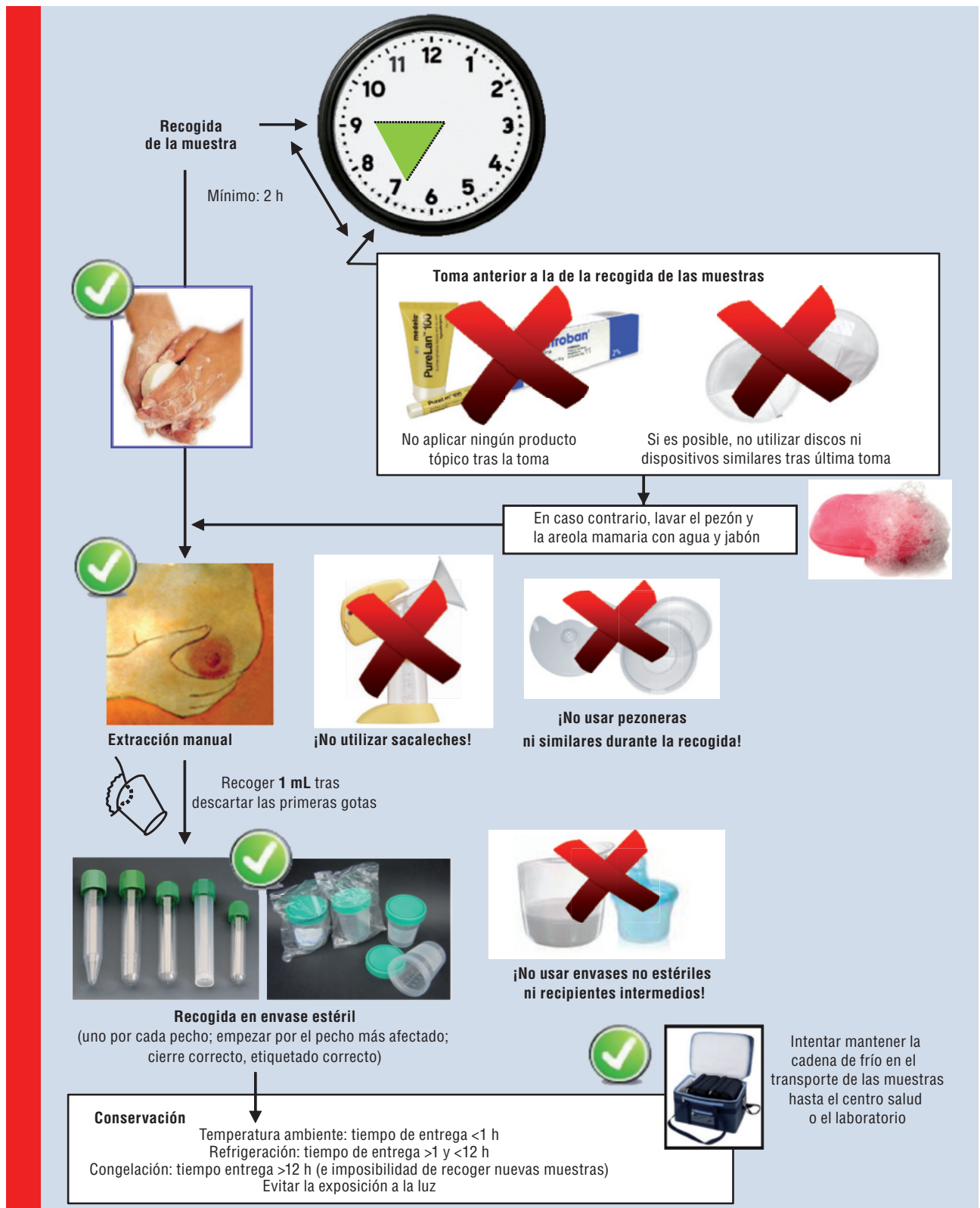


Figura 1. Esquema de los principales pasos a seguir para la recogida de muestras de leche destinadas a un análisis microbiológico

presencia puede enmascarar los verdaderos agentes responsables de una mastitis. En general, los microorganismos contaminantes suelen ser enterobacterias, *Pseudomonas* spp. y afines (*Stenotrophomonas* spp., etc.) y levaduras, que acostumbra a estar ausentes o presentes en concentraciones muy bajas en la leche humana. Muchos de ellos son psicrotrofos, por lo que siguen proliferando durante la conservación de la leche en frío. Por otra parte, conviene recordar que el agua potable con la que se lavan o aclaran las bombas y otros accesorios suele contener cantidades relativamente elevadas de algunos de estos microorganismos.

En un caso reciente, que puede resultar ilustrativo, a una mujer se le diagnosticó una mastitis por *Stenotrophomonas maltophilia*, ya que en el laboratorio de microbiología del hospital de referencia se encontró una gran concentración de una cepa de este género en la muestra analizada. Como la cepa era sensible a la amoxicilina, se prescribió este tratamiento. Ante la ineficacia del tratamiento, se remitieron muestras extraídas manualmente a nuestro laboratorio, donde se observó que realmente el agente causal era una cepa de *S. epidermidis* resistente a ese antibiótico. Esta cepa también había sido detectada en el hospital, pero se desestimó como agente causal por ser «saprofita o posible contaminante». Es decir, justo los papeles cambiados. La cepa de *S. maltophilia* se aisló del equipo de bombeo y del agua del grifo empleado para su lavado, pero no de la leche obtenida por expresión manual.

5. Las muestras de leche se deben recoger en envases estériles, como los empleados habitualmente para el análisis de muestras de orina o heces. Hay que recoger una muestra de cada pecho (cada una en un envase independiente), empezando por el pecho que esté menos afectado en el momento de la recogida, descartando las primeras gotas de leche (aunque este hecho parece no afectar significativamente al resultado del análisis microbiológico). Si los dos pechos tienen aproximadamente el mismo nivel de afectación, el orden es indiferente. El recipiente se debe colocar debajo del pezón, dentro de la areola mamaria.
6. Evitar tocar el interior del frasco o del tapón con los dedos, así como el contacto con cuerpos extraños.
7. No utilizar nunca recipientes intermediarios (cucharas, biberones, vasos, botellas, etc.) para recoger la leche antes de transferirla al envase estéril.
8. El volumen necesario para el cultivo de una muestra de leche es de 1 mL. Habitualmente, se siembra la muestra sin diluir y las diluciones -1 y -2 (5-50 µL por medio de cultivo).
9. Cerrar perfectamente el frasco para evitar derramamientos durante su transporte.
10. Rellenar una etiqueta con el nombre, apellidos, pecho del que procede la muestra y fecha y hora de la recogida. Pegar la etiqueta sobre el frasco seco. Obviamente, esto no será necesario cuando el análisis se realice en un centro de salud mediante el volante correspondiente ya que, en tal caso, llevará un código identificativo.
11. Las muestras pueden permanecer sin refrigerar un máximo de 1 hora. Si el tiempo de entrega va a ser superior a 1 hora,

se pueden mantener en refrigeración a 4° C durante un máximo de 12 horas. Si el tiempo de entrega de las muestras va a ser superior a 12 horas, y no hay posibilidad de obtener nuevas muestras, es preferible conservarlas congeladas a una temperatura igual o inferior a -20 °C, sin que se rompa la cadena de frío.

Recepción de las muestras

Durante la recepción de una muestra de leche hay que comprobar los siguientes aspectos:

1. Las muestras han sido remitidas en recipientes estériles. En caso contrario no se admitirán, explicando a la paciente la necesidad de una esterilidad absoluta del recipiente de recogida para garantizar la calidad de los resultados emitidos.
2. El tapón de rosca está perfectamente cerrado y no se ha derramado la muestra. En caso contrario no se admitirá la muestra, explicando a la paciente la necesidad de una estanqueidad absoluta del recipiente para evitar la contaminación de la muestra y así garantizar la calidad de los resultados emitidos.
3. El frasco porta una etiqueta con un código adecuado o con el nombre y los apellidos de la paciente, pecho (derecho o izquierdo) y fecha y hora de recogida. En caso contrario se solicitarán los datos necesarios.

Siempre que la muestra no se haya remitido en condiciones apropiadas, se proporcionará a la paciente una hoja de instrucciones de recogida de muestras de leche para un análisis microbiológico.

Siembra de las muestras

Los medios de cultivo que se emplean habitualmente en nuestro laboratorio son el agar Columbia con ácido nalidíxico (CNA; aislamiento de estafilococos, estreptococos, enterococos, corinebacterias...), el agar Baird Parker (BP; aislamiento de estafilococos), el agar MacConkey (MCK; aislamiento de enterobacterias) y el agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol (SDC; aislamiento de levaduras). Entre todos ellos, el único medio imprescindible es el CNA (o, en su defecto, algún otro tipo de agar sangre), ya que permite el crecimiento simultáneo de la mayoría de las especies causantes de mastitis. En nuestro caso, los medios MCK y SDC se emplean fundamentalmente para comprobar que no ha habido contaminación de las muestras.

En principio, cualquier técnica de siembra de muestras biológicas es aplicable a las muestras de leche: desde la técnica de siembra con asa calibrada de 5 µL en forma de estría longitudinal, seguida de agotamiento total de la placa (muy extendida en los servicios de microbiología de los hospitales), hasta los sistemas semiautomáticos de siembra en espiral. Cualquiera de ellas permite la cuantificación de los microorganismos presentes en la muestra (figura 2).

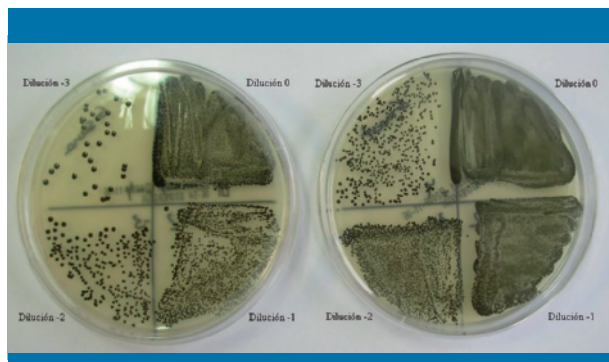


Figura 2. Placas de medio Baird Parker tras la siembra y la incubación de muestras de leche humana. Izquierda: mastitis por *Staphylococcus aureus*; derecha: mastitis por *Staphylococcus epidermidis*

Las placas sembradas se deben incubar a 35-37 °C en atmósfera aerobia, con placa invertida. La lectura se debe realizar a las 24-48 horas. Los resultados recogerán la concentración de cada especie presente en la muestra, expresada en UFC/mL. El hecho de no observar colonias en las placas no significa que no haya bacterias en la muestra, sino que éstas pueden estar presentes en una concentración inferior a la de su límite de detección. En tal caso, el resultado será «no se detecta crecimiento bacteriano» o «inferior al valor del límite de detección» (p. ej., 100 UFC/mL).

La identificación de las especies implicadas no debería plantear ningún problema para un laboratorio de microbiología clínica. Para ello, se pueden utilizar diversas técnicas (clásicas, Wíder, Vitek, MALDI-TOF...). Posiblemente, el mayor reto estribe en una correcta identificación de algunas de las especies de estreptococos del grupo *viridans*, ya que son difíciles de diferenciar tanto en los medios de cultivo como con algunos de los procedimientos de identificación habituales. No obstante, en caso de duda, se puede conseguir mediante secuenciación de ciertos genes (evitando el que codifica la fracción 16S del ARNr, ya que su poder discriminatorio es muy bajo para los estreptococos), reacción en cadena de la polimerasa específica de especie y/o algunas pruebas fenotípicas (optoquina, solubilidad en bilis...).

Interpretación de los resultados

La mayor o menor severidad de la sintomatología asociada a una mastitis está estrechamente relacionada con la especie o las especies bacterianas implicadas, su concentración, las características de la cepa y el estado del hospedador.

En cualquier caso, cuando se analizan muestras de leche resulta fundamental no considerar la presencia de estafilococos coagulasa-negativos (especialmente *S. epidermidis*) y estreptococos del grupo *viridans* (especialmente *S. mitis* y *S. salivarius*) como «flora contaminante» o «flora saprofita», sino como agentes potencialmente causantes de mastitis. Desafortunadamente, esa apreciación suele ser habitual y conduce a un diagnóstico

erróneo. En este sentido, la presencia de estas especies en leche siempre debe considerarse relevante, como sucede con *S. epidermidis* en muestras de infecciones hospitalarias asociadas a catéteres. Por consiguiente, se debe proceder a determinar su antibiograma. En condiciones fisiológicas, la concentración de estafilococos coagulasa-negativos, estreptococos del grupo *viridans* y bacterias afines (*Rothia* spp., *Kocuria* spp., etc.) en muestras de leche recogida en las condiciones descritas anteriormente suele oscilar entre 100 y 300 UFC/mL, con un límite máximo de, aproximadamente, 1.000 UFC/mL. Cualquier valor por encima de esta concentración puede ser compatible con una mastitis infecciosa. No obstante, el valor suele estar notablemente aumentado (>5.000 UFC/mL).

S. aureus y *Corynebacterium* spp. no suelen estar presentes en la leche humana en condiciones fisiológicas y pueden provocar mastitis en concentraciones mucho más bajas que las especies antes citadas (<500 UFC/mL).

Como se ha comentado anteriormente, la presencia de bacterias gramnegativas (*E. coli*, otros coliformes, *Stenotrophomonas*...) y levaduras suele estar asociada a un protocolo inadecuado de recogida de las muestras. En tales casos, pueden estar presentes en concentraciones elevadas para este tipo de muestras (>1.000 UFC/mL).

Bibliografía

1. Beasley SS, Saris, PEJ. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. Appl Environ Microbiol. 2004; 70: 5.051-5.053.
2. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. J Pediatr. 2003; 143: 754-758.
3. Martín R, Olivares M, Marín ML, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. J Hum Lact. 2005; 21: 8-17.
4. Rodríguez JM, Jiménez E, Merino V, Maldonado ML, Marín ML, Fernández L, et al. Microbiota de la leche humana en condiciones fisiológicas. Acta Pediatr Esp. 2008; 66: 77-82.
5. Martín R, Heilig HG, Zoetendal EG, Rodríguez JM. Diversity of the Lactobacillus group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. J Appl Microbiol. 2007; 103: 2.638-2.644.
6. Jiménez E, Delgado S, Maldonado A, Arroyo R, Albújar M, García N, et al. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. BMC Microbiol. 2008.
7. Martín R, Jiménez E, Heilig H, Fernández L, Marín M, Zoetendal EG, et al. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. Appl Environ Microbiol. 2009; 75: 965-969.
8. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Olivares M, et al. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. Trends Food Sci Technol. 2004; 15: 121-127.
9. Delgado S, Arroyo R, Martín R, Rodríguez JM. PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis. BMC Infect Dis. 2008; 8: 51.

10. Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado (I). Acta Pediatr Esp. 2009; 67: 77-84.
11. Jiménez E, Delgado S, Arroyo R, Fernández L, Rodríguez JM. Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado (II). Acta Pediatr Esp. 2009; 67: 125-132.
12. Amir LH, Forster D, McLachlan H, Lumley J. Incidence of breast abscess in lactating women: report from an Australian cohort. BJOG. 2004; 111: 1.378-1.381.
13. Stafford I, Hernández J, Laibl V, Sheffield J, Roberts S, Wendel G. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among patients with puerperal mastitis requiring hospitalization. Obstet Gynecol. 2008; 112: 533-537.
14. Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, Herrero E, Del Campo R, Marín M, et al. *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. BMC Microbiol. 2009; 9: 82.
15. Carmichael AR, Dixon JM. Is lactation mastitis and shooting breast pain experienced by women during lactation caused by *Candida albicans*? Breast. 2002; 11: 88-90.
16. Schack-Nielsen L, Larnkjaer A, Michaelsen KF. Long term effects of breastfeeding on the infant and mother. Adv Exp Med Biol. 2005; 569: 16-23.
17. Schack-Nielsen L, Michaelsen KF. Breast feeding and future health. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2006; 9: 289-296.
18. Boo NY, Nordiah AJ, Alfizah H, Nor-Rohaini AH, Lim VKE. Contamination of breast milk obtained by manual expression and breast pumps in mothers of very low birthweight infants. J Hosp Infect. 2001; 49: 274-281.
19. Brown SL, Bright RS, Dwyer DE, Foxman B. Breast pump adverse events: reports to the Food and Drug Administration. J Hum Lact. 2005; 21: 169-174.
20. Marín ML, Arroyo R, Jiménez E, Gómez A, Fernández L, Rodríguez JM. Frozen storage of human milk: effect on its bacterial composition. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2008; 49: 343-348.