

UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD ESCUELA
PROFESIONAL DE TECNOLOGIA MÉDICA



TITULO

**DETECCIÓN DE ENTEROBACTERIAS BLEE POSITIVOS
PRODUCTORAS DE BIOFILM EN UROCULTIVOS EN EL
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEL HOSPITAL NACIONAL
“ADOLFO GUEVARA VELASCO” CUSCO ABRIL– 2017**

AUTOR

Bach. BORIS WILLIAM PACHECO QUISPE

ESPECIALIDAD

LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA
PATOLÓGICA

ASESOR

Lic. TM CARLOS CLIFTON REYES LEIVA

CUSCO – PERU
2017

HOJA DE APROBACION

Boris William Pacheco Quispe

TITULO DE LA TESIS

**DETECCIÓN DE ENTEROBACTERIAS BLEE POSITIVAS
PRODUCTORAS DE BIOFILM EN UROCULTIVOS EN EL
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEL HOSPITAL NACIONAL
“ADOLFO GUEVARA VELASCO” CUSCO ABRIL– 2017**

Esta tesis fue evaluada y aprobada para la obtención del título de Licenciado en
Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica por la
Universidad Alas Peruanas

DEDICATORIA

Esta investigación va dedicada a Dios por bendecirme, guiarme y hacer que esto sea posible, a mis padres y mi hermana quienes han sido siempre una pieza clave en mi superación, a mi amigo Lic. TM Daniel Torres Garibay quien me guio para dar inicio esta investigación, a mi amigo Lic. TM Camilo Becerra Martínez quien fue pieza importante gracias a su apoyo en el desarrollo de la investigación.

AGRADECIMIENTO

Mis agradecimientos van dirigidos para aquellas personas que de alguna forma, han sido parte de su culminación, mis sinceros agradecimientos van dirigidos hacia:

El director del Hospital Nacional Adolfo Guevara Velasco- Red Es SALUD Cusco, quien sin su autorización para la ejecución de esta investigación no hubiese sido posible la realización de la misma.

Al Blgo. Soledad Nieves Santibáñez Venero, quien gracias a su apoyo brindado en el área de Microbiología, se pudo realizar la investigación.

Al Lic. TM Camilo Becerra Martínez, quien gracias a su apoyo brindado en el laboratorio clínico CABEMA LAB S.A., se pudo realizar la investigación con éxito.

Y hacia el asesor principal el Lic. TM. Carlos Clifton Reyes Leiva, quien a lo largo de este tiempo ha puesto a prueba sus capacidades y conocimientos para el correcto desarrollo de la presente investigación.

PRESENTACION

SEÑOR DIRECTOR GENERAL DE LA UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS-FILIAL CUSCO, SEÑOR DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE TECNOLOGIA MEDICA, DISTINGUIDO MIEMBROS REVISORES DE LA PRESENTE TESIS.

En cumplimiento a los dispositivos legales del reglamento de grados de la Escuela de pregrado, referente a la obtención de Grado Académico de licenciado en Tecnología Médica especial de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, pongo a vuestra consideración la presente tesis que lleva por título:

DETECCIÓN DE ENTEROBACTERIAS BLEE POSITIVAS PRODUCTORAS DE BIOFILM EN UROCULTIVOS EN EL AREA DE MICROBIOLOGÍA DEL HOSPITAL NACIONAL “ADOLFO GUEVARA VELASCO” CUSCO ABRIL– 2017

Con la presente tesis que es parte de la elaboración de un trabajo de investigación, pretendo Detectar Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017, que afectan a la salud de los pacientes en cuanto a la ineficacia del tratamiento bajo antibióticos y la generación de nuevas infecciones debido a cepas bacterianas capaces de producir biofilm, ya que cada vez es mayor el porcentaje de pacientes que presentan resistencia antimicrobiana.

El Autor.

RESUMEN

La investigación de biofilm se ha convertido en un tema de importancia en el campo de la microbiología ambiental y las enfermedades infecciosas. Los biofilms pueden encontrarse prácticamente en cualquier lugar: colonizan una amplia variedad de superficies húmedas. Los investigadores de enfermedades infecciosas están interesados en los biofilms que colonizan una amplia gama de dispositivos artificiales que se utilizan en el hombre, como catéteres, prótesis de laringe y de cadera y lentes de contacto. Los biofilms constan de una o más comunidades de microorganismos, enclavados en un glicocáliz, que están unidos a una superficie sólida. La razón de la existencia de un biofilm es que permite que los microorganismos se adhieran a las superficies y se multipliquen. Se decidió realizar el estudio descriptivo en 86 Enterobacterias BLEE positivos, sometiéndolos a "Panel de identificación bacteriana y Antibiograma (EQUIPO AUTOMATIZADO MICROSCAN). Para determinar la presencia de Enterobacterias BLEE positivos que producen biofilm se realizaron re aislamiento en medio de cultivo agar enriquecido y evaluación de la capacidad para formar biofilm (técnica de tinción capas de teñir la matriz extracelular). El 36,5% de las bacterias estudiadas produjeron biofilm la más frecuente fue la *Escherichia coli*. La presencia de estos microorganismos en los pacientes desde su ingreso y su alta resistencia antibiótica, justifica desarrollar nuevas investigaciones que permitan su detección y con ello una terapéutica antibiótica más eficiente.

ABSTRACT

Biofilm research has become a subject of importance in the field of environmental microbiology and infectious diseases. Biofilms can be found almost anywhere: they colonize a wide variety of wet surfaces. Infectious disease researchers are interested in biofilms that colonize a wide range of artificial devices that are used in man, such as catheters, larynx and hip prostheses and contact lenses. Biofilms consist of one or more communities of microorganisms, embedded in a glycocalyx, that are attached to a solid surface. The reason for the existence of a biofilm is that it allows microorganisms to adhere to surfaces and multiply. It was decided to conduct the descriptive study on 86 positive BLEE Enterobacteria, submitting them to "Bacterial Identification Panel and Antibiogram (MICROSCAN AUTOMATED EQUIPMENT). In order to determine the presence of BLEE-positive Enterobacteria producing biofilm, re-sieving was performed in enriched agar culture medium and evaluation of the ability to form biofilm (staining technique to dye the extracellular matrix). 36.5% of the bacteria studied produced biofilm, the most frequent being *Escherichia coli*. The presence of these microorganisms in the patients since their admission and their high antibiotic resistance, justifies the development of new investigations that allow their detection and with it a more efficient antibiotic therapeutics.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Diferentes grupos de β -lactamasas de espectro extendido.	45
Tabla 2 Técnicas e Instrumentos de recojo de muestras	54
Tabla 3 Resultados de Urocultivos	57
Tabla 4 Resultados de Enterobacterias BLEE positivos que formaron biofilm	58
Tabla 5 Procedencia de Enterobacterias BLEE positivos que producen biofilm.....	59
Tabla 6 Enterobacteria BLEE positivo que produce biofilm con mayor incidencia	61
Tabla 7 Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm según genero	62
Tabla 8 Evidencia de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm en relación a Carbapenems (Ertapenem, Imipenem y Meropenem)	63
Tabla 9 Evidencia de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm según bacteria y biotipo en relación a Carbapenems (Ertapenem , Imipenem y Meropenem)	64
Tabla 10 Evidencia de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm en relación a cefalosporinas de tercera y cuarta generación (ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y cefepime)	66
Tabla 11 Evidencia de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm según bacteria y biotipo en relación a cefalosporinas de tercera y cuarta generación (ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y cefepime).....	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Esquema representando las etapas presentes durante el desarrollo de un biofilm sobre un sustrato	26
Gráfico 2: La aplicación y posterior aclarado del producto TBF 300 en una superficie de acero revela la presencia de biofilm por medio de una coloración permanente y detectable a simple vista.....	43
Gráfico 3: Resultados de Urocultivos	57
Gráfico 4: Resultados de Enterobacterias BLEE positivos que formaron biofilm.....	58
Gráfico 5: Procedencia de Enterobacterias BLEE positivos que producen biofilm	60
Gráfico 6: Enterobacteria BLEE positivo que produce biofilm con mayor incidencia....	61
Gráfico 7: Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm según genero.....	62
Gráfico 8. Evidencia de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm en relación a Carbapenems (Ertapenem, Imipenem y Meropenem)	64
Gráfico 9: Evidencia de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm según bacteria y biotipo en relación a Carbapenems (Ertapenem , Imipenem y Meroponem)	65
Gráfico 10: Evidencia de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm en relación a cefalosporinas de tercera y cuarta generación (ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y cefepime)	66
Gráfico 11: Evidencia de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm según bacteria y biotipo en relación a cefalosporinas de tercera y cuarta generación (ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y cefepime).....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos.

BLEE / ESBL: Betalactamasa de espectro extendido.

OMS: Organización Mundial de la salud

EPS: Exopolisacaridos

RAM: Resistencia a los Antimicrobianos

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

AmPC: Adenosin Monofosfato Cíclico

DNA/ ADN: Adenosín Desoxirribonucleico.

DLVO: Derjaguin, Landau, Verway y Overbeek

CDTI: Centro *para el Desarrollo Tecnológico Industrial*

ATP: Adenosin Trifosfato

INTRODUCCIÓN

Los métodos, procedimientos y técnicas de Laboratorio Clínico en el área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco - 2017; para evidenciar la presencia de Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en Urocultivos no son aplicados; Este estudio trata de profundizar en el conocimiento de las nuevas técnicas microbiológicas y también de sacar conclusiones acerca de la presencia de estas bacterias con el fin de conseguir un mayor nivel de Salud Pública.

Con la presente tesis busco establecer un precedente sobre la presencia de Enterobacterias BLEE positivas productoras de biofilm; teniendo en cuenta la afluencia de Urocultivos en un promedio de 30 cultivos en todo el área de Microbiología. Para mi estudio solo considerare a Enterobacterias BLEE positivas.

ÍNDICE

RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
CAPÍTULO I.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.1. DESCRIPCION DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA.....	1
1.2. DELIMITACIONES DE LA INVESTIGACION	7
1.2.1. <i>Delimitación temporal</i>	7
1.2.2. <i>Delimitación geográfica</i>	7
1.2.3. <i>Delimitación social</i>	8
1.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN.....	8
1.3.1. <i>Problema general</i>	8
1.3.2. <i>Problemas específicos</i>	8
1.4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	9
1.4.1. <i>Objetivo general</i>	9
1.4.2. <i>Objetivos específicos</i>	9
1.5. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACION	10
1.5.1. <i>Hipótesis general</i>	10
1.5.2. <i>Hipótesis específicas</i>	10
1.6. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	11
CAPÍTULO II.....	13
MARCO TEORICO.....	13
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION	13
2.1.1. <i>A nivel internacional</i>	13
2.1.2. <i>A nivel nacional</i>	21
2.2. BASES TEÓRICAS	22
2.2.1. <i>La investigación de biofilms.</i>	22
2.2.2. <i>Definición de biofilm</i>	22
2.2.3. <i>Factores intervinientes en la formación del biofilm</i>	24

2.2.3.1. Condiciones de la superficie	24
2.2.3.2. Especies bacterianas.....	24
2.2.3.3. Factores medioambientales	25
2.2.4. <i>Fases de formación del biofilm</i>	26
2.2.5. <i>Biofilms en el organismo humano</i>	37
2.2.6. <i>Resistencia bacteriana asociada a los biofilm</i>	38
2.2.7. <i>PROBLEMAS ASOCIADAS A LOS BIOFILMS</i>	40
2.2.8. <i>DETECCIÓN DE BIOFILM</i>	40
2.2.8.1. Evaluación de la capacidad para formar biofilm	43
2.2.9. <i>Enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido</i> . 43	
2.2.9.1. Métodos de detección y caracterización de las enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido	45
CAPÍTULO III	50
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	50
3.1. TIPO DE INVESTIGACION.....	50
3.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACION	50
3.3. POBLACION Y MUESTRA DE ESTUDIO	51
3.3.1. <i>POBLACION</i>	51
3.3.2. <i>MUESTRA</i>	51
3.4. VARIABLES DE LA INVESTIGACION	51
3.4.1. <i>Variable de estudio 1</i>	51
3.4.2. <i>Variable de estudio 2</i>	52
3.5. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE LA RECOLECCION DE DATOS	53
3.5.1. <i>Instrumentos de recojo de información</i>	53
3.5.1.1. Evaluación de la capacidad para formar biofilm (técnica de tinción capas de teñir la matriz extracelular)	53
3.5.1.2. Métodos de detección y caracterización de las enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido	53
3.5.2. <i>Técnicas de recojo de datos</i>	54
3.6. PROCEDIMIENTOS	55
3.6.1. <i>Selección de Enterobacterias a estudiar (Instrumento de Estudio)</i>	55
3.6.2. <i>Reaslimamiento de Enterobacterias BLEE positivas en medio de cultivo agar enriquecido</i>	55

3.6.3. <i>Evaluación de la capacidad para formar biofilm (técnica de tinción capas de teñir la matriz extracelular) (Instrumento de Estudio)</i>	56
CAPÍTULO IV	57
RESULTADOS	57
4.1. DETECCIÓN DE ENTEROBACTERIAS BLEE POSITIVAS QUE PRODUCEN BIOFILM EN UROCULTIVOS	57
4.2. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE ENTEROBACTERIAS BLEE POSITIVAS QUE PRODUCEN BIOFILM SEGÚN PROCEDENCIA	59
4.3. IDENTIFICACION DE LA ENTEROBACTERIA BLEE POSITIVOS QUE PRODUCEN BIOFILM CON MAYOR INCIDENCIA	60
4.4. IDENTIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE ENTEROBACTERIAS BLEE POSITIVOS QUE PRODUCEN BIOFILM SEGÚN GÉNERO.....	62
4.5. EVIDENCIA DE LA SUSCEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE ENTEROBACTERIAS BLEE POSITIVOS QUE PRODUCEN BIOFILM.....	63
DISCUSION DE LOS RESULTADOS	69
CONCLUSIONES	71
RECOMENDACIONES	73
BIBLIOGRAFIA	74
ANEXO 1	77
ANEXO 2	78
ANEXO 5	81
ANEXO 6	84
ANEXO 7	85
ANEXO 8	86
ANEXO 9	87
ANEXO 10	88
ANEXO 11	91

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

La investigación de biofilm se ha convertido en un tema de importancia en el campo de la microbiología ambiental y las enfermedades infecciosas. Los biofilms pueden encontrarse prácticamente en cualquier lugar: colonizan una amplia variedad de superficies húmedas. Los investigadores de enfermedades infecciosas están interesados en los biofilms que colonizan una amplia gama de dispositivos artificiales que se utilizan en el hombre, como catéteres, prótesis de laringe y de cadera y lentes de contacto. Los biofilms constan de una o más comunidades de microorganismos, enclavados en un glicocáliz, que están unidos a una superficie sólida. La razón de la existencia de un biofilm es que permite que los microorganismos se adhieran a las superficies y se multipliquen.

Cabe aclarar también que los biofilm están relacionados con algunos procesos beneficiosos. De allí, el significativo interés de su estudio. Por su importancia en la salud humana la relación biofilm e infecciones merece una descripción detallada. La mayor parte de las enfermedades infecciosas son causadas por bacterias dotadas de mecanismos patogénicos específicos: difteria, tuberculosis, cólera, etc. Los antibióticos y vacunas desarrollados para estos gérmenes lograron una notable eficacia en su control.

De esta forma, las bacterias adheridas que crecen en un biofilm despliegan una amplia gama de características entre la resistencia en cuanto a la susceptibilidad antimicrobiana; la formación de biofilm depende principalmente de la interacción de tres componentes:

- **CONDICIONES DE LA SUPERFICIE** (La colonización microbiana se incrementa cuando la rugosidad de la superficie aumenta)
- **ESPECIES BACTERIANAS** (Las características de especies bacterianas para la formación del biofilm se rigen a tener una versatilidad metabólica, plasticidad genotípica, superficie hidrófoba de la célula, la presencia de fimbrias y flagelos y la producción de exopolisacáridos (EPS), influyen en la capacidad de las células microbianas para adherirse)
- **FACTORES MEDIOAMBIENTALES** (El pH, cantidad de nutrientes, cargas iónicas, temperatura y fluidez pueden jugar un papel importante en la adhesión bacteriana al substrato y así generar el biofilm)

Las infecciones microbianas causadas por biofilms se relacionan a las infecciones nosocomiales; incrementando la estancia hospitalaria. La infección causada por un biofilm está demostrada por síntomas que clínicamente recurren durante el tratamiento con antibióticos. En esta infección no se conoce el agente causal específico, son de transcurso crónico y persistente, lo que hace difícil su erradicación.

El biofilm es la causa de infecciones comúnmente repetitivas del tracto urinario, causadas por *Escherichia coli* y otros patógenos, otitis media en niños causadas por *Haemophilus influenzae*, endocarditis de las válvulas mitrales e infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística causadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

Los biofilm constituyen un modo protegido de crecimiento y desarrollo que permite a los microorganismos sobrevivir en ambientes hostiles, siendo su comportamiento y fisiología significativamente diferentes de aquellos

microorganismos que crecen en medio líquido. Actualmente, la combinación de técnicas de observación tridimensionales de alta resolución, colorantes moleculares específicos fluorescentes y los equipos necesarios para el cultivo, han demostrado que los biofilm no son simplemente agregados pasivos de células que están adheridos a una superficie, sino que son sistemas biológicos complejos desde el punto de vista estructural y dinámico. La importancia de estas estructuras microbianas complejas reside en la existencia de un nivel de diferenciación que requiere un sofisticado sistema de señales célula a célula y un grado de especialización celular.

El proceso de desarrollo del biofilm es único en biología debido a que involucra la actividad coordinada de varios genomas de procariontes relativamente pequeños, en comparación con los grandes genomas eucarióticos, para generar una comunidad funcional multicelular. Esta noción modifica el conocimiento que se tenía de las bacterias debido a que las células individuales que se han estudiado en cultivos planctónicos en realidad son miembros de una comunidad multicelular cuya complejidad y sofisticación recién ha sido apreciada en las últimas décadas. (1)

Se pueden encontrar biofilm en todos los medios en donde existan microorganismos: en el medio natural, clínico o industrial. Sólo se requiere la presencia de un medio hidratado y una mínima cantidad de nutrientes, ya que pueden desarrollarse en gran variedad de superficies. La presencia de biofilm en una gran diversidad de ambientes como UCI, Hospitalización, Accesorios médicos los cuales traen como consecuencia una importante y variada cantidad de problemas relacionados con la medicina (infecciones).

En los últimos 10 años, debido a su prevalencia abrumadora, los biofilms han sido reconocidos progresivamente como factores importantes en la patogenia de muchas infecciones humanas persistentes, incluyendo placa dental, caries, infección periodontal, neumonía por *Pseudomonas*, fibrosis quística,

cistitis crónica, endocarditis bacteriana, osteomielitis, prostatitis crónica, las cuales son protagonistas en muchos de los pacientes hospitalizados; como también son adquiridas como infecciones intrahospitalarias. También los biofilms se desarrollan en una variedad de dispositivos médicos implantables, provocando infecciones asociadas, destacándose entre ellas la sepsis por catéteres endovenosos y arteriales. Además se han descrito en catéteres urinarios, sigmoidoscopios y lentes de contacto. Constituyen también un problema serio en válvulas cardíacas artificiales, marcapasos y prótesis ortopédicas las cuales, una vez infectadas, generan infecciones excepcionalmente difíciles de resolver mediante antibióticos.

En la actualidad, la frecuencia y gravedad de las infecciones de estas bacterias han sido desplazadas del primer plano por microorganismos ubicuos, capaces de producir infecciones de tipo crónico, que responden pobremente a los tratamientos antibióticos y no pueden prevenirse mediante inmunización. Diversas publicaciones recientes señalan que por lo menos el 65% de todos los procesos infecciosos bacterianos humanos podrían involucrar la formación de biofilm. (2)

Las bacterias BLEE positivas son capaces de producir enzimas las cuales previenen el efecto, esto significa que deben utilizarse antibióticos más fuertes para lograr un buen efecto terapéutico; las infecciones ocasionadas por este tipo de bacterias generalmente ocurren en el tracto urinario, pulmones, piel, sangre y en lesiones corporales periféricas

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) causada por Enterobacterias BLEE (Betalactamasa de espectro extendido) es la más común y de importancia en la salud pública pone en peligro la eficacia de la prevención y el tratamiento de una serie cada vez mayor de infecciones. La RAM supone una amenaza cada vez mayor para la salud pública mundial y requiere medidas de prevención.

La prolongación de la enfermedad, la necesidad de más pruebas y la utilización de fármacos más caros aumentan el costo de la atención sanitaria a los pacientes con infecciones resistentes en comparación con el de los pacientes con infecciones no resistentes.

La terapia farmacológica en pacientes infectados con bacterias productoras de BLEE tiene mayor riesgo de mortalidad si son tratados con antimicrobianos a los que la bacteria tenga alto nivel de resistencia es por eso que existen alternativas de terapia antimicrobiana contra las BLEE, las cuales se distribuyen según:

- Inhibidores de Betalactamasas (Se utilizan piperacilina + tazobactam, ampicilina + sulbactam, amoxicilina + ácido clavulánico, cefoperazona + sulbactam; la acción de estos fármacos está influenciada por regímenes de administración y aumento de cepas con mutaciones en porinas)
- Quinolonas (Tratamiento alternativo pero ya se ve un aumento en casos con resistencias a estos fármacos)
- Aminoglucosidos (Acción similar a quinolonas pero no es recomendado como una monoterapia)
- Cefamicinas (Comprende a la cefoxitina y cefotetan las cuales son más estables ante la hidrólisis generada por las BLEE, se ha reportado casos de fracaso terapéutico debido a la mutación de cepas a nivel de porinas)
- Oximino Betalactámicos (El cefepime es activo contra cepas productoras de BLEE, no debe indicarse como primera línea en infecciones graves y se usa, la dosis debe ser mayor o igual a 2 gramos

cada 12 horas y en combinación con otro agente activo como pueden ser aminoglicosidos o fluoroquinolonas)

- Carbapenems (Comprenden el Meropenem y Imipenem representan la terapia de elección en bacterias productoras de BLEE con resistentes a la hidrólisis y tienen excelente actividad in vitro.

Existen nuevas alternativas terapéuticas que comprenden a los fármacos como el Ertapenem, Faropenem y las Cefalosporinas AmpC de tercera generación.

Según la OMS indica que la resistencia a los antimicrobianos (RAM) se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios al verse expuestos a los antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos, por ejemplo). Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas. Indica también que la resistencia a los antimicrobianos (RAM) es de preocupación mundial ya que están apareciendo nuevos mecanismos de resistencia que se propagan a nivel mundial y ponen en peligro nuestra capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes, con el consiguiente aumento de la discapacidad y las muertes, y la prolongación de la enfermedad. Sin antimicrobianos eficaces para prevenir y tratar las infecciones, intervenciones como el trasplante de órganos, la quimioterapia del cáncer, el tratamiento de la diabetes o la cirugía mayor (por ejemplo, las cesáreas o las prótesis de cadera) se convertirán en procedimientos de muy alto riesgo. La RAM aumenta el costo de la atención sanitaria por la mayor duración de las hospitalizaciones y la necesidad de una atención más intensiva. La RAM está poniendo en riesgo los logros de los Objetivos de Desarrollo del Milenio y la consecución de los Objetivos de Desarrollo Sostenible.

La alta incidencia de las enfermedades infecciosas y el surgimiento de Enterobacterias resistentes a los antibióticos representan un gran problema actualmente, siendo las cepas productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) un ejemplo de este fenómeno. A fin de determinar la producción biofilm en dichas cepas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae aisladas en el Área de Microbiología del Servicio Patología Clínica del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco”.

La falta de métodos, procedimientos y técnicas para la detección de Enterobacterias BLEE positivas capaces de producir biofilm en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” del Cusco genera una incógnita en la relación de estas cepas con las resistencias antimicrobianas ya que se logra evidenciar un porcentaje significativo de Enterobacterias BLEE positivas las cuales están relacionadas a principales causas de resistencia antimicrobiana y nuevas infecciones se pueden asociar al producto de la formación de biofilm . Afectando principalmente a la población de pacientes hospitalizados, debido a que aún no se maneja el diagnóstico de estas bacterias con características para producir biofilm.

1.2. DELIMITACIONES DE LA INVESTIGACION

1.2.1. Delimitación temporal

El tiempo de duración de la investigación es de 4 meses, desde la identificación del problema hasta la sistematización de resultados y hallazgos de la investigación, durante el año 2017.

1.2.2. Delimitación geográfica

La investigación se realizó en el área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco. Los datos se obtuvieron de los Urocultivos realizados durante el mes de Abril del 2017. La presente investigación se desarrolló en todas las cepas de Enterobacterias BLEE positivas aisladas de los Urocultivos.

1.2.3. Delimitación social

La investigación no se aplicó directamente a un grupo social ya que como objeto de estudio son las cepas de Enterobacterias BLEE positivas aisladas en Urocultivos.

1.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1. Problema general

¿En qué medida se detectan Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017?

1.3.2. Problemas específicos

¿Cuál es el porcentaje de Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en Urocultivos provenientes de Consultorios Externos y Hospitalización en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril 2017?

¿Qué Enterobacteria BLEE positiva que produce biofilm representa la mayor incidencia en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017?

¿Cuál es el porcentaje según género de Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017?

¿Cuál es el comportamiento de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de las Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en relación a los Carbapenems (Ertapenem, Imipenem, Meropenem), cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Ceftriaxona, Cefotaxima, Ceftazidima y Cefepime) en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017?

1.4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.4.1. Objetivo general

Identificar la presencia de Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017.

1.4.2. Objetivos específicos

Analizar el porcentaje de Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm según Consultorios Externos y Hospitalización en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril 2017.

Identificar qué Enterobacteria BLEE positiva que produce biofilm representa la mayor incidencia en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017.

Analizar el porcentaje de Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm según género en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017.

Identificar el comportamiento de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de las Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en relación a los Carbapenems (Ertapenem, Imipenem, Meropenem), cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Ceftriaxona, Cefotaxima, Ceftazidima y Cefepime) en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017.

1.5. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACION

1.5.1. Hipótesis general

Si existe la presencia de Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en Urocultivos con un alto número de casos el cual representa un porcentaje significativo del total de casos analizados en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017.

1.5.2. Hipótesis específicas

El porcentaje de Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm es mayor en Consultorios Externos frente a los casos de Hospitalización en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril 2017.

La bacteria *Escherichia coli* con biotipo 77115012 representa la mayor incidencia porcentual de las Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017.

El porcentaje Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm según género tiene mayor casos en mujeres y en menor número de casos en los varones en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril 2017.

Las Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm muestran que un 85.0 % de casos producen sensibilidad y 15.0 % de resistencia a los Carbapenems (Ertapenem, Imipenem, Meropenem), por otro lado el casi 90 % producen resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Ceftriaxiona, Cefotaxima, Ceftazidima y Cefepime) en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017.

1.6. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La realización del servicio social es un elemento importante en la culminación de la carrera profesional, en el cual se enmarca la practicidad de los fundamentos teóricos estudiados. Por otra parte, es un vínculo a la experiencia profesional requerida para poder desempeñarse en el ámbito laboral. De esta manera, es de gran relevancia desempeñarlo en el área a fin con las habilidades e intereses que muestre el investigador.

La presencia de biofilm en una gran diversidad de ambientes trae como consecuencia una importante y variada cantidad de problemas relacionados tanto con la medicina (infecciones), la industria en general (biocorrosión, pérdida de rendimiento), la industria alimentaria en particular (contaminación microbiana de alimentos), el biodeterioro de patrimonios culturales, entre otros. De allí, el significativo interés de su estudio.

Por su importancia en la salud humana la relación biofilm/infecciones merece una descripción detallada. La mayor parte de las enfermedades infecciosas del siglo pasado eran causadas por bacterias dotadas de mecanismos patogénicos específicos: difteria, tuberculosis, cólera, coqueluche, etc. Los antibióticos y vacunas desarrollados para estos gérmenes lograron una notable eficacia en su control.

Es por eso la importancia de poder evidenciar la presencia de Enterobacterias capaces de producir biofilm, ya que esta característica puede ser la causante de las alteraciones en la susceptibilidad antimicrobiana; originándose infecciones persistentes sin éxitos en el tratamiento farmacológico. Al culminar el estudio se lograra obtener información de datos sistematizados los cuales serán de mucha importancia para resolver un problema social, a construir una nueva teoría o a generar nuevas inquietudes de investigación.

CAPÍTULO II

MARCO TEORICO

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION

2.1.1. A nivel internacional

- Orihuel Iranzo Enrique J. Consejero Delegado de Betelgeux SL. Nuevas herramientas para la detección y la eliminación de biofilms. Ponencia presentada en la Jornada sobre Salas Blancas II, organizada por ANICE y celebrada en Madrid el 21 de marzo de 2012.

Comentario: Ante la necesidad de disponer renuevas técnicas rápidas, selectivas y sencillas que faciliten el control de la contaminación por biofilms, Betelgeux ha llevado a cabo un proyecto de investigación y desarrollo, en colaboración con el Departamento de Tecnología de los Alimentos de la Universidad Complutense de Madrid y el centro tecnológico Ainia. Este proyecto, subvencionado por el CDTI, ha estado enfocado al desarrollo de nuevas herramientas para la detección y eliminación de biofilms que mejoren las soluciones disponibles actualmente para el control de la contaminación por biofilms.

- Chaves Esteban, Rojas Juan Alberto, Rivera Patricia y Hernández Francisco. Prevalencia de Cepas de *Staphylococcus* productoras de biopelícula y con receptores FC aislados de muestras clínicas y de individuos sanos. Revista

Resumen: La capacidad de formar biopelículas y la presencia de receptores Fc representan dos de los factores de virulencia fácilmente identificables en las cepas de *Staphylococcus*.

El primero además de facilitar la colonización de superficies, puede incorporar proteínas del hospedero, lo que se traduce en mimetismo ante el sistema inmune, lo cual es magnificado por la presencia de receptores Fc que incorporan inmunoglobulinas a la superficie de la bacteria. Ambos factores de virulencia se evaluaron en 57 cepas de *Staphylococcus* (29 *S.aureus* y 28 *S. epidermidis*) aisladas de casos clínicos y en 64 cepas de *S. epidermidis* aisladas de individuos sanos. La biopelícula se evidenció mediante tinción con safranina del tubo de cultivo y los receptores Fc mediante hemaglutinación de eritrocitos del grupo A sensibilizando previamente las bacterias con suero anti grupo sanguíneo A. Los receptores Fc se identificaron en el 79% de las cepas de *S. aureus* y en el 89 % de *S. epídermídis* aisladas de casos clínicos y solo en el 41% de las aisladas de individuos sanos. La producción de biopelícula se evidenció en el 45% y el 32% de *S. aureus* y *S. epidermidis* respectivamente aisladas de casos clínicos, y en el 74% de las cepas aisladas de individuos sanos. La gran proporción de individuos sanos con cepas con potencialidad para colonizar superficies internas, llama la atención en la necesidad de extremar las medidas de asepsia en procesos de venopunción y en la implantación de catéteres.

- I. Lasa, J. L. del Pozo, J. R. Penadés, J. Leiva. Biofilms bacterianos e infección. An. Sist. Sanit. Navar. 2005, Vol. 28, Nº 2, mayo-agosto.

Conclusiones: Las bacterias han crecido en biofilms durante millones de años, como parte de una estrategia exitosa para colonizar el planeta y la mayoría de los seres vivos. Nosotros sólo hemos reconocido esta forma de vida de las bacterias en las últimas dos décadas. La formación de biofilms representa un problema para aquellos pacientes que requieran un implante. Los microorganismos del biofilm son muy difíciles de tratar con agentes antimicrobianos y la liberación de bacterias desde el biofilm puede provocar una infección, sobre todo si el paciente está inmunocomprometido. Es necesario desarrollar nuevos métodos para detectar la presencia de biofilms en el implante y nuevos métodos para evaluar la respuesta frente a las estrategias de control. Finalmente, necesitamos desarrollar nuevas estrategias de control que en combinación con los antibióticos nos ayuden a combatir biofilms ya formados. Todos los esfuerzos dirigidos a la identificación de genes que sean necesarios para la formación del biofilm, la búsqueda de enzimas capaces de degradar específicamente la matriz polisacáridica del biofilm, métodos físicos como ultrasonidos que perturben la estabilidad de la matriz o los estudios dirigidos a descifrar los patrones de expresión génica entre las bacterias plactónicas y las bacterias del biofilm deben de ser considerados como fuente de posibles estrategias que nos ayudarán a comprender y combatir mejor las infecciones producidas por biofilms bacterianos.

- Gómez Javier, Gómez María Luisa, Bas Pas, Ramo Carmen , Cafini Fabio , Ramón Maestre Juan, Prieto Jose. ¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos gramnegativos?. Departamento de Medicina (Área de Microbiología), Facultad de Medicina UCM. Madrid. 2013; 26(2):97-102.

Resumen: El objetivo del estudio fue investigar la formación de biofilms en bacterias gramnegativas y cuantificar la producción de biofilm mediante la aplicación de una técnica que permitiese una comparación de los resultados de la formación de biofilm entre las diferentes especies de gramnegativos. Se estudiaron un total de 153 cepas de bacilos gramnegativos correspondientes a 12 especies bacterianas por el método de la densidad óptica aplicando una modificación de la técnica descrita por Stepanovic et al. Los valores obtenidos mediante el análisis de la densidad óptica permiten clasificar a los microorganismos en formadores fuertes, moderados, débiles y no formadores. Los resultados obtenidos se han expresado de dos maneras, ambas utilizando el mismo método estadístico: sin estandarizar, donde los controles fueron diferentes dependiendo de los días en los que se realizaron las medidas; y estandarizados mediante un factor de corrección, utilizando el mismo control para todas las cepas de cada especie, lo que permite su homogeneización. Los resultados obtenidos en el estudio tras el análisis y estandarización establecen que de las 153 cepas de gramnegativos estudiados, 105 de ellas fueron no formadoras de biofilms, representando el 63,75% de los géneros estudiados.

Consideramos que la estandarización y cuantificación de la producción de biofilm entre las bacterias gramnegativas puede resultar de utilidad en el ámbito clínico, ya que el conocimiento de la capacidad de producción de biofilm puede dirigir o enfocar el tratamiento de elección de las patologías producidas por dichos microorganismos.

- Flach Juliana, Karnopp Carolina, Corção Gertrudes . Biofilms formados en materia-prima en contacto con leite: factores de virulencia envueltos.Redalyc. Acta Scientiae Veterinariae, vol. 33, núm. 3, 2005, pp. 291-296, Universidade Federal do Rio Grande do Sul Brasil.

Resumen: Biofilms bacterianos representam uma preocupação à indústria de alimentos por sua potencialidade em resistir a tratamentos antimicrobianos, além de degradar e contaminar os alimentos con patógenos. O presente trabalho avaliou a relação entre factores de adesão e hidrofobicidade celular na formação d biofilmes, bem como as atividades citotóxica e proteolítica de isolados bacterianos do biofilme. Corpos de prova compostos de polipropileno, aço inoxidável e pano de algodão foram imersos en leite *in natura*, en diferentes condições de tempo e temperatura. Posteriormente, foram lavados con solução Salina Fosfatada Tamponada e submetidos à sonicação para remoção das células aderidas. Estas foram isoladas, identificadas e submetidas aos testes de produção de cápsula, fímbria, hemolisina, protease e determinação da hidrofobicidade celular.

Dos isolados obtidos, foram Gram negativos en 44, Gram positivos; 52,5% foram produtores de cápsula, 49,4% de fímbria, 4,0% de fímbria tipo I, 53,5% de hemolisina e 20,2% de

proteases. A maioria dos isolados teve hidrofobicidade celular elevada, e a associação entre presença de cápsula e adesão em pano de algodão foi estatisticamente significativa. A presença de bactérias potencialmente patogênicos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase-negativos*, revela a necessidade do controle microbiológico já em nível de produção de leite, no sentido de evitar complicações à saúde pública.

- Zambrano María Angélica, Suárez Londoño Lina. Biofilms bacterianos: sus implicaciones en salud y enfermedad Universitas Odontológica, vol. 25, núm. 57, junio-diciembre, 2006, pp. 19-25, Pontificia Universidad Javeriana Colombia.

Resumen: Las enfermedades de mayor incidencia en la cavidad oral como son la caries y la enfermedad periodontal, son consideradas enfermedades infecciosas, ya que su factor etiológico primario son bacterias que por medio de mecanismos directos o indirectos causan daño tisular, lo que se refleja claramente en las características clínicas de cada una de estas entidades. Las bacterias causantes de estas enfermedades están estructuralmente organizadas de una manera específica lo que les confiere ciertas características especiales que las hacen diferentes de las bacterias en estado planctónico, es decir aisladas.

Básicamente, las bacterias se agrupan formando una biomasa en torno a superficies de diversa naturaleza las cuales a su vez deben cumplir con ciertos requisitos; esta biomasa recibe el nombre de biofilm o biopelícula.

La biopelícula no es característica únicamente de las enfermedades de la cavidad oral, de hecho puede formarse sobre cualquier superficie viva o inerte y a nivel del cuerpo humano es la causante de un amplia serie de enfermedades, donde la importancia de la biopelícula como factor causal, radica principalmente en la dificultad que implica para el clínico erradicar la causa de la infección debido precisamente a la estructura particular de estas agrupaciones bacterianas. El siguiente artículo es una revisión de la literatura que recopila datos generales acerca de la biopelícula, como su estructura, sus estadios de formación y las propiedades que adquieren las bacterias en este tipo de organización.

- Bayona-Rojas Martín Alonso, Andrés Julián Gutiérrez Escobar Andrés Julián. BIOPELÍCULA: UN MECANISMO DE SUPERVIVENCIA DE *Helicobacter pylori*. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 16(2): 335-342, Julio-Diciembre, 2013

RESUMEN: *Helicobacter pylori* es un patógeno que coloniza el estómago humano, el cual, se ha asociado a múltiples enfermedades gastroduodenales. Dentro de su metabolismo produce una biopelícula, que es un complejo exopolisacarido, que le permite a la bacteria sobrevivir en ambientes desfavorables y ser resistente a la acción de los antibióticos, debido a que previene la penetración completa de estos compuestos.

La presente revisión estuvo orientada a realizar una actualización sobre la importancia del biopolímero para la supervivencia de la bacteria y mostrar su trascendencia para la salud pública.

Conclusiones: A pesar de las importantes implicaciones microbiológicas y fisiológicas que presenta la formación de las biopelículas no es mucho lo que se conoce sobre su producción, regulación y papel en la resistencia a los antibióticos. El hecho de poder conocer e identificar elementos genéticos y factores ambientales asociados con la formación de biopelículas permitirá establecer estrategias efectivas para su control. El objetivo de esta revisión fue, precisamente, traer a la retina de la comunidad científica nacional e internacional, de habla hispana, este tema, para abrir posibilidades investigativas en nuestras regiones, ya que poco se conoce sobre la formación de biopelículas y sus implicaciones clínicas, por parte de cepas nativas para la región latinoamericana.

- Tallyta María Santos ALVES, Camila Alves SILVA, Naiana Braga da SILVA, Eliane Batista de MEDEIROS, Ana María Gondim VALENÇA. Atividade Antimicrobiana de Productos Fluoretados sobre Bacterias Formadoras do Biofilme Dentário: Estudio in vitro. Redalyg. Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, vol. 10, núm. 2, mayo-agosto, 2010, pp. 209-216, Universidade Federal da Paraíba Brasil.

Conclusion: A maioria dos cariostáticos apresentou atividade antimicrobiana sobre *S. mutans* e *S. oralis*. O gel demonstrou ação antimicrobiana sobre *S. mutans* e *S. oralis*, não sendo evidenciado efeito sobre o *L. casei* enquanto tal atividade não foi verificada para a espuma sobre as cepas testadas.

- Subramanian Bragadeeswaran, Sangappellai Thangaraj, Kolandhasamy Prabhu, Solaman Raj Sophia Rani. Antifouling

activity by sea anemone (*Heteractis magnifica* and *H. aurora*) extracts against marine biofilm bacteria. Redalyc.Latin American Journal of Aquatic Research, vol. 39, núm. 2, julio, 2011, pp. 385-389, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso Chile.

Resumen. Las anémonas de mar (Actiniaria) son solitarias, habitantes oceánicos del phylum Cnidaria y de la clase Anthozoa. En este estudio se determina la actividad antibacteriana de dos anémonas bentónicas *Heteractis magnifica* y *H. aurora* recolectadas en la costa de Mandapam, sudeste de India. Los extractos crudos de estas anémonas fueron ensayados frente a siete biofilms bacterianos aislados de tres paneles de control distintos. El extracto crudo de la anémona *H. magnifica* mostró una zona inhibición máxima de 18 mm contra *Pseudomonas* sp. y *Escherichia coli* y la zona de inhibición mínima de 3 mm fue encontrada frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus* sp. y *Bacillus cereus* de extractos de metanol, acetona y DCM respectivamente. El extracto de butanol de la anémona *H. magnifica* mostró una zona de inhibición máxima de 23 mm frente a *Vibrio parahaemolyticus*, mientras que con el extracto de metanol se observó una zona de inhibición mínima de 1 mm frente a *V. parahaemolyticus*. El presente estudio mostró que los extractos *H. aurora* son más efectivos que los de *H. magnifica* y que los compuestos activos de las anémonas de mar pueden ser usados como compuestos anti-incrustantes.

2.1.2. A nivel nacional

Durante el desarrollo de la investigación no se logró encontrar bibliografía y estudios relacionados con el tema de estudio es por eso que se enriqueció de información proveniente a nivel Internacional ya que si logro encontrar información relacionada.

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1. La investigación de biofilms.

Los biofilms se han convertido en un tema «candente » tanto en el campo de la microbiología ambiental y las enfermedades infecciosas, como en la prensa popular. Los biofilms pueden encontrarse prácticamente en cualquier lugar: colonizan una amplia variedad de superficies húmedas, entre ellas, la cavidad oral, el fondo de barcos y muelles y el interior de tuberías y de rocas de arroyos. Los investigadores de enfermedades infecciosas están interesados en los biofilms que colonizan una amplia gama de dispositivos artificiales que se utilizan en el hombre, como catéteres, prótesis de laringe y de cadera y lentes de contacto. Los microbiólogos que estudian el medio ambiente están interesados en la prevención de los efectos de los biofilms en los procesos industriales sucios o, como alternativa, en la utilización de biofilms para fines productivos (p. ej., en las plantas de tratamiento de aguas residuales). Los biofilms constan de una o más comunidades de microorganismos, enclavados en un glicocáliz, que están unidos a una superficie sólida. La razón de la existencia de un biofilm es que permite que los microorganismos se adhieran a las superficies y se multipliquen.

De esta forma, las bacterias (fijas) adheridas que crecen en un biofilm despliegan una amplia gama de características que proporcionan una serie de ventajas con respecto a las bacterias (planctónicas) unicelulares.

2.2.2. Definición de biofilm

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de ex polisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo.

El crecimiento en biofilms representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. ¿Quién no ha observado el material mucoso que recubre un jarrón en el que hemos tenido depositadas flores, el material resbaladizo que recubre las piedras de los lechos de los ríos, los cascos de los barcos o la superficie interna de una tubería? Otro ejemplo cotidiano de biofilm lo constituye la placa dental, cada día nos esforzamos por combatir la película de bacterias que recubre la superficie de los dientes para evitar un desarrollo excesivo de microorganismos que puede provocar un deterioro del esmalte dental. La capacidad de formación de biofilm no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biofilms. Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias. En los primeros trabajos sobre la estructura del biofilm, una de las cuestiones que surgía con mayor reiteración era cómo las bacterias del interior del biofilm podían tener acceso a los nutrientes o al oxígeno.

Estudios realizados utilizando microscopía con focal han mostrado que la arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm.

2.2.3. Factores intervinientes en la formación del biofilm

La formación de biofilm está determinada por:

2.2.3.1. Condiciones de la superficie

La superficie sólida puede tener varias características que son importantes para el proceso de adhesión. La colonización microbiana se incrementa cuando la rugosidad de la superficie aumenta y el área de superficie es mayor. Las propiedades fisicoquímicas de la superficie pueden influir mucho en la adhesión microbiana, muchos investigadores han encontrado que la adhesión microbiana es más rápida en superficies hidrófobas como teflón y otros plásticos que sobre materiales hidrofílicos como el vidrio o metales.

2.2.3.2. Especies bacterianas

Las bacterias pueden colonizar una amplia variedad de superficies en ambientes bióticos o abióticos habitados por formas superiores de vida y espacios adversos; su habilidad para persistir en la biosfera obedece en parte a su versatilidad metabólica y su plasticidad genotípica. Además, la superficie hidrófoba de la célula, la presencia de fimbrias y flagelos y la producción de exopolisacáridos (EPS), influyen en la capacidad de las células microbianas para adherirse.

La hidrofobicidad de la superficie celular es importante para la adhesión ya que las interacciones hidrófobas tienden a incrementarse cuando aumenta la despolaridad natural entre uno o ambas superficies involucradas (superficie celular y el substrato de la superficie).

Las fimbrias y flagelos aparte de estar involucrados en la transferencia de virus o ácidos nucleicos bacterianos, contribuyen dando hidrofobicidad a la superficie celular ya que muchas de ellas contienen aminoácidos hidrófobos. Por otra parte se sabe que las células inmóviles no recolonizan las áreas de un sustrato como lo hacen las células móviles, resultando más lenta la formación de un biofilm por las células inmóviles. Los flagelos aparentemente tienen un papel importante en las primeras etapas de la adhesión bacteriana al vencer las fuerzas de repulsión asociadas con el sustrato. La adhesión de los microorganismos a las superficies es un proceso muy complejo, con muchas variables que afectan su éxito. En general, la adhesión puede ocurrir más fácilmente en superficies rugosas, muy hidrófobas, y cubiertas por una película.

2.2.3.3. Factores medioambientales

Otras características del medio acuoso como son el pH, cantidad de nutrientes, cargas iónicas, temperatura y fluidez pueden jugar un papel importante en la adhesión bacteriana al sustrato. Varios estudios muestran el efecto de los medios acuosos sobre la adhesión bacteriana y la formación del biofilm. Fletcher, observó que el incremento de varios cationes (sodio, calcio y hierro) afecta la adhesión de la *Pseudomonas fluorescens* a las superficies de vidrio, presumiblemente porque reduce las fuerzas repulsivas entre la carga negativa de las células bacterianas y la superficie del vidrio.

El incremento de la concentración de nutrientes en el medio está relacionado con el incremento del número de células bacterianas adheridas. Ofek y Doyle, observaron que la carga del fluido puede afectar la interacción entre la célula y la superficie. De igual manera la velocidad de las turbulencias fluctuantes en el medio puede afectar la formación del biofilm.

2.2.4. Fases de formación del biofilm

Las 5 fases en el desarrollo de una biopelícula y los procesos involucrados en ellas se describen en detalle a continuación.

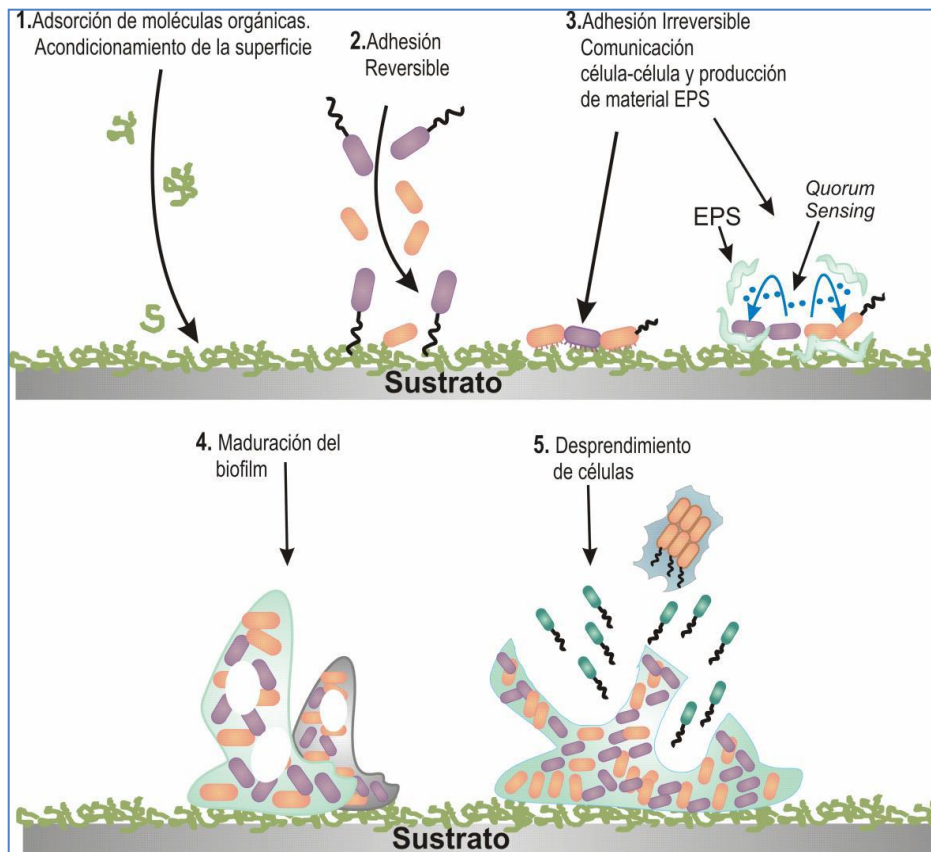


Grafico 1: Esquema representando las etapas presentes durante el desarrollo de un biofilm sobre un sustrato

2.2.4.1 Etapa 1: Acondicionamiento de la superficie

Existen factores externos que afectan la adhesión de las bacterias desde un medio líquido sobre un sólido.

- Factores físicos: Los factores físicos más importantes son la tensión de corte, temperatura, rugosidad, topografía y carga superficial. Estos factores influyen en el transporte, los fenómenos interfasiales, el desprendimiento y las reacciones en la interfase.
- Factores químicos: Los factores químicos son numerosos, algunos de los más importantes son: la composición de la superficie del sustrato, la composición del medio en el que se desarrolla el biofilm, el pH, el oxígeno disuelto. La materia orgánica presente en el agua se adsorbe sobre las superficies y forma lo que se conoce como “película acondicionante” (*conditioning film*), cambiando las propiedades químicas y físicas de la interfase sustrato/fluido y tornándola más amigable para la adhesión bacteriana.

2.2.4.2 Etapa 2: Adhesión Reversible

La adhesión primaria (reversible) de bacterias a una superficie o a un sustrato puede ser de dos maneras:

- Activa: La motilidad, otorgada por flagelos, fimbrias y pilis tipo IV, ayudaría a la bacteria a alcanzar la superficie en las etapas iniciales de la adhesión, siendo su función principal vencer las fuerzas de repulsión más que actuar como adherente.

Sin embargo, la motilidad no parece ser un requisito esencial para el acercamiento al sustrato, puesto que bacterias gram positivas inmóviles, como estafilococos, estreptococos y mico bacterias, también poseen la capacidad de formar biofilms.

En el caso de las bacterias gram positivas se ha descrito, en esta primera etapa, la participación de proteínas de superficie. Una vez que llegan a la superficie pueden desplazarse sobre ella mediante movimientos individuales o grupales.

- Pasiva: Factores externos tales como la gravedad, difusión, precipitación de partículas y dinámica de fluidos pueden favorecer la adhesión de los microorganismos a cualquier superficie.

Las propiedades fisicoquímicas de la superficie también pueden ejercer una fuerte influencia en el grado y extensión de la adhesión, que se analizará en particular. En la adhesión bacteriana primaria pueden también influir, tal como se mencionó previamente, variaciones en la velocidad de flujo, temperatura del agua, y concentración de nutrientes. Así, por ejemplo, se ha encontrado que la variación en la concentración de diversos cationes (sodio, calcio, hierro) afecta la adhesión de *Pseudomonas spp* a superficies de vidrio. (3)

Una vez que las bacterias se encuentran cerca de la interfase, interacciones de largo alcance entre las células y la superficie del sólido determinan si la célula será atraída o repelida desde la interfase. (4)

Frecuentemente, se tiende a predecir o interpretar el mecanismo de adhesión microbiana mediante los conceptos desarrollados en la literatura de coloides. (5)

Al respecto debe tenerse en cuenta que generalmente, se considera que las fuerzas de largo alcance gobiernan la velocidad de deposición de una partícula coloidal cargada sobre una superficie.

Estas fuerzas incluyen las interacciones de van der Waals de largo alcance y las fuerzas electrostáticas de doble capa que constituyen la base de la teoría DLVO (Derjaguin, Landau, Verway y Overbeek. (6)

Las fuerzas de van der Waals son generalmente atractivas y resultan de las interacciones entre dipolos inducidos entre moléculas de la partícula coloidal y moléculas de la superficie. Las fuerzas eléctricas de doble capa se generan a partir del solapamiento de las nubes electrónicas de los contra iones de las superficies cargadas y el cambio en la energía libre a medida que las superficies se alejan o se acercan. El resultado es una fuerza neta de atracción entre superficies cargadas opuestamente y una fuerza neta repulsiva entre superficies de cargas de igual signo.

Las expresiones basadas en la teoría DLVO para aproximar las interacciones y la energía potencial como función de la distancia de separación han sido desarrolladas y validadas para sistemas ideales en donde se asume que las superficies que interactúan son homogéneas, uniformemente cargadas y molecularmente planas. Evidentemente, estas aproximaciones claramente no se verifican para las bacterias reales, por lo que la naturaleza real de las fuerzas de largo alcance puede ser significativamente diferente. De hecho, debido a la estructura heterogénea macromolecular de las superficies celulares, existe un gran número de limitaciones al momento de aplicar la teoría DLVO en las predicciones cuantitativas de la adhesión microbiana. Entre ellas pueden mencionarse:

- El concepto de distancia de separación requiere un límite definido entre la superficie y el medio; sin embargo, el punto de referencia para determinar la distancia de separación no es evidente en el caso de las bacterias. Por ejemplo, las cargas

involucradas en cualquier interacción electrostática pueden estar difusamente dispersas en el glicocálix (material filamentoso que recubre a ciertos microorganismos) de la célula en vez de presentarse en una capa plana.

- - La longitud de la escala a partir de la cual las fuerzas ejercen su influencias (menor que 1 nm para las fuerzas electrostáticas en una solución fisiológica) es generalmente menor que el tamaño característico de las macromoléculas ubicadas en la interfase bacteria/sustrato.
- - Las interacciones estéricas o de enlace entre las macromoléculas de la interfase, particularmente las de los apéndices extracelulares (pilis, fimbrias y flagelos) pueden dominar sobre cualquier interacción tipo DLVO.
- Las expresiones resultantes de la teoría DLVO que predicen las fuerzas vs la distancia de separación asumen que las interacciones célula-sustrato se encuentran en un equilibrio termodinámico para cualquier distancia de separación. Sin embargo, a medida que la célula se acerca a la superficie, se requiere una significativa cantidad de tiempo para que las macromoléculas en la interfase se unan a la superficie del sustrato y se reorganicen durante dicho estado transitorio para obtener las configuraciones de menor energía. (7) (8)

Por todas las razones mencionadas anteriormente, no resulta sorprendente que la aplicación de la teoría DLVO a los estudios de adhesión microbiana haya dado resultados no coincidentes aún en el caso de la predicción de tendencias cualitativas. Por lo tanto, se necesitan teorías más detalladas y realistas que tengan en cuenta la estructura macromolecular de la superficie celular y las interacciones

de enlace discretas o las repulsiones estéricas en la interface así como otros factores biológicos. El avance hacia este tipo de teorías requiere técnicas sofisticadas de medidas de fuerzas entre las superficies, algunas de estas fuerzas podrían llegar a determinarse con un microscopio de fuerza atómica.

2.2.4.3 Etapa 3: Adhesión Irreversible

El cambio desde la adhesión reversible a irreversible se produce por la transición desde una interacción débil de la célula con el sustrato hasta un enlace permanente, frecuentemente mediado por la presencia de polímeros y apéndices extracelulares. Investigaciones recientes han sugerido que la transición hasta la adhesión permanente a una superficie está acompañada por cambios fisiológicos profundos. (9)

En esta segunda fase de adhesión, predominan las reacciones moleculares entre las estructuras superficiales bacterianas y la superficie del sustrato. Estas reacciones implican una adhesión firme entre la bacteria y la superficie mediadas por estructuras poliméricas superficiales como, por ejemplo, cápsulas, fimbrias, pilis y EPS. La adhesión irreversible específica puede ser definida como la unión específica entre las adhesinas bacterianas (un componente específico molecular de la superficie bacteriana) y un receptor del sustrato (un componente específico de la superficie del material o tejido superficial) estando menos afectada por factores ambientales (pH, electrolitos y temperatura).

Debe tenerse en cuenta que la pared celular de una bacteria Gram-negativa como las *Pseudomonas* consta de tres regiones, una membrana exterior, una monocapa de peptidoglicano y una membrana interior plasmática.

Estas dos membranas pueden mostrar continuidad en varios puntos de adhesión y pueden también estar unidas por los cuerpos basales del flagelo.

Las cápsulas bacterianas son estructuras superficiales compuestas por polisacáridos y proteínas. (10)

En varios trabajos se ha sugerido que los polisacáridos y proteínas de la superficie celular pueden actuar como adhesinas bacterianas. (11)

El sello distintivo que diferencia a los biofilms de las bacterias simplemente adheridas a una superficie es que los biofilms contienen EPS que rodea a las bacterias residentes. El EPS microbiano consiste en polímeros biosintéticos que pueden variar su composición química y también polisacáridos sustituidos y no sustituidos, proteínas sustituidas y no sustituidas, ácidos nucleicos y fosfolípidos. (12)

La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía desde alginato en *P. aeruginosa*, celulosa en *Salmonella typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *Vibrio cholerae* hasta poly-N-acetilglucosamina en *Staphylococcus aureus*. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz de la biopelícula. (13)

El material extracelular exudado por las bacterias, es liberado por las células y luego se dispersa parcialmente en medio líquido. (14)

Las especies bacterianas que no producen EPS son menos adherentes y menos patogénicas. Se ha sugerido que la producción de EPS es importante durante la conexión intercelular durante la colonización superficial, protección contra fagocitosis e interferencia contra la respuesta inmune celular y la reducción de los efectos de los antibióticos.

Entre los componentes del EPS mejor caracterizados se encuentra el alginato, que está involucrado en la formación de biofilms por parte de *P. aeruginosa* en infecciones pulmonares y en sistemas de aguas industriales. La producción de alginato está regulada en respuesta a una variedad de factores ambientales y puede activarse, por ejemplo, durante la limitación de nitrógeno, por perturbación de la membrana inducida por etanol, y en presencia de soluciones de alta osmolaridad. (15) (16)

La producción de alginato ocurre en la etapa inicial del desarrollo del biofilm de *P. aeruginosa*, y se supone que forma parte de la estructura necesaria para la maduración del mismo.

Las fimbrias (o pilis) son un grupo de apéndices rígidos, rectos y filamentosos sobre la superficie bacteriana. Estos pilis, pueden observarse generalmente mediante microscopía electrónica de barrido. Sobre la superficie celular pueden encontrarse cientos de fimbrias. (17)

Se encuentran principalmente en las bacterias Gram-negativas y se cree que son estructuras adhesivas importantes sobre la superficie celular. Las fimbrias son apéndices celulares más amorfos que no presentan la estructura filamentosa regular de las fimbrias.

Las estructuras fibrilares se han observado en la superficie de varios *Streptococos* y se ha reportado que contribuyen para una mejor adhesión en sustratos de hidroxiapatita. (18)

Los pilis sexuales son apéndices proteináceos que se presentan en bacterias donoras y cuya presencia está determinada por la presencia de plásmidos conjugados. Los flagelos están compuestos por polipéptidos que forman parte del filamento (20 nm de diámetro) y un cuerpo basal complejo que interactúa tanto con la membrana interior como la exterior. (19)

Uno de los mecanismos de transición de adhesión reversible a irreversible está mediado, en algunos microorganismos como las *Pseudomonas*, por los pilis tipo IV. El pili polar tipo IV puede extenderse y contraerse, impulsando al microorganismo a través de la superficie.

La movilidad superficial tipo *twitching* es una forma de desplazamiento mediado por pilis utilizada por *P. aeruginosa*. Los autores O'Toole y Kolter sugieren que este tipo de movilidad es uno de los factores responsables de la formación de micro colonias. Proponen, además, que las interacciones entre bacterias sobre la superficie, formando grupos ordenados de células, refuerzan el grado de adhesión a una superficie.

En el caso del microorganismo *Staphylococcus epidermidis*, se ha demostrado que las células adherentes producen un polisacárido intercelular que une a las células entre sí y facilita la formación de micro colonias y la maduración del biofilm. Por lo tanto, durante estas primeras etapas de formación del biofilm es de suma importancia tanto la movilidad superficial como la organización de los

microorganismos sobre la superficie del sustrato. Los movimientos individuales y grupales de las bacterias se discutirán específicamente en las secciones siguientes del presente capítulo junto con las formas de comunicación célula-célula que intervienen tanto en los estadios iniciales de adhesión reversible como en la adhesión irreversible, durante el desarrollo de biofilm maduro y frente a cambios en el medio circundante.

2.2.4.4 Etapa 4: Maduración del biofilm

La siguiente etapa del desarrollo del biofilm corresponde a la maduración que da como resultado una arquitectura compleja, con canales, poros y redistribución de bacterias en el sustrato. (20)

La densidad global y la complejidad del biofilm aumentan a medida que los organismos adheridos se replican, mueren y los componentes extracelulares de las bacterias interactúan con las moléculas orgánicas e inorgánicas presentes en el medio ambiente circundante. El potencial crecimiento de cualquier biofilm está limitado por la disponibilidad de nutrientes en el ambiente inmediato, la penetración de estos nutrientes dentro del biofilm y la eliminación de residuos. Otros factores que pueden controlar la maduración del biofilm son el pH interno, la penetración de oxígeno y fuentes de carbono y la osmolaridad.

2.2.4.5 Etapa 5: Desprendimiento de bacterias

El término desprendimiento es un término que se utiliza para describir la liberación de células (ya sea individualmente o en grupos) de un biofilm o sustrato. El desprendimiento activo es un evento fisiológicamente regulado, pero sólo pocos estudios han demostrado la base biológica para este proceso. Allison y colaboradores han reportado que luego de una extensa incubación, los biofilms de *P.*

fluorescens pueden desprenderse y al mismo tiempo reducir la producción de EPS.

Se ha sugerido que la necesidad de nutrientes o la presencia de sustancias agresivas pueden conducir al desprendimiento de células en busca de ambientes nutritivamente ricos o menos nocivos mediante un mecanismo aún desconocido. (21)

Las células del biofilm dispersadas pueden revertir su estado al crecimiento planctónico, por lo que, el desarrollo de vida del biofilm se transforma en un ciclo completo. (22)

Otro punto a tener en cuenta es que una micro colonia en división continua libera residuos y nutrientes que podrán utilizarse para acondicionar las superficies desnudas y para alimentar a otras células.

Si las condiciones de flujo hídrico lo permiten, se establece el equilibrio entre el crecimiento de la colonia y el flujo laminar del agua que favorece la liberación de pocas células, pero con un flujo intenso o turbulento se pueden desprender muchas más.

Los tres principales mecanismos para generar el desprendimiento serían: (a) erosión: remoción continua de pequeñas partes del biofilm; (b) separación: remoción rápida y masiva; y (c) abrasión: liberación por colisión de partículas suspendidas en el líquido circundante con el biofilm. La separación es menos frecuente que la erosión, y se piensa que derivaría de la disminución de nutrientes u oxígeno en el interior del biofilm. Se observa preferentemente en biofilms voluminosos, que se han desarrollado en medioambientes ricos en nutrientes.

La separación y erosión proporcionarían los mecanismos para que las bacterias migren desde zonas densamente colonizadas a áreas desnudas que podrían favorecer mejor su desarrollo, logrando así formar nuevos biofilms en sitios distantes. Un ejemplo de este tipo de desprendimiento es la sepsis recurrente en un paciente con un catéter infectado.

La forma en que se produce la dispersión afectaría, aparentemente, las características fenotípicas de los microorganismos. Los conglomerados desprendidos desde el biofilm conservarían, probablemente, ciertas características de éste, tales como la resistencia antimicrobiana. En cambio, las células bacterianas liberadas aisladamente parecen volver rápidamente a su fenotipo planctónico, tornándose nuevamente susceptibles a las defensas del huésped y a los antimicrobianos.

2.2.5. Biofilms en el organismo humano

El Instituto Nacional de Salud de EE.UU. publicó recientemente que más del 60% de todas las infecciones microbianas son causadas por biofilms, de igual manera se les atribuye el 60% de las infecciones nosocomiales; incrementando la estancia hospitalaria, los costos de atención y la mortalidad en el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad. La infección causada por un biofilm está demostrada por síntomas que clínicamente recurren durante el tratamiento con antibióticos. En esta infección no se conoce el agente causal específico, son de transcurso crónico y persistente, lo que hace difícil su erradicación. El biofilm es la causa de infecciones comúnmente repetitivas del tracto urinario, causadas por *E. coli* y otros patógenos, otitis media en niños causadas por *Haemophilus influenzae*, endocarditis de las válvulas mitrales e infecciones pulmonares en

pacientes con fibrosis quística causadas por *Pseudomona aeruginosa*.

Con el desarrollo de la tecnología médica, aparecieron materiales que permiten ser implantados en el organismo sin causar reacciones adversas tales como implantes de válvulas cardíacas, implantes de cadera, marcapasos e incluso implantes dentales de oseointegración; También están incluidos aparatos de implantación temporal o parcial como catéteres. A pesar del gran avance de la medicina, la introducción de un material nuevo al organismo, simplemente genera un nicho óptimo para la formación del biofilm.

2.2.6. Resistencia bacteriana asociada a los biofilm

Davies et al. y Hoyle et al. En 1993, demostraron que las bacterias planctónicas que existían alrededor de un nicho ecológico homogéneo son fenotípicamente diferentes de aquellas células genéticamente iguales pero que crecen en la superficie de un biofilm organizado.

Esto se debe, a que su actividad metabólica, sus propiedades de adhesión y su susceptibilidad ante agentes antimicrobianos, es diferente en ambos grupos bacterianos. Una de las ventajas más importantes del biofilm es la protección ante agentes antimicrobianos como antibióticos. Esta protección ocurre a través de varios mecanismos: la producción masiva de exopolisacáridos y a una disminución en la velocidad de crecimiento bacteriano dentro del biofilm lo que hace más lento su metabolismo y de esta manera se ven menos afectados por los antimicrobianos.

Por último algunas células del biofilm pueden desarrollar resistencia frente a antimicrobianos a nivel genético e incluso pueden transferir esta resistencia a otros organismos dentro del biofilm por medio de plásmidos.

Las células pueden tornarse resistentes debido a mutaciones afectando el objetivo del medicamento, o la producción de enzimas modificadoras. Además se debe tomar en cuenta la heterogeneidad de las comunidades celulares que componen el biofilm indicando que un antibiótico no necesariamente afectará a todas las colonias. La resistencia de las bacterias a los antibióticos está afectada por su estado nutricional, la tasa de crecimiento, la temperatura, el pH y la exposición previa a dosis sub-letales del agente antibiótico.

Enzimas que segregan las bacterias al espacio extracelular, como las B-lactamasas, formaldehído, deshidrogenasa, etc. que suponen la ineficacia de determinados antibióticos. Las últimas investigaciones al respecto proponen la idea de que existan subpoblaciones de bacterias “superresistentes”.

La falta de permeabilidad y el flujo constante de sustancias de desecho hacia el exterior impide el ingreso de células y productos del sistema inmune, así como de agentes antibacterianos. De esta forma, los biofilms que representan una forma única de organización bacteriana tienen la capacidad de auto perpetuarse y generar infección en el organismo; gracias a todas sus características, se hace difícil el tratamiento terapéutico con los medios convencionales.

2.2.7. PROBLEMATICAS ASOCIADAS A LOS BIOFILMS

La formación de biofilms se ve favorecida por un diseño higiénico inadecuado, un deficiente programa de limpieza y desinfección o por un mal mantenimiento de los materiales e instalaciones.

En las salas blancas los biofilms constituyen reservorios de microorganismos que pueden contaminar alimentos e instalaciones y pueden ocasionar diversos problemas:

- Tecnológicos, como obstrucción de conductos, corrosión, disminución de la transferencia energética, etc.
- Calidad del producto alimenticio, ayudando a la proliferación de microorganismos alterantes que afectan al aspecto, vida útil y a las propiedades organolépticas.
- Seguridad alimentaria, por la proliferación y resistencia de microorganismos patógenos, ya que el biofilm actúa como reservorio de patógenos como *Listeria* o *Salmonella*.

2.2.8. DETECCIÓN DE BIOFILM

La detección de los biofilms es imprescindible para poder aplicar estrategias eficaces para su control, aunque presenta varias dificultades:

- a) Los biofilms son de tamaño microscópico, y no pueden detectarse a simple vista.
- b) Su detección exige usualmente métodos lentos y complejos.
- c) Las técnicas de detección suelen carecer de la especificidad necesaria, ya que detectan células y no el biofilm.

Normalmente la detección de biofilms implica la toma de muestras de las superficies y el análisis de las mismas por medida de bioluminiscencia del ATP, que cuantifica las células presentes independientemente de que sean viables o no, o por recuento microbiológico que refleja las células viables presentes.

En cualquier caso se trata de técnicas no específicas, ya que están orientadas a la detección de restos celulares o microorganismos viables, independientemente del estado de su asociación, por lo que se hace necesario disponer de nuevas técnicas rápidas, selectivas y sencillas que faciliten el control de la contaminación por biofilms.

Con el objetivo de cubrir estas necesidades, Betelgeux ha llevado a cabo un proyecto de investigación y desarrollo, en colaboración con el Departamento de Tecnología de los Alimentos de la Universidad Complutense de Madrid y el centro tecnológico Ainia.

Este proyecto, subvencionado por el CDTI, ha estado enfocado al desarrollo de nuevas herramientas para la detección y eliminación de biofilms que mejoren las soluciones disponibles actualmente para el control de la contaminación por biofilms. (23)

El diseño de una técnica para la detección selectiva de biofilms se basó en el empleo de agentes de tinción capaces de teñir la matriz extracelular que forma parte de la estructura de los biofilms. Estos colorantes se seleccionaron en función de su capacidad para teñir biofilms formados por algunos de los patógenos más comunes en la industria alimentaria (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus aureus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes*) y la ausencia de coloración en presencia de residuos habituales en las industrias alimentarias (grasa, proteínas, aceites, etc.).

Asimismo, se desarrolló un sistema para la aplicación de estos agentes de tinción sobre las superficies en forma de espuma, con el objetivo de facilitar la aplicación en un área de muestreo determinada y asegurar el tiempo de contacto necesario para la tinción del biofilm.

La identificación de la presencia de biofilms se produce tras el aclarado con agua de la superficie analizada, eliminando la espuma colorante y revelando zonas de crecimiento de biofilm que muestran una coloración permanente de color fucsia (**Gráfico N° 2**).

Como resultado de este proyecto, ya se encuentra disponible el test de detección de biofilms TBF 300, una novedosa herramienta que permite la detección rápida (no más de cinco minutos), sencilla y selectiva de biofilms en superficies como acero, aluminio o teflón, con un coste inferior a otras técnicas como la bioluminiscencia de ATP o el cultivo de placas.

Este producto se ha ensayado en diversas industrias alimentarias, demostrando ser una herramienta muy útil para la identificación rápida de puntos donde la limpieza y desinfección no ha conseguido eliminar los biofilms presentes y que requieren una higienización más exhaustiva. TBF 300 se presenta en envases de 150 ml, que permiten muestrear alrededor de 300 puntos (área de muestreo recomendada de 10 cm²), resultando así adecuado para su utilización rutinaria como parte del plan de control de la limpieza y desinfección de las instalaciones.

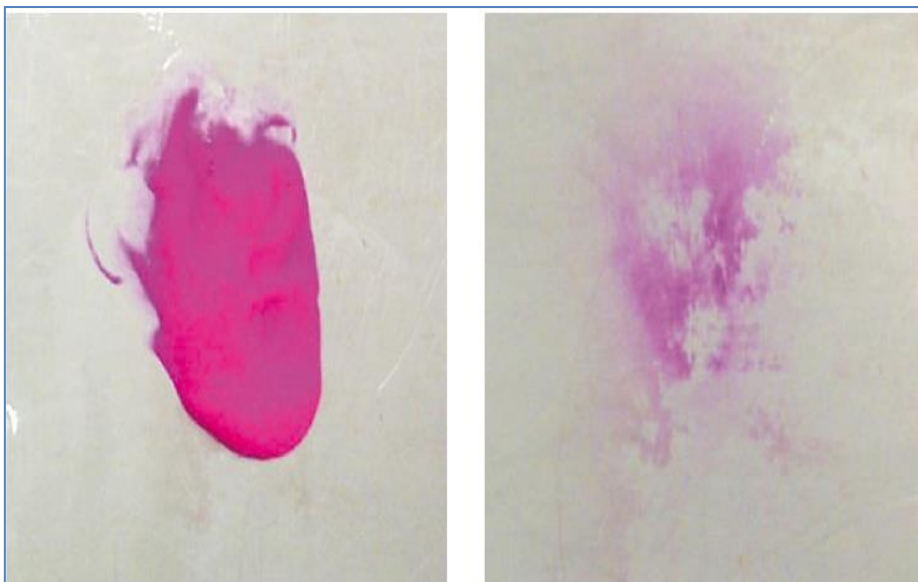


Grafico 2: La aplicación y posterior aclarado del producto TBF 300 en una superficie de acero revela la presencia de biofilm por medio de una coloración permanente y detectable a simple vista.

2.2.8.1. Evaluación de la capacidad para formar biofilm

Cada cepa se inoculó en un tubo con 5 ml de caldo tripticasa soya e incubó por 24 horas a 37 °C. Luego se vació el contenido del tubo y se le agregaron 4 ml de safranina al 2% y se dejó en reposo durante 5 minutos, nuevamente se vació el tubo. La biopelícula se adhiere a las paredes del tubo y se tiñe con la safranina, por lo cual se detecta debido a esa coloración, lo que se confirma microscópicamente como la presencia de materiales adheridos a las paredes del tubo. (24)

2.2.9. Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación.

Pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de β -lactamasas como el tazobactam y el sulbactam. Las BLEE clásicas derivan de la β -lactamasas con actividad fundamentalmente penicilinasas e inhibibles por el ácido clavulánico, como TEM-1, TEM-2 y SHV-1, enzimas del grupo 2b de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros. Debido a mutaciones en su centro activo, han extendido su efecto hidrolítico a las cefalosporinas de espectro extendido y a los monobactámicos. Las BLEE, por lo tanto, se engloban dentro del grupo 2be de la clasificación antes mencionadas. (25)

Las cepas que producen BLEE, en su mayoría enterobacterias, y en particular *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, son resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos con la excepción de las carbapenemas, las cefamicinas y las combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas. Además de las BLEE clásicas, de naturaleza plasmídica, existe una serie de microorganismos que producen β -lactamasas cromosómicas que, en el caso de una hiperproducción, confieren fenotipos de resistencia similares al que determinan las BLEE, esto es, resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido e inhibición por el ácido clavulánico. Entre las enterobacterias que producen de forma natural este tipo de β -lactamasas se encuentran *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus* y distintas especies del género *Kluyvera*.

De hecho, en los últimos años, como se comentará posteriormente, están adquiriendo gran relevancia un nuevo tipo de BLEE plasmídicas, denominadas CTX-M que, precisamente, derivan de la β -lactamasa cromosómica de distintas especies del género *Kluyvera*. Por lo general, cuando hablamos de BLEE nos referimos únicamente a las enzimas de codificación plasmídica ya que son éstas las que suponen un mayor problema epidemiológico debido a su elevada

capacidad de diseminación. También existen otras BLEE, algunas de ellas descritas en *Pseudomonas aeruginosa*, con menor importancia epidemiológica desde el punto de vista de su diseminación, al menos por el momento en España (Tabla 1).

Tabla 1:

Diferentes grupos de β -lactamasas de espectro extendido.

BLEE	β-lactamasa relacionada	País de origen	Especies en las que se detectaron inicialmente
TEM	TEM-1, TEM-2	Francia	<i>Enterobacteriaceae</i>
SHV	SHV-1/LEN	Alemania	<i>P. aeruginosa</i> /BGNNF
CTX-M	KLUA <i>Kluyvera</i>	Alemania/Argentina	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp.
OXA	OXA-10	Turquía / Francia	<i>P. aeruginosa</i>
PER		Francia	<i>P. aeruginosa</i>
VEB	PER	Vietnam/Tailandia	<i>E. coli</i>
TLA	CME-1	Méjico	<i>E. coli</i>
GES/IBC		Guayana/Sudáfrica	<i>K. pneumoniae</i> / <i>P. aeruginosa</i>
BES	<i>Y. enterocolitica</i>	Brasil	<i>S. marcescens</i>
SFO	AmpA <i>S. fonticola</i>	Japón	<i>E. cloacae</i>

2.2.9.1. Métodos de detección y caracterización de las enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido

La mayoría de los métodos descritos para detectar microorganismos productores de BLEE han sido diseñados para enterobacterias y se fundamentan en el carácter inhibe de estas enzimas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de β -lactamasas. Existen también otros métodos basados en bioensayos, en el análisis del perfil de sustrato o en técnicas moleculares, aunque son más propios para su caracterización. Con independencia de ello, la aplicación de los métodos que se describen a continuación debe ir precedida de un riguroso análisis del perfil de sensibilidad a los antimicrobianos, con los criterios

habituales de lectura interpretada del antibiograma, que permita detectar fenotipos compatibles con su presencia. En algunos casos, dado que se encuentran preferentemente en determinantes genéticos transferibles, es necesario transferir la resistencia conferida por la BLEE a otro microorganismo en el que sea más sencilla la demostración de su presencia.

Son los métodos más sencillos. El más difundido en los laboratorios clínicos es el de aproximación de discos, también denominado de doble difusión con discos. Fue descrito por Jarlier en 1988 y consiste en la disposición de un disco convencional de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg) en el centro de una placa a una distancia de 30 mm de otros con ceftazima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg) y aztreonam (30 µg).

La ampliación de alguno de los halos de inhibición manifiesta la producción de la BLEE. Esta prueba ha sufrido diferentes modificaciones para aumentar su eficiencia entre ellas la reducción de la distancia entre los discos (a 20 mm), la utilización de un inóculo algo más elevado que el habitual en las pruebas de difusión y la utilización de cefaloporinas de cuarta generación, esencialmente la cefepima. Con ello se facilita la detección de cepas con BLEE con poca eficiencia hidrolítica y, por lo tanto, con halos de inhibición poco afectados, así como de microorganismos productores de β-lactamasa AmpC (*Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*) que podrían enmascarar su presencia.

Las limitaciones de la doble difusión con discos dependen de la pericia en la realización de la prueba (disposición de los discos) y de la interpretación de la sinergia. En algunas cepas con problemas de permeabilidad o con resistencia simultánea a los inhibidores de β -lactamasas puede verse mermada la capacidad de detección de esta prueba. Asimismo, pueden producirse falsos positivos en cepas hiperproductoras de SHV-1, o que presenten β -lactamasas cromosómicas sensibles a los inhibidores (*K. oxytoca*, *Proteus vulgaris* o *Stenotrophomonas maltophilia*).

En la actualidad existen sistemas comerciales que añaden inhibidores de β -lactamasas, esencialmente ácido clavulánico, a las cefalosporinas de amplio espectro, cefotaxima, ceftazidima y cefepima. Por ejemplo, debe destacarse los discos con ácido clavulánico [ceftazidima-clavulánico (30-1 μ g), cefotaxima-clavulánico (30-1 μ g) y cefepimaclavulánico (30-1 μ g)], y las tiras de test, que contienen en una parte de ellas concentraciones decrecientes de la cefalosporina y en la otra la misma cefalosporina con una concentración fija de ácido clavulánico (2 μ g) por cada concentración. En todos los casos es recomendable utilizar simultáneamente los discos o las tiras de ceftazidima y cefotaxima en asociación con el ácido clavulánico ya que no todas las enzimas hidrolizan por igual estos dos sustratos, y con la utilización exclusiva de uno de ellos podría limitarse su detección. Éste sería el caso de los microorganismos productores de BLEE de tipo CTXM en los que la utilización de ceftazidima como único sustrato impediría una detección correcta. Habitualmente, la hidrólisis de este último antibiótico por estas enzimas es

muy pobre, al contrario de lo que acontece con la mayoría de las BLEE de los grupos TEM y SHV. Por el contrario, la hidrólisis de la cefotaxima es muy eficiente con las CTX-M, siendo el mejor marcador para su detección. Asimismo, es imprescindible añadir cefepime con clavulánico en los casos en los que se sospeche la presencia de BLEE en los microorganismos productores de AmpC ya que esta cefalosporina de cuarta generación se afecta poco por AmpC, incluso cuando está hiperproducida, y puede observarse la sinergia con el ácido clavulánico en el caso de que exista una BLEE. También se ha propuesto la utilización de discos de cefalosporinas y sulbactam como inhibidor de β -lactamasa pero no han tenido tanto éxito como las propuestas anteriores.

El *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) ha elaborado recomendaciones para la detección de *E. coli* y *Klebsiella* productoras de BLEE.

Sorprendentemente, no establece recomendaciones para microorganismos en los que podrían regir los mismos criterios, como *Salmonella* o *Proteus mirabilis*, o para los productores de AmpC (*E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, etc). El sistema de cribado establecido por el NCCLS recomienda la confirmación de la producción de BLEE en todas las cepas de *E. coli* o *Klebsiella* en que las que se observe una reducción de los halos de inhibición o aumento de los valores de CMI para diferentes cefalosporinas.

Como método de confirmación recomienda la comparación de los halos de inhibición de los discos de cefotaxima o ceftazidima con discos de estos antibióticos a los que se les ha añadido ácido clavulánico (10 µg). También recomienda como método confirmatorio la determinación de las CMI de estas dos cefalosporinas con las correspondientes tras la adición de una concentración fija de 4 µg de ácido clavulánico en todos los pocillos. En el primer caso se requiere un aumento de al menos 5 mm en los halos de inhibición para establecer la presencia de BLEE, mientras que con la CMI debe existir una reducción de al menos tres diluciones para confirmar su producción. Estos criterios han sido validados por diferentes autores, encontrándose una buena sensibilidad y especificidad, superior al 90%, pero que puede variar dependiendo de la colección utilizada para su análisis o de la prevalencia de cepas con BLEE en el caso de evaluarse con aislados consecutivos.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. TIPO DE INVESTIGACION

El presente Trabajo de Investigación está catalogado como un “INVESTIGACION DE TIPO DESCRIPTIVA”. Esta investigación propone recopilar datos en un único momento. Su propósito es describir variables y analizar su incidencia e interrelación en un momento dado. Tiene por finalidad la búsqueda y consolidación del saber y la aplicación de los conocimientos para el enriquecimiento del acervo cultural y científico, así como la producción de tecnología al servicio del desarrollo integral de la sociedad. Según (Hernandez, Fernandez, & Baptista, 2014), es la investigación que se realiza sin manipular deliberadamente variables. Es decir, se trata de estudios donde no hacemos variar en forma intencional las variables independientes para ver su efecto sobre otras variables. Lo que se realizó en la investigación no experimental es observar fenómenos tal como se dan en su contexto natural, para posteriormente analizarlos. Según el alcance del objetivo general y específicos el estudio realizado se catalogó un nivel de Investigación tipo Descriptiva.

3.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACION

El presente Trabajo de Investigación está catalogado como un “INVESTIGACION NO EXPERIMENTAL”

Según(Hernandez Sampieri, Fernandez Collado, & Baptista Lucio, 2011), en el diseño de una investigación no experimental no se genera ninguna situación, sino se observan situaciones ya existentes, no provocadas intencionalmente en la investigación por quien la realiza.

En la investigación no experimental las variables independientes ocurren y no es posible manipularlas, no se tiene control directo sobre dichas variables ni se pueden influir sobre ellas, porque ya sucedieron, al igual que sus efectos.

3.3. POBLACION Y MUESTRA DE ESTUDIO

3.3.1. POBLACION

Es de carácter finita. Está constituido por 229 Enterobacterias aisladas en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco”.

3.3.2. MUESTRA

Se consideró a las 86 Enterobacterias BLEE positivos aisladas en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco”. Se realizó el tipo de muestreo no Probabilístico.

3.4. VARIABLES DE LA INVESTIGACION

El presente estudio se caracteriza por ser bivariable de acuerdo a la naturaleza del tipo y diseño de estudio y los propósitos del investigador.

3.4.1. Variable de estudio 1

- **ENTEROBACTERIAS BLEE POSITIVAS (Betalactamasas de espectro extendido)**

Las bacterias BLEE positivas son bacterias capaces de producir enzimas las cuales previenen el efecto, esto significa que deben utilizarse antibióticos más fuertes para lograr un buen efecto terapéutico; las infecciones ocasionadas por este tipo de bacterias generalmente ocurren en el tracto urinario, pulmones, piel, sangre y en lesiones corporales periféricas

3.4.2. Variable de estudio 2

- **BIOFILM BACTERIANO**

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo.

El crecimiento en biofilms representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. La capacidad de formación de biofilm no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biofilms.

Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias. (25)

3.5. TECNICAS E INSTRUMENTOS DE LA RECOLECCION DE DATOS

3.5.1. Instrumentos de recojo de información

3.5.1.1. Evaluación de la capacidad para formar biofilm (técnica de tinción capas de teñir la matriz extracelular)

En este caso se tomara como modelo una técnica de tinción tomada de un estudio relacionado al proyecto de investigación a realizar a continuación se detalla el procedimiento de la técnica.

Cada cepa se inoculó en un tubo con 5 ml de caldo tripticasa soya e incubó por 24 horas a 37 °C. Luego se vació el contenido del tubo y se le agregaron 4 ml de safranina al 2% y se dejó en reposo durante 5 minutos, nuevamente se vació el tubo. El biofilm se adhiere a las paredes del tubo y se tiñe con la safranina, por lo cual se detecta debido a esa coloración, lo que se confirma microscópicamente como la presencia de materiales adheridos a las paredes del tubo. (24)

3.5.1.2. Métodos de detección y caracterización de las enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido

La mayoría de los métodos descritos para detectar microorganismos productores de BLEE han sido diseñados para enterobacterias y se fundamentan en el carácter inhibe de estas enzimas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de β -lactamasas.

Son los métodos más sencillos. El más difundido en los laboratorios clínicos es el de aproximación de discos, también denominado de doble difusión con discos. Fue descrito por Jarlier en 1988 y consiste en la disposición de un disco convencional de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg) en el centro de una placa a una distancia de 30 mm de otros con ceftazima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg) y aztreonam (30 µg). Con ello se facilita la detección de cepas con BLEE con poca eficiencia hidrolítica y, por lo tanto, con halos de inhibición poco afectados referidos a cefalosporinas de tercera y cuarta generación; estos resultados esperados en base a sensibilidad y resistencias a los antimicrobianos.

3.5.2. Técnicas de recojo de datos

El presente Trabajo de Investigación utilizara una técnica de investigación de tipo “ADMINISTRADA”, mediante la cual se elegirán diversas muestras las cuales se someterán a la técnica procedimental elegida y se evaluará sus resultados.

Tabla 2

Técnicas e Instrumentos de recojo de muestras

TÉCNICAS	INSTRUMENTOS	DESCRIPCIÓN
Selección de Enterobacterias.	Panel de identificación bacteriana y Antibiograma (EQUIPO AUTOMATIZADO MicroScan WalkAway 96 plus)	Identificación de cepas BLEE positivas
Coloración con Safranina	Técnica de tinción capas de teñir la matriz extracelular del biofilm.	Identificación de biofilm

Fuente: Elaboración propia.

3.6. PROCEDIMIENTOS

3.6.1. Selección de Enterobacterias a estudiar (Instrumento de Estudio)

Como primer en la investigación se inició seleccionando todas las Enterobacterias aisladas en los Urocultivos realizados; este paso se fue dando cada día ya que los Urocultivos positivos seguían un transcurso en el que se realiza la preparación de las cepas bacterianas en estudio para su identificación y Antibiograma respectivo; en este caso se usó como instrumento el “Panel de identificación bacteriana y Antibiograma (EQUIPO AUTOMATIZADO MicroScan WalkAway 96 plus). Este equipo tiene instalado fenotipos bacterianos los cuales permiten identificar a las bacterias por género y especie y un dato muy importante que es el Biotipo bacteriano. El biotipo son las configuraciones bioquímicas de cada bacteria aislada el cual le da un conjunto de los caracteres propios su clasificación. Finalmente al obtener esta información se continúa con la selección de las Enterobacterias en estudio y con características de ser BLEE positivas o no gracias a los indicadores que brinda el resultado final del equipo.

3.6.2. Reaslimaniento de Enterobacterias BLEE positivas en medio de cultivo agar enriquecido

En este caso una vez ya obtenidas y seleccionadas las cepas a estudiar se tuvieron que re aislar cada cepa en un medio enriquecido con la finalidad de preparar las cepas y tenerlas en condiciones óptimas; se realizó el re aislamiento medio estrías de la cepa seleccionada y luego se dejó en incubación a 37°C. Se utilizó como medio de cultivo el “AGAR NUTRITIVO” y como medio líquido o diluyente el Caldo tripticasa de soya; se realizaron las proporciones de preparación según las siguientes indicaciones:

- **CALDO TRIPTICASA DE SOYA**
 Suspender 30 gr de medio el polvo en 1 L de agua destilada:
 Mezclar bien.
 Calentar suavemente hasta disolución completa.
 Autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.

- **M EDIO DE CULTIVO “AGAR NUTRITIVO”**
 Suspender 20 gr de medio el polvo en 1 L de agua destilada:
 Mezclar bien.
 Calentar suavemente hasta disolución completa.
 Autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.

3.6.3. Evaluación de la capacidad para formar biofilm (técnica de tinción capas de teñir la matriz extracelular) (Instrumento de Estudio)

En este caso se tomara como modelo una técnica de tinción tomada de un estudio relacionado al proyecto de investigación a realizar a continuación se detalla el procedimiento de la técnica, se utilizó como medio de cultivo el caldo Trypticasa de soya el cual se preparó según las siguientes indicaciones: se suspendió 30 gr en un Lt de agua destilada, después de mezclar y diluir se trató en Autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Cada cepa se inoculó en un tubo con 5 ml de caldo tripticasa soya e incubó por 24 horas a 37 °C. Luego se vació el contenido del tubo y se le agregaron 4 ml de safranina al 2% y se dejó en reposo durante 5 minutos, nuevamente se vació el tubo. El biofilm se adhiere a las paredes del tubo y se tiñe con la safranina, por lo cual se detecta debido a esa coloración, lo que se confirma microscópicamente como la presencia de materiales adheridos a las paredes del tubo.

(24)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Detección de Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en Urocultivos

Para detectar Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017, se analizó la información de 229 Urocultivos, con el objetivo de seleccionar las bacterias BLEE positiva, mediante la lectura de los paneles de identificación microbiana y antibiograma, cuyo resultado se presenta a continuación:

Tabla 3

Resultados de Urocultivos

UROCULTIVOS	N	%
BLEE positivos	86	36.5%
BLEE negativo	143	62.4%
TOTAL DE CASOS	229	100%

Fuente: Elaboración propia

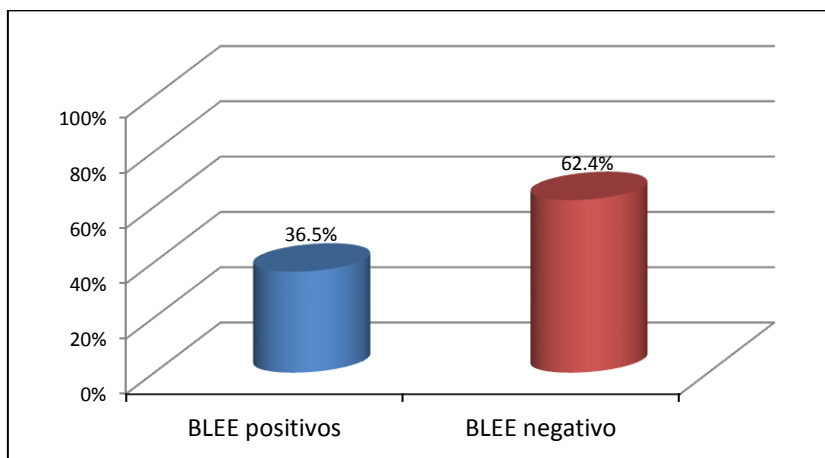


Gráfico 3: Resultados de Urocultivos

Interpretación:

Del total de Urocultivos analizados se presentó 86 casos de Enterobacterias BLEE positivos que representan el total de casos que serán re aislados para evidenciar la formación de biofilm mediante la técnica de coloración.

Tabla 4

Resultados de Enterobacterias BLEE positivos que formaron biofilm

BLEE positivos	N	%
BIOFILM positivos	15	17.4%
BIOFILM negativo	71	82.6%
Total de casos	86	100%

Fuente: Elaboración propia

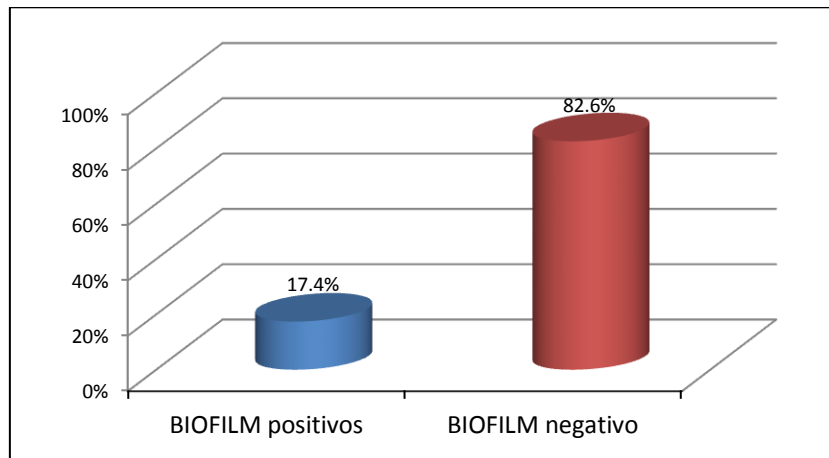


Gráfico 4: Resultados de Enterobacterias BLEE positivos que formaron biofilm

Interpretación:

Del total de Enterobacterias BLEE positivos se presentó 15 casos en el que se evidenciaron la formación de biofilm, que representan el 17.4% del total de casos.

4.2. Determinación del porcentaje de Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm según procedencia

Para determinar el porcentaje de Enterobacterias BLEE positivos que producen biofilm según Consultorios Externos y Hospitalización (procedencia) en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril 2017, se analizó la procedencia de los 15 casos de biofilm, cuyos resultados se presentan a continuación:

Tabla 5

Procedencia de Enterobacterias BLEE positivos que producen biofilm

Procedencia	Especialidad	N	%
Consultorio externos	Medicina general	3	20%
	Reumatología	1	6.7%
	Geriatra	2	13.3%
	Medicina interna	1	6.7%
	Urología	2	13.3%
	Total	9	60%
Hospitalización	Traumatología	1	6.7%
	Oncología	1	6.7%
	Uci	1	6.7%
	Medicina interna	3	20%
	Total	6	40%

Fuente: Elaboración propia

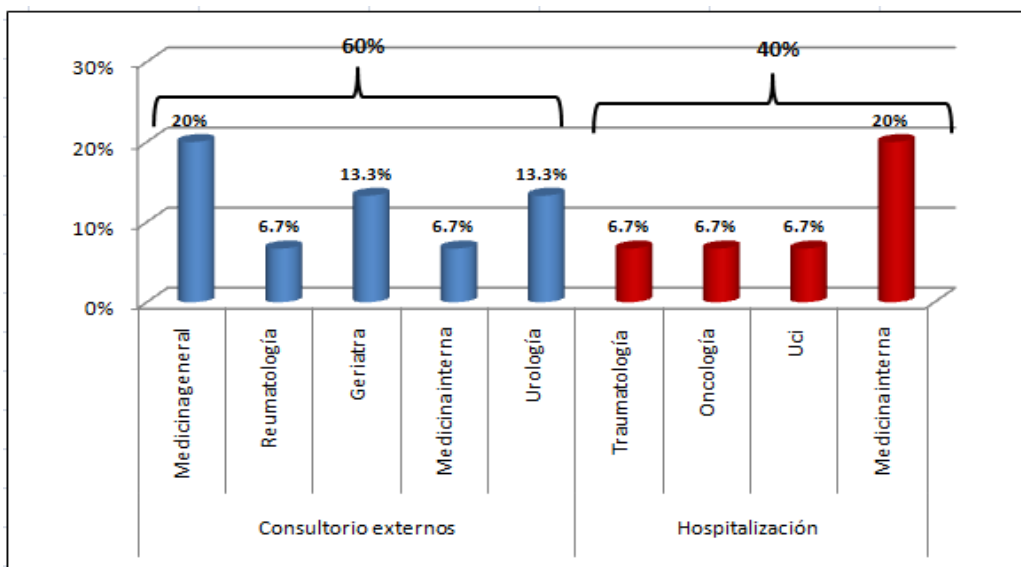


Grafico 5: Procedencia de Enterobacterias BLEE positivos que producen biofilm

Interpretación:

Del total de casos de Enterobacterias BLEE positivos que producen biofilm el 60% corresponde a consultorios externos y el 40% corresponde a hospitalizaciones.

4.3. Identificación de la Enterobacteria BLEE positivos que producen biofilm con mayor incidencia

Para identificar qué Enterobacteria BLEE positivo que produce biofilm representa la mayor incidencia en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017, se analizó los 15 casos de biofilm, cuyos resultados se presentan a continuación:

Tabla 6

Enterobacteria BLEE positivo que produce biofilm con mayor incidencia

BACTERIA	BIOTIPO	N	INCIDENCIA
Escherichia coli	67114012	1	6.67%
Escherichia coli	73015012	1	6.67%
Escherichia coli	73115002	1	6.67%
Klebsiella pneumoniae	77744372	1	6.67%
Escherichia coli	77115012	3	20.0%
Citrobacter freundii	77120042	1	6.67%
Escherichia coli	67114012	1	6.67%
Enterobacter cloacae	73002172	1	6.67%
Escherichia coli	53115012	1	6.67%
Klebsiella pneumoniae	77744370	1	6.67%
Escherichia coli	73105012	1	6.67%
Escherichia coli	77118016	1	6.67%
Klebsiella pneumoniae	76744372	1	6.67%
TOTAL		15	100%

Fuente: Elaboración propia

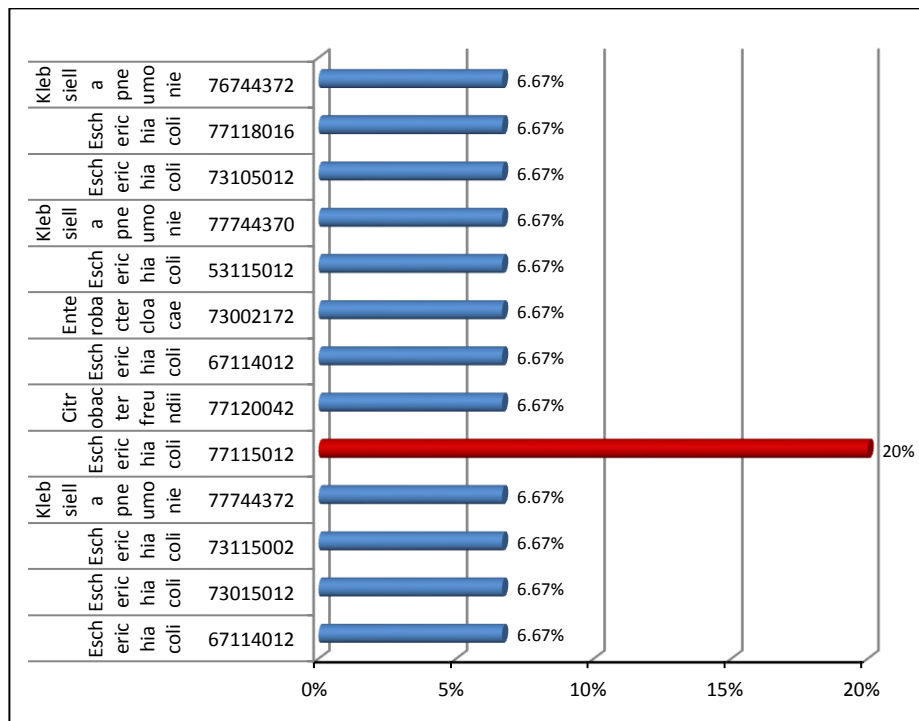


Grafico 6: Enterobacteria BLEE positivo que produce biofilm con mayor incidencia

Interpretación:

Del total de casos de Enterobacterias BLEE positivo que produjeron biofilm, la bacteria que presenta mayor incidencia es la Escherichia coli con biotipo 77115012 que representa el 20% de BLEE positivo que produjeron biofilm.

4.4. Identificación del porcentaje de Enterobacterias BLEE positivos que producen biofilm según género.

Para identificar el porcentaje de Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm según género en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017., se analizó los 15 casos que produjeron biofilm, cuyos resultados se presentan a continuación:

Tabla 7

Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm según genero

SEXO	N°	%
Masculino	6	40%
Femenino	9	60%
TOTAL	15	100 %

Fuente: Elaboración propia

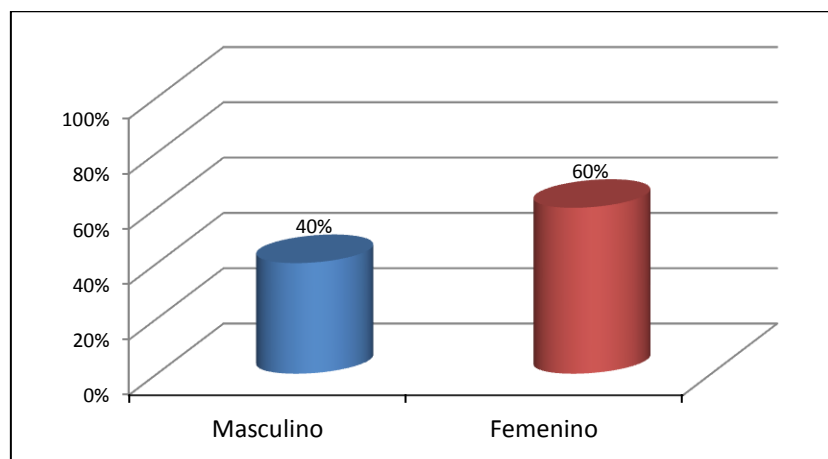


Grafico 7: Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm según genero

Interpretación:

Del total de casos de Enterobacterias BLEE positivo que produjeron biofilm, el 40% representa al sexo masculino, mientras que el 60% representa al sexo femenino.

4.5. Evidencia de la susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de Enterobacterias BLEE positivos que producen biofilm.

Para evidenciar el comportamiento de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de las Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en relación a Carbapenems (ertapenem, imipenem y meropenem), cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Ceftriaxiona, Cefotaxima, Ceftazidima y Cefepime) en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017, se analizó los 15 casos que produjeron biofilm, cuyos resultados se presentan a continuación:

Tabla 8

Evidencia de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm en relación a Carbapenems (Ertapenem, Imipenem y Meropenem)

Resultados/ Antibiograma	N°	%
Resistente	3	20 %
Sensible	12	80 %
TOTAL	15	100%

Fuente: Elaboración propia

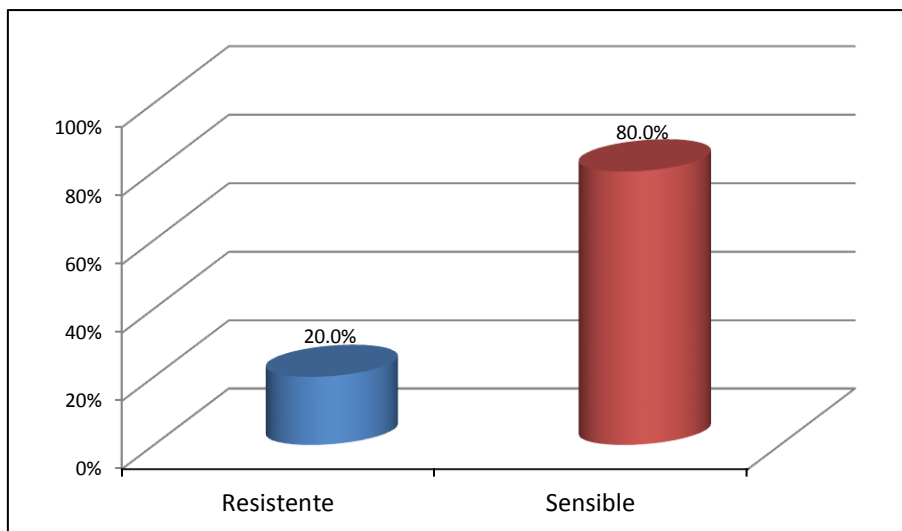


Grafico 8. Evidencia de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm en relación a Carbapenems (Ertapenem, Imipenem y Meropenem)

Interpretación:

Se evidenció que el 20.0 % de las Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm presentaron resistencia a los Carbapenems (Ertapenem, Imipenem y Meropenem) que son 3 casos y 80.0% presentaron sensibilidad que son 12 casos.

Tabla 9

Evidencia de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm según bacteria y biotipo en relación a Carbapenems (Ertapenem , Imipenem y Meropenem)

BACTERIA	BIOTIPO	ANTIBIOGRAMA	N°	INCIDENCIA
Escherichia coli	67114012	Sensible	1	6.67%
Escherichia coli	73015012	Sensible	1	6.67%
Escherichia coli	73115002	Resistente	1	6.67%
Klebsiella pneumoniae	77744372	Sensible	1	6.67%
Escherichia coli	77115012	Sensible	3	20.0%

Citrobacter freundii	77120042	Sensible	1	6.67%
Escherichia coli	67114012	Resistente	1	6.67%
Enterobacter cloacae	73002172	Sensible	1	6.67%
Escherichia coli	53115012	Sensible	1	6.67%
Klebsiella pneumoniae	77744370	Resistente	1	6.67%
Escherichia coli	73105012	Sensible	1	6.67%
Escherichia coli	77118016	Sensible	1	6.67%
Klebsiella pneumoniae	76744372	Sensible	1	6.67%
TOTAL			15	100%

Fuente: Elaboración propia

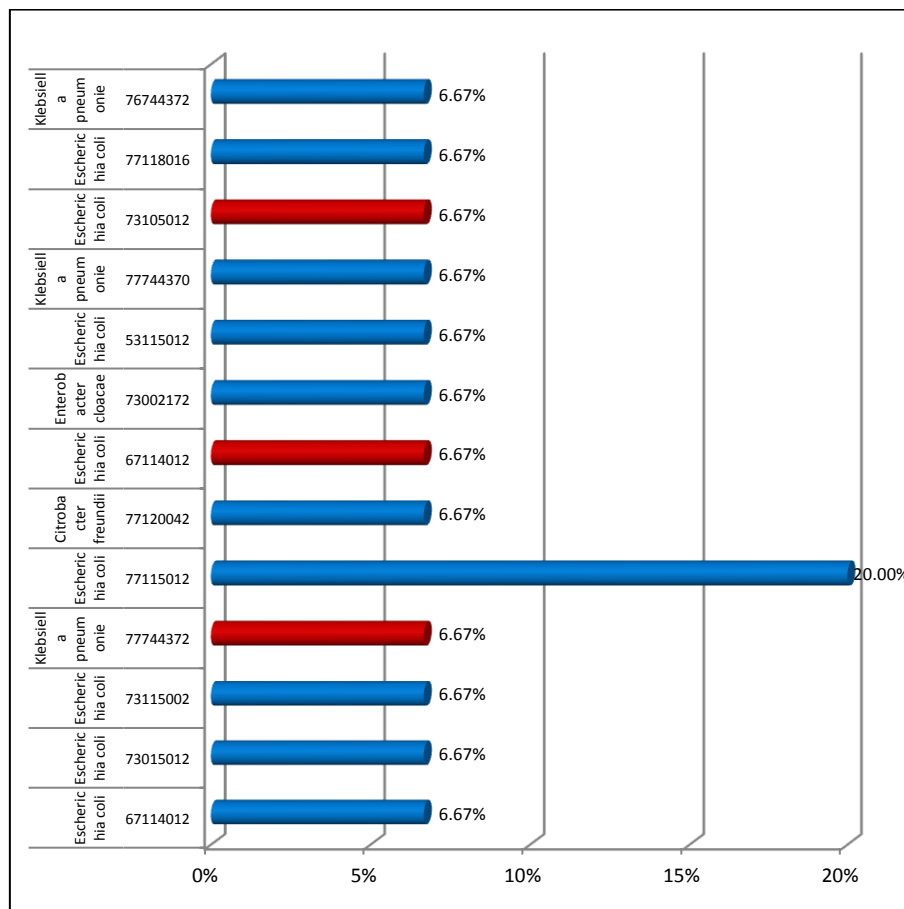


Grafico 9: Evidencia de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm según bacteria y biotipo en relación a Carbapenems (Ertapenem , Imipenem y Meropenem)

Interpretación:

Se evidencio que el 20.0 % de los de las Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm presentaron resistencia a los Carbapenems (Ertapenem , Imipenem y Meroponem) que son 3 casos pertenecen a la bacteria Escherichia coli y 80.0% presentaron sensibilidad que son 13 casos está representado por las bacterias Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Citrobacter freundii, Enterobacter cloacae con un total de 12 casos.

Tabla 10

Evidencia de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm en relación a cefalosporinas de tercera y cuarta generación (ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y cefepime)

Resultados/ Antibiograma	N°	%
Resistente	13	86.6%
Sensible	2	13.4%
TOTAL	15	100%

Fuente: Elaboración propia

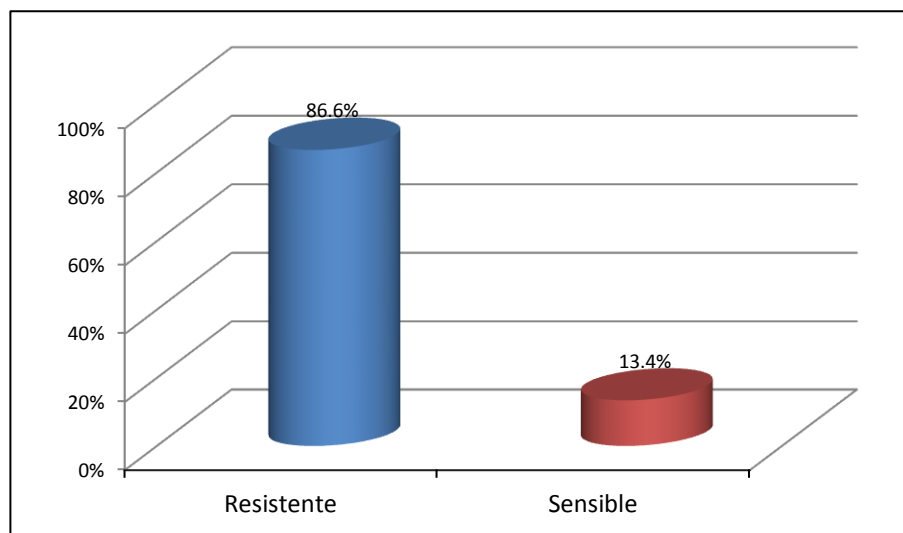


Gráfico 10: Evidencia de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm en relación a cefalosporinas de tercera y cuarta generación (ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y cefepime)

Interpretación:

Se evidencio que el 86.6% de los de las Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm presentaron resistencia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (ceftazidima,cefotaxima, ceftriaxona y cefepime) que son 13 casos y 13.4% presentaron sensibilidad con 2 casos.

Tabla 11

Evidencia de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm según bacteria y biotipo en relación a cefalosporinas de tercera y cuarta generación (ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y cefepime)

BACTERIA	BIOTIPO	ANTIBIOGRAMA	N°	INCIDENCIA
Escherichia coli	67114012	Resistente	1	6.67%
Escherichia coli	73015012	Sensible	1	6.67%
Escherichia coli	73115002	Resistente	1	6.67%
Klebsiella pneumoniae	77744372	Resistente	1	6.67%
Escherichia coli	77115012	Resistente	3	20.0%
Citrobacter freundii	77120042	Resistente	1	6.67%
Escherichia coli	67114012	Resistente	1	6.67%
Enterobacter cloacae	73002172	Resistente	1	6.67%
Escherichia coli	53115012	Resistente	1	6.67%
Klebsiella pneumoniae	77744370	Resistente	1	6.67%
Escherichia coli	73105012	Resistente	1	6.67%
Escherichia coli	77118016	Resistente	1	6.67%
Klebsiella pneumoniae	76744372	Sensible	1	6.67%
TOTAL			15	100%

Fuente: Elaboración propia

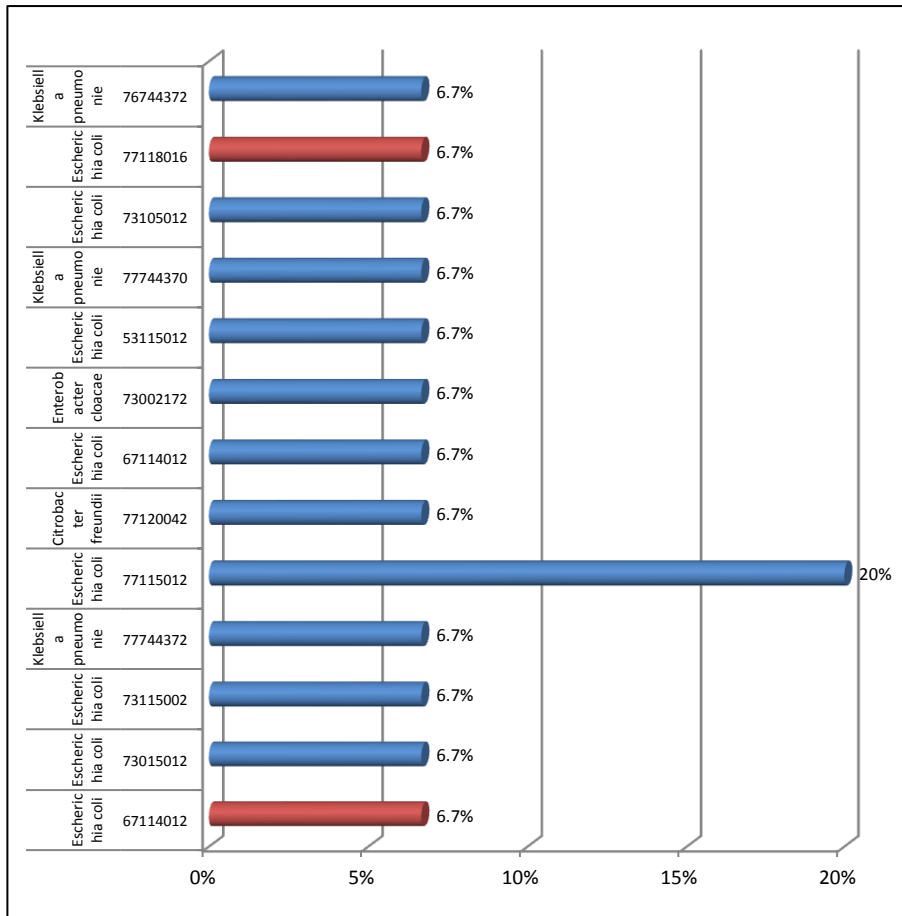


Grafico 11: Evidencia de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm según bacteria y biotipo en relación a cefalosporinas de tercera y cuarta generación (ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y cefepime)

Interpretación:

Se evidencio que el 86.6 % de los de las Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm presentaron resistencia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (ceftazidima,cefotaxima, ceftriaxona y cefepime) que son 13 casos pertenecen a las bacterias Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Citrobacter freundii, Enterobacter cloacae y 13.4 % presentaron sensibilidad que son 2 casos está representado por la bacteria Escherichia coli, con un total de 2 casos.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

En la presente tesis se investigó la presencia de Enterobacterias BLEE positivos que forman biofilm en Urocultivos en el área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017, se analizó un total de 229 Urocultivos de los cuales se fue seleccionado las bacterias BLEE positiva, mediante la lectura de los paneles de identificación microbiana y antibiograma.

De acuerdo con los resultados encontrados en esta investigación se puede decir que si existen Enterobacterias BLEE positivos que producen biofilm, lo que muestra que una de las ventajas más importantes de las Enterobacterias BLEE positivos que producen biofilm es la protección ante agentes antimicrobianos como los antibióticos se evidencia en este estudio en relación a los Carbapenems y Cefalosporinas, por otro lado se observó que estas bacterias se presentan más en pacientes procedentes de Consultorios Externos y en mayor número en mujeres.

Esta protección ocurre a través de varios mecanismos: la producción masiva de exopolisacáridos y a una disminución en la velocidad de crecimiento bacteriano dentro del biofilm lo que hace más lento su metabolismo y de esta manera se ven menos afectados por los antimicrobianos. Las células pueden tornarse resistentes debido a mutaciones afectando el objetivo del medicamento, o la producción de enzimas modificadoras. Además se debe tomar en cuenta la heterogeneidad de las comunidades celulares que componen el biofilm indicando que un antibiótico no necesariamente afectará a todas las colonias.

El instrumento básico fue el uso de una técnica de coloración para la detección selectiva de biofilm se basó en el empleo de agentes de tinción capaces de teñir la matriz extracelular que forma parte de la estructura del biofilm esta técnica se tomó como referencia de un estudio ya realizado que lleva por título “Prevalencia de cepas de Staphylococcus productoras de biopelícula y con receptores FC aislados de muestras clínicas y de individuos sanos”, en relación al control de calidad de esta técnica se analizó como cepa patrón a la *Pseudomonas aeruginosa* ya que esta bacteria produce el biofilm de forma natural.

Las limitaciones que tuvo esta investigación fue que en el reaislamiento de las cepas bacterianas en estudio algunas no mostraron un crecimiento óptimo para el estudio es por eso que se realizó cultivos adicionales.

CONCLUSIONES

La presente tesis tuvo como objetivo detectar la presencia de Enterobacterias BLEE positivos que producen biofilm en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017. Para demostrar esto, primero se analizó la información de 229 Urocultivos, con el objetivo de seleccionar las bacterias BLEE positiva, mediante la lectura de los paneles de identificación microbiana y antibiograma luego posteriormente se aplicó la evaluación de la capacidad para formar biofilm (técnica de tinción capas de teñir la matriz extracelular) finalmente se obtuvieron los siguientes resultados:

- Del total de Urocultivos analizados se presentó 86 casos de Enterobacterias BLEE positivos que representan el total de casos que fueron analizados para evidenciar la formación de biofilm mediante la técnica de coloración resultando 15 casos en el que se evidenciaron la formación de biofilm, que representan el 17.4% del total de casos.
- Del total de casos de Enterobacterias BLEE positivos que produjeron biofilm el 60% corresponde a consultorios externos y el 40% corresponde a hospitalizaciones.
- Del total de casos de Enterobacterias BLEE positivo que produjeron biofilm, la bacteria que se presenta con mayor incidencia es la Escherichia coli con biotipo 77115012 con tres casos representando el 20% de 15 casos analizados.
- En relación al género se obtuvo que de 15 casos de Enterobacterias BLEE positivo que produjeron biofilm, el 40% representa al sexo masculino, mientras que el 60% representa al sexo femenino.

- Se evidencio que el 20.0 % de los de las Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm presentaron resistencia a los Carbapenems (Ertapenem, Imipenem y Meroponem) que son 3 casos y 80.0% presentaron sensibilidad que son 12 casos.
- Se evidencio que el 20.0 % de los de las Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm presentaron resistencia a los Carbapenems (Ertapenem , Imipenem y Meroponem) que son 3 casos pertenecen a la bacteria Escherichia coli y 80.0% presentaron sensibilidad que son 13 casos está representado por las bacterias Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Citrobacter freundii, Enterobacter cloacae con un total de 12 casos.
- Se evidencio que el 86.6% de los de las Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm presentaron resistencia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (ceftazidima,cefotaxima, ceftriaxona y cefepime) que son 13 casos y 13.4% presentaron sensibilidad con 2 casos.
- Se evidencio que el 86.6 % de los de las Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm presentaron resistencia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generacion (ceftazidima,cefotaxima, ceftriaxona y cefepime) que son 13 casos pertenecen a las bacterias Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Citrobacter freundii, Enterobacter cloacae y 13.4 % presentaron sensibilidad que son 2 casos está representado por la bacteria Escherichia coli, con un total de 2 casos. Éstos resultados reflejan que una de las causas de la resistencia antimicrobiana es originada por el biofilm.

RECOMENDACIONES

Una vez concluida la tesis, siempre se desea que haya una mejora continua del mismo; por lo tanto se recomienda a futuros estudiantes que tengan interés en la tesis, sobre la presencia de Enterobacterias BLEE positivos que producen biofilm y nuevos temas relacionados a este, y aún más recomendable sería la implementación de la técnica de coloración para la detección selectiva de biofilm en el área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco.

BIBLIOGRAFIA

1. D. MR, A. OG. The developmental model of microbial biofilms. 2009;(73 - 87).
2. R. SA, G. LJ, D. H. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. 2006;(1121 - 1126).
3. M. F. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes bacterium-substratum separation distance. *J Bacteriol.* 1988;(2027 - 2030).
4. A. L, E. JN. *Colloidal Aspects of Bacterial Adhesion.* Academic Press. 1979.
5. J. BH, M. CM, C. VMH. On the relative importance of specific and non-specific approaches to oral microbial adhesion. *FEMS Microbiol.* 1992; Rev 8(199 - 209).
6. W. VEJ. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids.* Elsevier. 1948.
7. J. K, P. L. Forces between two adsorbed polyethylene oxide layers immersed in a good aqueous solvent. *Nature* 300. 1982;(429 - 431).
8. J. K. Forces between mica surfaces bearing layers of adsorbed polystyrene in cyclohexane. *Nature* 288. 1980;(248 - 250).
9. P. S, K. S, G. DD, W. CJ. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56. 2002;(187 - 209).
10. D. KK, I. O, F. O, B. J, K. J. Electron microscopic study of co expression of adhesive protein capsules and polysaccharide capsules in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 58. 1990;(2710 -2714).
11. H. HA, J. D, E. HC, J. F. Cell surface characteristics of coagulase - negative *Staphylococci* and their adherence to fluorinated poly(ethylenepropylene). *Infect Immun.* ; 51(294 - 301).
12. J. W, R. NT, C. FH. *Microbial extracellular polymeric substances; characterization, structure, and function.* Springer. 1999.
13. J. UD, C. WD. Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*. *Environ Microbiol.* 1983;(64 - 70).
14. J.P. D. The demonstration of bacterial capsules and slime. *J Pathol Bacteriol.* 1951;(673 - 685).

15. A. B, D. DJ, M. CA. High osmolarity is a signal for enhanced algD transcription in mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Bacteriol* 171. 1989;(2312 - 2317).
16. B. MT, D. S, R. M, J. K, L. C, D. DJ, et al. Alginate synthesis by *pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol*. 1991; Rev 4(191 - 206).
17. C. BC. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria. *Trans N y Acad Sci*. 1965; 27(1003 - 1054).
18. N. PG, F. FP, C. C, N. MB, A. FV. Streptococcal M protein: alpha-helical coiled-coil structure and arrangement on the cell surface. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;(4689 - 4693).
19. J. BT. Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. *Int. Rev. Cytol*. 1981;(229 - 317).
20. G. DD, R. PM, P. PJ, H. IB, W. CJ, P. GE. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998;(295 - 298).
21. G. O, B. KH, R. K. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev. Microbiol*. 2000;(49 - 79).
22. K. S, K. CA, D. EG, W. CJ, G. DD. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184. 2002;(1140 - 1154).
23. Orihuel Iranzo EJ. Nuevas herramientas para la detección y la eliminación de biofilms. 2012.
24. Chaves E, Rojas JA, Rivera P, Hernandez F. Prevalencia de cepas de *Staphylococcus productoras* de biopelícula y con receptores FC aislados de muestras clínicas y de individuos sanos. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*. 2000; 21.
25. Oliver A, Canton R. ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE β -LACTAMASAS PLASMIDICAS DE ESPECTRO EXTENDIDO. *Control Calidad EIMC*. .
26. Canahuire Montufar AE, Endara Mamani F, Morante Rios EA. ¿Cómo hacer la Tesis Universitaria? 2015 agosto; primera edición.
27. I. Lassa JdPRPL. BIOFILM BACTERIANOS. *redalyc*. 2005;; p. 163 - 175.
28. I.Lasa JdPRPL. biofilm bacterianos. *redalyc*. 2005;; p. 163-175.

29. I.Lassa JdPRPL. BIOFILM BACTERIANOS. redalyc. 2005;; p. 163 - 175.
30. J. K, P. L. Forces between two adsorbed polyethylene oxide layers immersed in a good aqueous solvent. Nature 300. 1982;(248 - 250).
31. J. K. Forces between mica surfaces bearing layers of adsorbed polystyrene in cyclohexane. Nature 288. 1980;(248 - 250).
32. Avila Baray HL. Introduccion a la Investigacion de la Investigacion. 2006.

ANEXO 1

- **PANEL DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA Y ANTIBIOGRAMA (EQUIPO AUTOMATIZADO MICROSCAN).**

HOSPITAL NACIONAL ADOLFO GUEVARA VELAZCO
SERVICIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA
INFORME DE RESULTADOS

ID del paciente : 7311110TLEAM006	Muestra : 230320170501	Cama :
Origen : ORINA	Área : EMERGENCIA	F. Muestra : 23/03/2017
Sexo : Femenino	Servicio : MEDICINA GENERAL	F. Recepción : 23/03/2017
		F. Estado Final : 27/03/2017

Comentarios de la muestra:
UROCULTIVO Y ANTIBIOGRAMA
Celulas Epitel: Escasas
Germenes +++

UFC: >100.000 COL/ML
Leuc.: > 100 x campo

Aislamiento	Microorganismo
1	Escherichia coli

VALIDADO

Antimicrobiano	CIM	Interp.
Amicacina	<=16	S
Amp/Sulbactam	16/8	I
Ampicilina	>16	R*
Aztreonam	>16	R
Cefepima	>16	R*
Cefotaxima	>32	ESBL
Cefoxitina	<=8	S
Ceftazidima	>16	ESBL
Ceftriaxona	>32	ESBL
Cefuroxima	>16	R*
Ciprofloxacina	>2	R
Ertapenem	<=1	S
Gentamicina	>8	R
Imipenem	<=1	S
Levofloxacina	>4	R
Meropenem	<=1	S
Nitrofurantoina	64	I
Pip/Tazo	<=16	S
Tigeciclina	<=2	S
Tobramicina	>8	R
Trimet/Sulfa	>2/38	R

ESBL = Betalactamasa de espectro extendido
 BLAC = Betalactamasa
 CIM = mcg/ml (mg/L)


S = Sensible N/R = No informado
 I = Intermedio — = No probado
 R = Resistente TFG = Cepa timidino resistente

Blanco = Dato no disponible, o antimicrobiano no
 POS = Positivo
 NEG = Negativo

Interpretación predictiva sensible
 S* = Interpretación predictiva resistente
 R* = Posible ESBL. Se precisan pruebas para confirmar ESBL frente a otras beta-lactamasas.
 EBL? = Beta-lactamasa inducible. Aparece en lugar de Sensible en especies portadoras de beta-lactamasas inducibles, pueden ser potencialmente resistentes a todos los antibióticos beta-lactámicos. Se recomienda monitorizar los pacientes durante/después de la terapia. Utilizar otro/combinado con antibióticos beta-lactámicos.
 IB = Interpretación informada modificada.

* Interpretación informada modificada.
 En especies de I/R y cuando se recomienda una prueba de betalactamasa para las especies de enterococo.

[Firma]
Becerra Martínez, Camilo
Tecnólogo Médico C.T.M.P 5193 RNE 0148
Hemoterapia y Banco de Sangre




[Firma]
Soledad N. Santiváñez V.
BIOLOGA
CBP. N° 1448
RNEB N° 0177

ANEXO 2

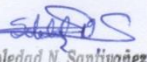

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PARA FORMAR BIOFILM (TECNICA DE TINCION CAPAS DE TEÑIR LA MATRIZ EXTRACELULAR)

En este caso se tomara como modelo una técnica de tinción tomada de un estudio relacionado al proyecto de investigación a realizar a continuación se detalla el procedimiento de la técnica.

- Cada cepa se inoculó en un tubo con 5 ml de caldo tripticasa soya e incubó por 24 horas a 37 °C. Luego se vació el contenido del tubo y se le agregaron 4 ml de safranina al 2% y se dejó en reposo durante 5 minutos, nuevamente se vació el tubo. El biofilm se adhiere a las paredes del tubo y se tiñe con la safranina, por lo cual se detecta debido a esa coloración, lo que se confirma microscópicamente como la presencia de materiales adheridos a las paredes del tubo. (24)



Camilo Martínez, Camilo
Médico C.T.M.P 5193 RNE 0048
Hemoterapia y Banco de Sangre



Soledad N. Santivanes V.
BIOLOGA
CBP N° 1448
RNEB N° 0177

ANEXO 3

FORMATO DE VALIDACION DE LOS INSTRUMENTOS N°1

INSTRUCCIONES: Seguidamente se presenta un formato, en el cual se reflejan dos aspectos fundamentales para la validación del contenido: la Redacción y la Pertinencia. Usted deberá emitir un juicio con relación a la Congruencia, Pertinencia y la Redacción del instrumento, marcar con una (X) en la casilla o recuadro que mejor represente su criterio.

N°	INSTRUMENTOS	PERTINENCIA		COHERENCIA		REDACCION	
		SI	NO	SI	NO	SI	NO
1	PANEL DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA Y ANTIBIOGRAMA (EQUIPO AUTOMATIZADO MICROSCAN).	X		X		X	
2	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PARA FORMAR BIOFILM (TECNICA DE TINCION CAPAS DE TENIR LA MATRIZ EXTRACELULAR)	X		X		X	


EXPERTO: Camilo Becerra martinez

DNI: 09861634

PROFESION: Tecnólogo Médico

FECHA: 01 Abril 2016

FIRMA Y SELLO:


.....
Becerra Martinez, Camilo
Tecnólogo Médico C.T.M.P 5193 RNE 0048
Hemoterapia y Banco de Sangre

ANEXO 4

FORMATO DE VALIDACION DE LOS INSTRUMENTOS N°2

FORMATO DE VALIDACIÓN DE LOS INSTRUMENTOS

INSTRUCCIONES: Seguidamente se presenta un formato, en el cual se reflejan dos aspectos fundamentales para la validación del contenido: la Redacción y la Pertinencia. Usted deberá emitir un juicio con relación a la Congruencia, Pertinencia y la Redacción del instrumento, marcar con una (X) en la casilla o recuadro que mejor represente su criterio.

N°	INSTRUMENTOS	PERTINENCIA		COHERENCIA		REDACCION	
		SI	NO	SI	NO	SI	NO
1	PANEL DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA Y ANTIBIOGRAMA (EQUIPO AUTOMATIZADO MICROSCAN).	X		X		X	
2	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PARA FORMAR BIOFILM (TECNICA DE TINCION CAPAS DE TENIR LA MATRIZ EXTRACELULAR)	X		X		X	

EXPERTO:..... *Soledad Nieves Santivanez Veneno.*

DNI:..... *23837267*

PROFESION:..... *Biologa.*

FECHA:..... *21/01/04/17.*

FIRMA Y SELLO:



Soledad N. Santivanez V.
 Soledad N. Santivanez V.
 BIOLOGA
 CBP. N° 1448
 RNEB N° 0177

ANEXO 5

MATRIZ DE CONSISTENCIA DE LA INVESTIGACIÓN

TÍTULO:				
"DETECCION DE ENTEROBACTERIAS BLEE POSITIVAS PRODUCTORAS DE BIOFILM EN UROCULTIVOS EN EL AREA DE MICROBIOLOGIA DEL HOSPITAL NACIONAL "ADOLFO GUEVARA VELASCO" CUSCO ABRIL - 2017"				
PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLES / DIMENSIONES	METODOLOGIA
PROBLEMA GENERAL: ¿En qué medida se detectan Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional "Adolfo Guevara Velasco" Cusco Abril - 2017?	OBJETIVO GENERAL: Identificar la presencia de Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional "Adolfo Guevara Velasco" Cusco Abril - 2017.	HIPÓTESIS GENERAL: Si existe la presencia de Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en Urocultivos con un alto número de casos el cual representa un porcentaje significativo del total de casos analizados en el Área de Microbiología del Hospital Nacional "Adolfo Guevara Velasco" Cusco Abril - 2017.	VARIABLE 1 <ul style="list-style-type: none"> • Enterobacterias BLEE(Betalactamas de espectro extendido) positivas 	TIPO DE INVESTIGACIÓN "INVESTIGACION CUANTITATIVA" DISEÑO DE INVESTIGACIÓN "NO EXPERIMENTAL" POBLACIÓN: Finita. (229 Cepas de Enterobacterias) MUESTRA: <ul style="list-style-type: none"> • Selección: No Probabilístico

PROBLEMAS ESPECIFICOS:	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS:	VARIABLE 2	
<p>¿Cuál es el porcentaje de Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en Urocultivos provenientes de Consultorios Externos y Hospitalización en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril 2017?</p> <p>¿Qué Enterobacteria BLEE positiva que produce biofilm representa la mayor incidencia en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017?</p> <p>¿Cuál es el porcentaje según genero de Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017?</p>	<p>Analizar el porcentaje de Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm según Consultorios Externos y Hospitalización en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril 2017.</p> <p>Identificar qué Enterobacteria BLEE positiva que produce biofilm representa la mayor incidencia en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017.</p> <p>Analizar el porcentaje de Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm según género en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017.</p>	<p>El porcentaje de Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm es mayor en Consultorios Externos frente a los casos de Hospitalización en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril 2017.</p> <p>La bacteria Escherichia coli con biotipo 77115012 representa la mayor incidencia porcentual de las Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017.</p> <p>El porcentaje Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm según género tiene mayor casos en mujeres y en menor número de casos en los varones en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril 2017.</p>	<p>• Biofilm bacteriano</p> <p><u>DIMENSIONES</u></p> <p>BIOFILM EN EL ORGANISMO HUMANO:</p> <p>-INFECCIONES NOSOCOMIALES</p> <p>RESISTENCIA BACTERIANA ASOCIADA AL BIOFILM:</p> <p>- RESISTENCIA ANTE AGENTES ANTIMICROBIANOS(ANTIBIOTICOS)</p>	<p>• Tamaño: 86 cepas EnterobacteriasBLEE positivas.</p> <p>TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOJO DE DATOS</p> <p>-Selección de Enterobacterias (Panel de Identificación bacteriana y Antibiograma)</p> <p>-Técnica de tinción capas de teñir la matriz extracelular del biofilm(Caldo tripticasa de soya y Colorante Safranina)</p> <p>TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE DATOS</p> <p>• Tablas y Gráficos</p>

<p>¿Cuál es el comportamiento de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de las Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en relación a los Carbapenems (Ertapenem, Imipenem, Meropenem), cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Ceftriaxona, Cefotaxima, Ceftazidima y Cefepime) en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017</p>	<p>Identificar el comportamiento de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de las Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm en relación a los Carbapenems (Ertapenem, Imipenem, Meropenem), cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Ceftriaxona, Cefotaxima, Ceftazidima y Cefepime) en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017.</p>	<p>Las Enterobacterias BLEE positivas que producen biofilm muestran que un 85.0 % de casos producen sensibilidad y 15.0 % de resistencia a los Carbapenems (Ertapenem, Imipenem, Meropenem), por otro lado el casi 90 % producen resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Ceftriaxona, Cefotaxima, Ceftazidima y Cefepime) en Urocultivos en el Área de Microbiología del Hospital Nacional “Adolfo Guevara Velasco” Cusco Abril – 2017.</p>	<p>DETECCION DE BIOFILM: - TECNICA DE TINCION CAPACES DE TEÑIR EL BIOFILM (MATRIZ EXTRACELULAR)</p>	<p>estadísticos.</p> <ul style="list-style-type: none"> Recopilación y Sistematización de datos.
---	---	--	--	---

ANEXO 6

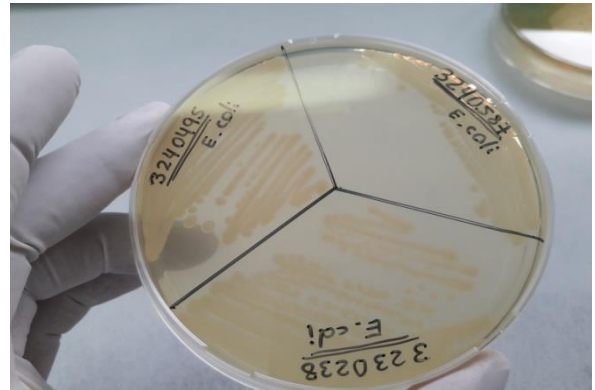
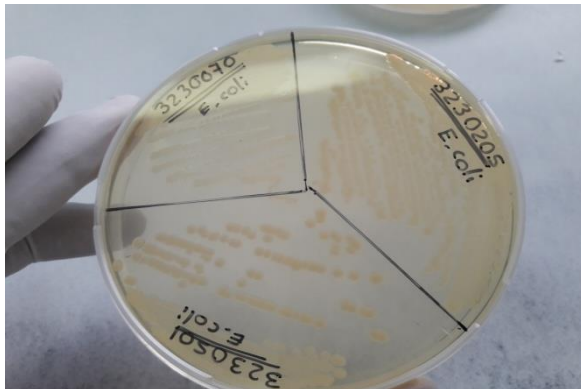
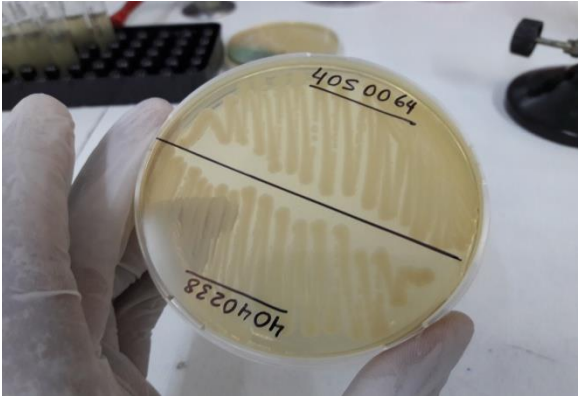
OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensiones	Unidad de Medida
BIOFILM BACTERIANO	Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de ex polisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo.	Biofilm en el organismo humano	-infecciones urinarias por enterobacterias multirresistentes	- <i>urocultivos positivos (aislamiento de enterobacterias blee positivos)</i>
		Resistencia bacteriana asociada al biofilm	-proteccion ante agentes antimicrobianos	- Suceptibilidad y resistencia antimicrobiana (sensible o resistente)
		Detección de biofilm	-técnica de tincion capaces de teñir la matriz extracelular	- <i>biofilm positivo o negativo</i>

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensiones	Unidad de Medida
ENTEROBACTERIAS BLEE POSITIVAS	Las bacterias BLEE positivas son capaces de producir enzimas las cuales previenen el efecto, esto significa que deben utilizarse antibióticos más fuertes para lograr un buen efecto terapéutico; las infecciones ocasionadas por este tipo de bacterias generalmente ocurren en el tracto urinario, pulmones, piel, sangre y en lesiones corporales periféricas	Detección y caracterización de enterobacterias BLEE positivas	Antibiograma	Resistencia o sensibilidad a: Carbapenems, Cefalosporinas de 3° y 4° generación.

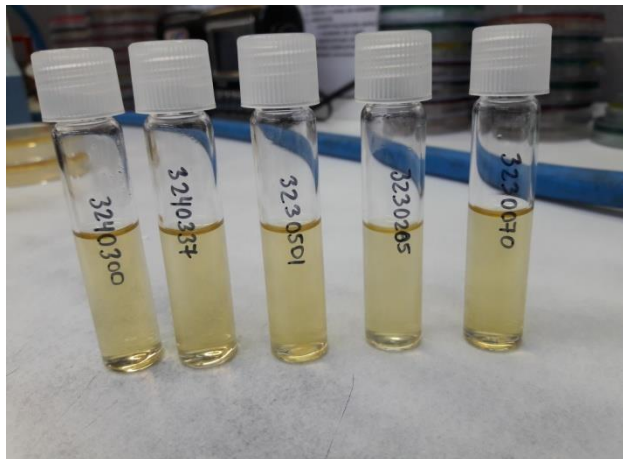
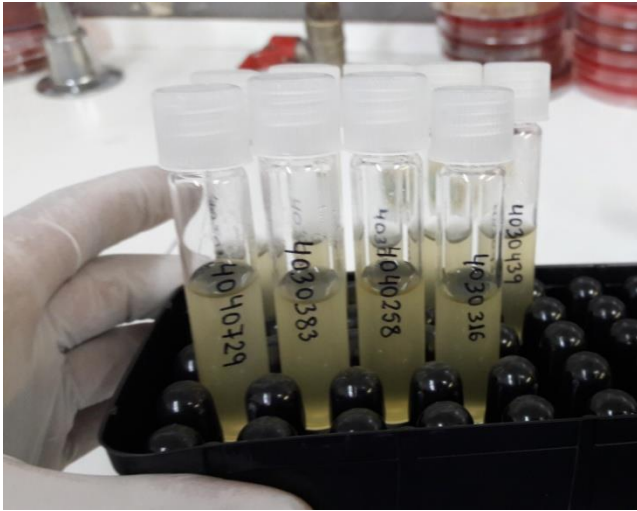
ANEXO 7

REASLAMIENTO DE ENTEROBACTERIAS BLEE POSITIVAS



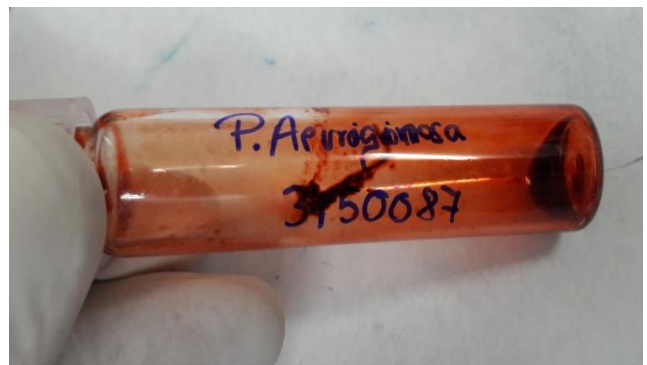
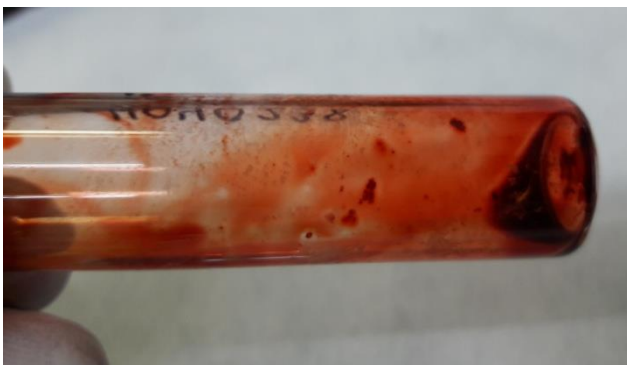
ANEXO 8

INOCULACION DE CEPAS EN CALDO TRIPTICASA DE SOYA

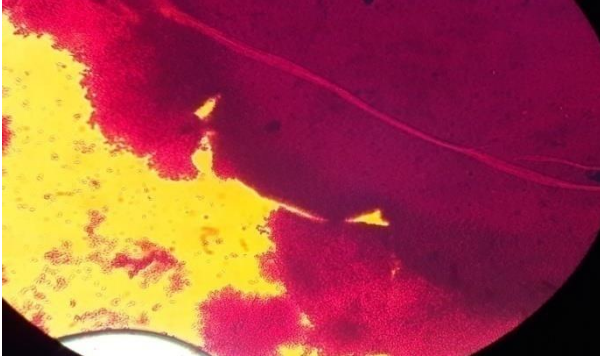


ANEXO 9

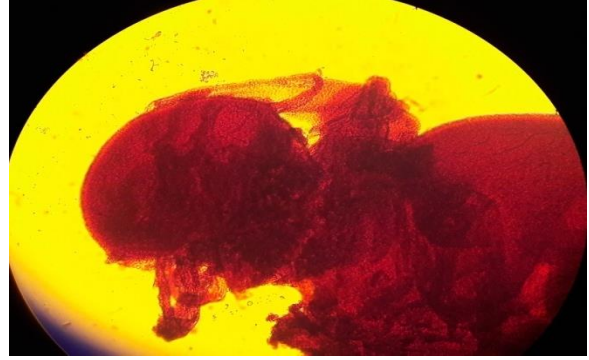
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PARA FORMAR BIOFILM (TECNICA DE TINCION CAPAS DE TEÑIR LA MATRIZ EXTRACELULAR)



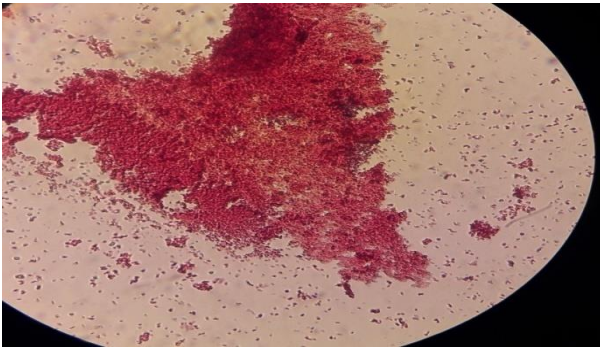
ANEXO 10
IMAGEN MICROSCOPICA DE BIOFILM



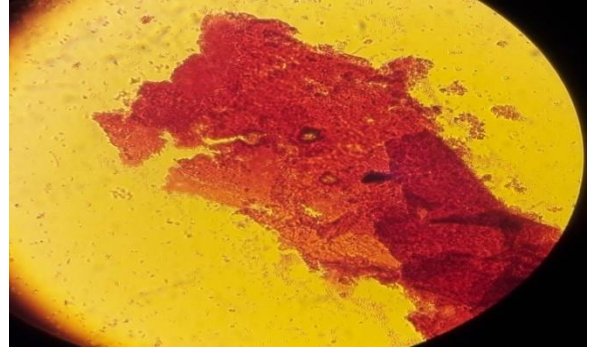
Pseudomonas aeruginosa/02021322



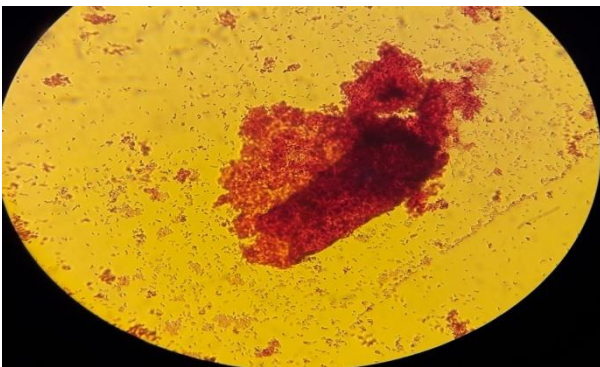
Pseudomonas aeruginosa/02061322



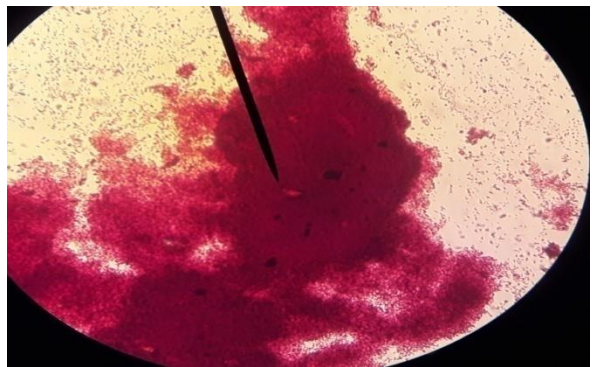
Escherichia coli / 67114012



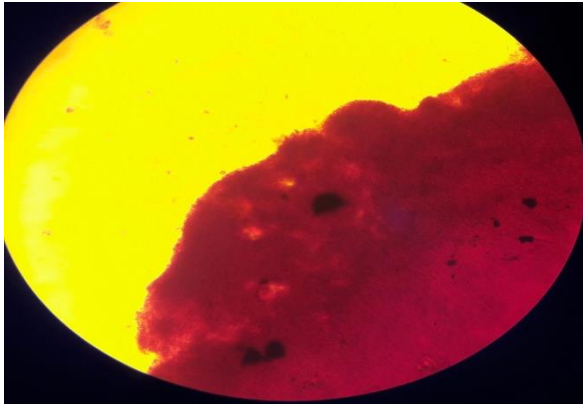
Escherichia coli / 73015012



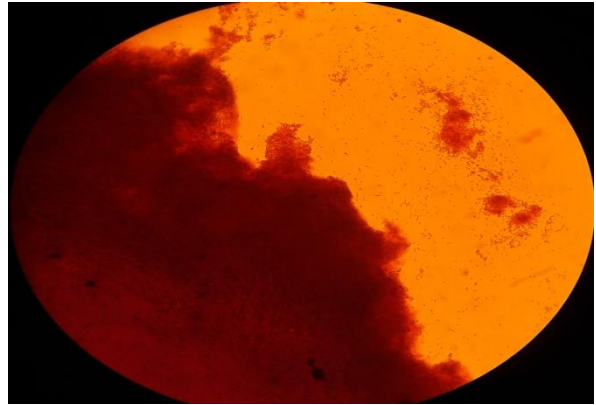
Escherichia coli / 73115002



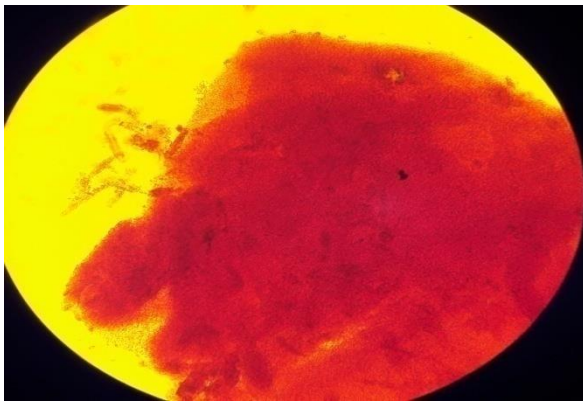
Klebsiella pneumoniae / 77744372



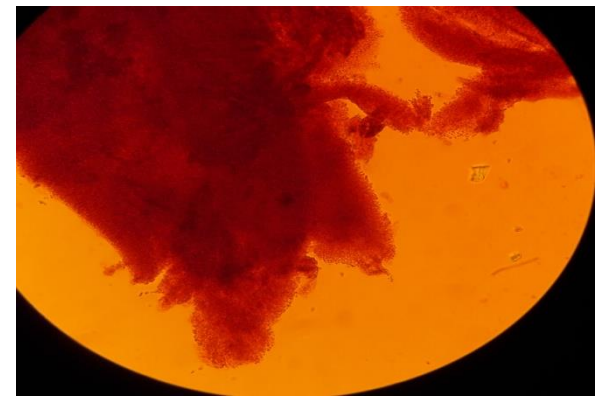
Escherichia coli / 77115012



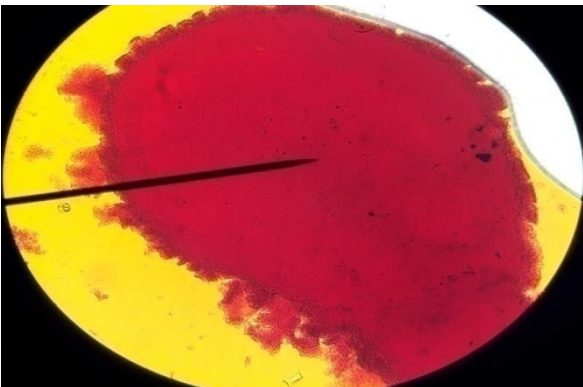
Citrobacter freundii / 77120042



Escherichia coli / 67114012



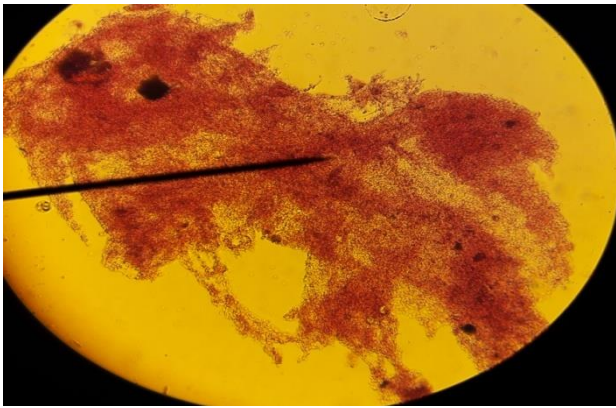
Enterobacter cloacae / 73002172



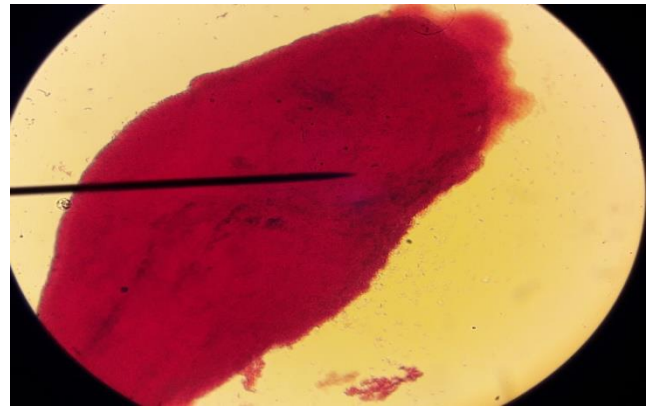
Escherichia coli / 53115012



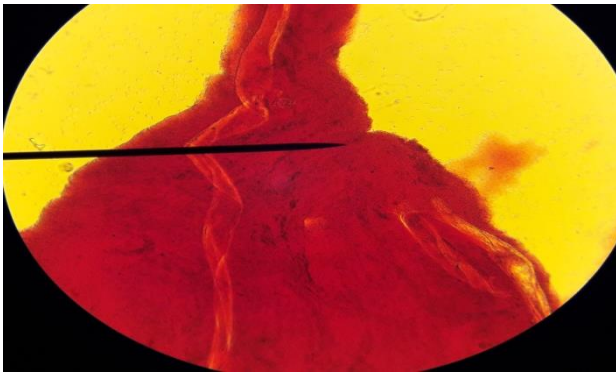
Escherichia coli / 77115012



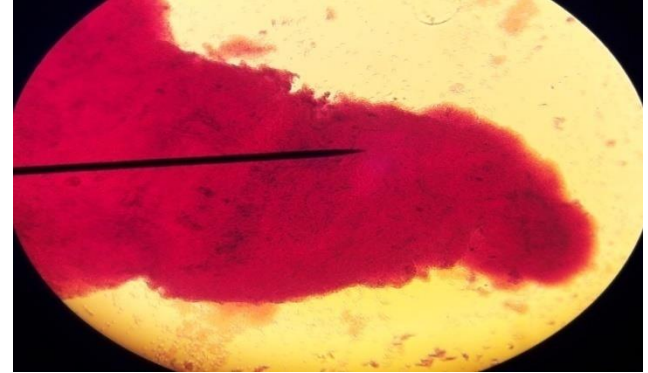
Klebsiella pneumoniae / 77744370



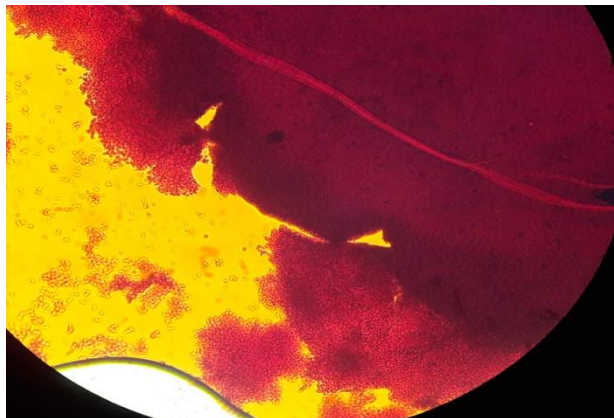
Escherichia coli / 73105012



Escherichia coli / 77118016



Escherichia coli / 77115012



Klebsiella pneumoniae / 76744372

ANEXO 11

FUNDAMENTO DE LOS PANELES DEL EQUIPO MICROSCAN

Antibióticos de lectura oportuna
Los principales antibióticos empíricos y ampliamente usados estarán en apenas 4.5 horas

Extiende automáticamente la incubación a 16/18 horas cuando es necesario

Identificación rápida
Identificación rápida, precisa y procesable en 2 a 2.5 horas

No se requieren reactivos

Determinación de resistencia y susceptibilidad de hasta 32 antibióticos

Identificación bioquímica mediante sustratos clásicos