



FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA

COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA DETECCIÓN DE BIOFILM EN
ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS, HOSPITAL
NACIONAL HIPÓLITO UNANUE

Línea de investigación:

Microbiología, parasitología e inmunología

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica
en la especialidad en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

Autor:

Janampa Bautista, Cristian Marcos

Asesor:

Guerrero Barrantes, César Enrique
(ORCID: 0000-0001-9427-9281)

Jurado:

Yovera Ancajima, Cleofe Del Pilar
Suárez Obregón, Evert Segundo
Rivas Cárdenas, Arturo Alexander

Lima - Perú

2022



Referencia:

Janampa, C. (2022). *Comparación de métodos para detección de Biofilm en Enterobacterias productoras de carbapenemasas, Hospital Nacional Hipólito Unanue*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <https://hdl.handle.net/20.500.13084/6303>



Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



Universidad Nacional
Federico Villarreal

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA

COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA DETECCIÓN DE BIOFILM EN
ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS, HOSPITAL
NACIONAL HIPÓLITO UNANUE

Línea de Investigación:

Microbiología, parasitología e inmunología

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en la especialidad
en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

Autor:

Janampa Bautista, Cristian Marcos

Asesor:

Guerrero Barrantes, César Enrique

(ORCID: 0000-0001-9427-9281)

Jurado:

Yovera Ancajima, Cleofe Del Pilar

Suárez Obregón, Evert Segundo

Rivas Cárdenas, Arturo Alexander

Lima–Perú

2022

“Comparación de métodos para detección de biofilm en enterobacterias productoras de carbapenemasas, Hospital Nacional Hipólito Unanue”

Autor: Janampa Bautista, Cristian Marcos

Dedicatoria

A mis padres, los cuales me ayudaron a ser la persona que ahora soy, me criaron y enseñaron con valores, estaré eternamente agradecidos con ellos; mis hermanos, que me dan su apoyo siempre que lo necesito. A mi pareja y a mi pequeña hija Alessia, las cuales son por las que me esfuerzo para mejorar cada día.

Agradecimiento

Agradecer a Dios en primer lugar, por darme salud y vida para cumplir mis metas y objetivos.

A mi madre, padre, toda mi familia y seres queridos, por creer en mí, por darme su apoyo y comprensión.

Al Dr. Alfredo Guillen, que en paz descanse, quien me enseñó lo increíble que es la microbiología, y del cual nos da un gran ejemplo a seguir como persona y profesional.

Al Mg Roky Champi y a todo el personal de Microbiología del HNHU, que me apoyaron y ayudaron en la realización de este trabajo.

A mis amigos, por apoyarme en todo momento.

ÍNDICE

RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Descripción y formulación del problema.....	9
1.2. Antecedentes.....	11
1.3. Objetivos.....	13
1.3.1. Objetivo General.....	13
1.3.2. Objetivos Específicos	13
1.4. Justificación.....	13
1.5. Hipótesis.....	14
II. MARCO TEÓRICO	15
2.1. Bases Teóricas sobre el tema de investigación.....	15
III. MÉTODO	28
3.1. Tipo de investigación.....	28
3.2. Ámbito temporal y espacial	28
3.3. Variable.....	28
3.4. Población y muestra... ..	31
3.5. Instrumentos.....	31
3.6. Procedimientos.....	31
3.7. Análisis de datos... ..	34
3.8. Consideraciones éticas.....	34
IV. RESULTADOS	35
V. DISCUSION DE RESULTADOS	43
VI. CONCLUSIONES	46

VII. RECOMENDACIONES.....	47
VIII. REFERENCIAS.....	48
IX. ANEXOS.....	54
Anexo A: Matriz de Consistencia.....	54
Anexo B: Ficha de datos	56
Anexo C: Interpretación de la producción de Biofilm por el método PCT	57
Anexo D: Escala de valoración del índice Kappa.....	58
Anexo E: Declaración Jurada.....	59
Anexo F: Validación de Juicio de Expertos del instrumento de investigación.....	60

RESUMEN

Objetivo: Determinar el método más eficiente para detectar el biofilm en enterobacterias productoras de carbapenemasas en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. **Método:** Por el nivel de investigación es descriptiva. Por el número de mediciones es transversal. Por el tiempo de ocurrencia es prospectivo. Se usó los datos recolectados por el programa Whonet del Servicio de Microbiología del Hospital Nacional Hipólito Unanue y se analizó con el software de Microsoft Excel. **Resultado:** Se analizó 70 aislamientos de Enterobacterias productoras de carbapenemasas. Los métodos por evaluar fueron el método en Tubo de Safranina y el método Agar Rojo Congo frente al método en Placa de Microtitulación. El primero alcanzó una sensibilidad de 97.3% y una especificidad de 45.5%. El segundo método alcanzó una sensibilidad de 2.7% y una especificidad de 99.9%. **Conclusión:** Se observó que el método en Tubo posee mayor sensibilidad y valor predictivo negativo que el método Agar Rojo Congo, el cual posee mayor especificidad y valor predictivo positivo. Al calcular el índice kappa para comparar la concordancia de los dos métodos con el patrón de oro, es decir el método en Placa de Microtitulación, se concluyó que el método en Tubo de safranina tiene una mayor concordancia con el método patrón de oro alcanzando una concordancia moderada.

Palabras claves: *Enterobacteriaceae*, biopelículas, *Enterobacteriaceae* Resistentes a los Carbapenémicos, Farmacorresistencia Microbiana

ABSTRACT

Objective: To determine the most efficient method to detect biofilm in carbapenemase-producing enterobacteria at the Hipólito Unanue National Hospital. **Method:** By the level of research it is descriptive. By the number of measurements it is transversal. By the time of occurrence is prospective. The data collected by the Whonet program of the Microbiology Service of the Hipólito Unanue National Hospital were used and analyzed with Microsoft Excel software. **Results:** Seventy isolates of carbapenemase-producing Enterobacteria were analyzed. The methods to be evaluated were the Safranin Tube method and the Congo Red Agar method compared to the Microtiter Plate method. The first achieved a sensitivity of 97.3% and a specificity of 45.5%. The second method achieved a sensitivity of 2.7% and a specificity of 100.0%. **Conclusion:** It was observed that the Tube method has greater sensitivity and negative predictive value than the Congo Red Agar method, which has greater specificity and positive predictive value. When calculating the kappa index to compare the concordance of the two methods with the gold standard, that is, the Microtiter Plate method, it was concluded that the safranin tube method has a greater agreement with the gold standard method reaching a moderate concordance.

Key words: *Enterobacteriaceae*, biofilms, Carbapenem-Resistant

Enterobacteriaceae, Drug Resistance Microbial

I. INTRODUCCIÓN

En el año 2019, la OMS estudio las diez principales causas de defunción. Siendo la segunda causa, las enfermedades respiratorias incluyendo aquí las infecciosas; y como cuarta causa las septicemias e infecciones neonatales. Todo ello nos supone a las infecciones bacterianas un peligro para la salud humana.

Según la OPS, estima que uno de cada veinte pacientes que entra a hospitalización contrae una infección. Estos patógenos generan altos costos de salud. Por ello los profesionales de salud deben poseer conocimiento sobre estas enfermedades. En la actualidad, las “superbacterias” son llamados así a los patógenos que presentan diversas resistencias a casi todos los grupos de antimicrobianos.

La resistencia antimicrobiana por bacterias se ha convertido en un gran problema para la salud pública en nuestro país. La prevalencia de ésta aumento debido a la aparición de los nuevos mecanismos de resistencia antimicrobiana de última línea, en especial de las bacterias del grupo *Enterobacteriaceae*, causantes de la mayoría de las infecciones hospitalarias.

La resistencia a carbapenémicos ha empezado a aparecer en nuestro país, sin embargo, este tema no ha sido muy abordado. Por ello es por lo que se necesita estudiar más desde datos epidemiológicos hasta métodos que ayuden y faciliten la detección de esta resistencia.

La producción de biofilm es un factor de virulencia, de las bacterias, que dificultaría el tratamiento de las infecciones. Debido a esto, ahí radica su importancia de poder detectar si presenta este factor. Este punto también es un tema no muy estudiado, lo que justifica realizar más estudios.

En el presente estudio, se realizó una comparación de tres métodos para detectar el biofilm en cepas del grupo *Enterobacteriaceae* que presenten mecanismo de resistencia

enzimático a carbapenémicos.

1.1. Descripción y formulación del problema

Las enfermedades infecciosas han sido un gran problema en la historia del hombre y sobre todo en la salud de éste. Este tipo de enfermedades se puede dar por diferentes tipos de agentes; ya sean virus, hongos, parásitos o bacterias; todos estos grupos poseen algo en común: factores de virulencia, que son las características que ayudan al crecimiento o sobrevivencia durante la infección. Sin embargo, al grupo de las bacterias se le suma un punto más a favor: la resistencia bacteriana. Esta resistencia los vuelve inmunes a los antimicrobianos. Desde 1929, la aparición de la penicilina, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos para evadir la acción de los antibióticos. Hoy en día, estas dos cuestiones son una gran preocupación para el personal de salud. Las infecciones causadas por agentes resistentes a los antibióticos son consideradas una infección emergente, ya que el tratamiento es más limitado y afecta a casi toda la población mundial (Rocha-C. et al., 2015).

Las enterobacterias son un gran grupo de bacterias pertenecientes al grupo *Enterobacteriaceae*. En pacientes hospitalizados e inmunosuprimidos, hay colonización de este grupo de bacterias. El porcentaje de estos aislados resistentes a diversos antibióticos ha crecido raudamente, de tal forma que casi todos los aislados hospitalarios y comunitarios son ahora resistentes a los diferentes grupos de antibióticos. Diversos factores han permitido el incremento de las infecciones de este grupo de bacterias, como: el uso de técnicas diagnósticas y terapéuticas agresivas, el uso de fuertes inmunosupresores, el tiempo prolongado que lleva dentro del nosocomio (Puerta y Mateos, 2010).

Un microorganismo patógeno es capaz de producir daño al organismo hospedero. La medida cuantitativa de este daño producido se llama virulencia y es medida por la cantidad necesaria para causar daño. El microorganismo debe superar las defensas del hospedero, para ello usa mecanismos, dependiendo de qué tan eficientes son estos mecanismos se considerará

poco o muy virulenta. Con el tiempo, las bacterias han evolucionado, obteniendo características que le ayuden a: invadir al hospedero, producir receptores para la adhesión, completar la colonización, evadir el sistema inmune, y por último causa daño para obtener nutrientes para su crecimiento y reproducción (Cárdenas-Perea et al., 2014).

La resistencia antimicrobiana es la cualidad que tienen las bacterias de superar el efecto inhibitorio o letal del antibiótico. Al usar los antibióticos en infecciones no bacterianas y el uso deficiente ayudan a la selección de los microorganismos, los más resistentes sobreviven y estos se multiplican. Los betalactámicos son un grupo de antibióticos más usados en la clínica. Este grupo de antibióticos inhibe la pared celular bacteriana. Se puede clasificar en: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos. Estos últimos son de amplio espectro, tienen mayor actividad y resistencia a betalactamasas. Los carbapenémicos son la última línea de defensa de los Gram negativos. Sin embargo, los últimos años se ha visto enterobacterias resistentes a betalactámicos (De Zaro Alcalá, s.f.).

Los biofilms están asociados a una gran cantidad de infecciones persistentes y crónicas que afectan a diferentes áreas de la salud. Agregando a esto se suma los altos costos que generan a los sistemas de salud y a los pacientes al año, ya que son difíciles de tratar con la antibioticoterapia convencional, esto genera altas tasas de mortalidad y morbilidad (Ortega y Hernández, 2018).

1.1.1. Formulación del problema

Pregunta general:

¿Cuál es el método más eficiente para detectar biofilm en enterobacterias productoras de carbapenemasas en el Hospital Nacional Hipólito Unanue?

Preguntas específicas:

¿Qué enterobacterias productoras de carbapenemasas forman biofilm por el método de placa de microtitulación en el Hospital Nacional Hipólito Unanue?

¿Cómo es la producción de biofilm del método en Tubo frente al método en Placa de Microtitulación en el Hospital Nacional Hipólito Unanue?

¿Cómo es la producción de biofilm del método en agar rojo Congo frente al método en Placa de Microtitulación en el Hospital Nacional Hipólito Unanue?

¿Qué concordancia tiene el método en Tubo y agar rojo Congo frente al método en Placa de Microtitulación para la formación de biofilm en enterobacterias productoras de carbapenemasas en el Hospital Nacional Hipólito Unanue?

1.2. Antecedentes

1.2.1. Nacionales

Hurtado & Casablanca (2018) tuvieron como objetivo determinar la relación entre la formación de biofilm y la producción de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* aislados de cultivos de orina en el Hospital Nacional Hipólito Unanue en el año 2018. Realizaron un estudio cuantitativo, observacional, retrospectivo, transversal; usando 190 aislamientos bacterianos de *E.coli* en urocultivos. Se hizo la determinación de betalactamasas de espectro extendido y también la determinación de biofilm mediante el método en placa de Microtitulación. Resultados: De los 190 aislamientos, el 48.9% (93) eran productores de betalactamasas de espectro extendido y el 51.1% (97) no lo eran. El 73.2% (139) eran formadores de biofilm, mientras que el 26.8% (51) no lo eran. Se demostró que existe asociación significativa entre estas variables.

1.2.2. Internacionales

Fernández (2019) en este trabajo la autora propone dos novedosos métodos para el tratamiento y prevención de: bacteriemia relacionada al catéter y la neumonía asociada a ventilación mecánica. Agregando consigo información sobre la *P.aeruginosa* en la neumonía asociada a la ventilación mecánica. Todo ello permite conocer nuevos conceptos de diagnóstico. Para ambos casos se usaron terapias: método de sellado de catéter, y la terapia de

cierre del tubo endotraqueal, respectivamente, los cuales dieron excelentes resultados. Pudiendo así comprobar su eficacia en estos problemas intrahospitalarios.

García et al. (2019) tiene como objetivo establecer la relación entre la resistencia a meticilina de cepas de *S.aureus* y *Staphylococcus* coagulasa negativa con la formación de biofilm. Es un trabajo de tipo experimental. Se usó el cefoxitín y la presencia del gen *mecA* para determinar la resistencia y para la formación de biofilm se usó el método en Tubo, siendo todos formadores de biofilm. Como conclusión, se vio que la resistencia a meticilina y la formación de biofilm son características independientes.

Roy et al. (2018) este estudio tiene como objetivo demostrar diferentes modelos y métodos para la cuantificación de biofilm y la elaboración de diversas moléculas para la erradicación de biofilm con potencia máxima a ciertas concentraciones, sin presentar efectos adversos en el huésped. Concluyendo que, con más estudios, estas moléculas pueden ser utilizadas para tratar infecciones asociadas a biofilms.

Ortega & Hernández (2018) esta revisión tiene como objetivo mostrar información sobre el biofilm ya sea su origen, funcionamiento, biosíntesis, su relación con las infecciones crónicas, diagnóstico y tratamientos antimicrobianos que existen actualmente. Realizaron un estudio descriptivo y consolidaron diversos trabajos de investigación. En estos trabajos se demuestra que han desarrollado métodos para inhibir tanto *in vitro* como *in vivo*, no obstante, han fracasado al llevarlo a la clínica. Por ello, con todo este conocimiento, deben desarrollarse nuevos métodos de detección y tratamientos para desarrollar conocimientos.

Salinas et al. (2017) este trabajo tuvo como objetivo analizar la capacidad de formación de biofilm, mediante el ensayo *in vitro* en Placa de Microtitulación, de cepas de *S. aureus*. Se llevó a cabo un estudio descriptivo de corte transversal. Se usaron cepas que causaron infecciones de piel y partes blandas e invasivas en niños en el 2012. La prueba *in vitro* fue exitosa, por lo tanto, se pudo clasificar las cepas en 3 grupos dependiendo de la

formación de biofilm. Resultado: El 100% fue formador de biofilm clasificando en formador moderado. Esto es importante ya que la detección de esta capacidad permite usar otras estrategias debido a que el tratamiento antimicrobiano no llega a ser eficaz en la mayoría de los casos.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Comparar el método más eficiente para detectar biofilm en enterobacterias productoras de carbapenemasas en el Hospital Nacional Hipólito Unanue.

1.3.2. Objetivos específicos

a) Determinar la producción de biofilm de enterobacterias productoras de carbapenemasas por el método en Placa de microtitulación en el Hospital Nacional Hipólito Unanue.

b) Establecer la producción de biofilm de enterobacterias productoras de carbapenemasas por el método en Tubo frente al método en Placa de Microtitulación en el Hospital Nacional Hipólito Unanue.

c) Examinar la producción de biofilm de enterobacterias productoras de carbapenemasas por el método en agar rojo Congo frente al método en Placa de Microtitulación en el Hospital Nacional Hipólito Unanue.

d) Evaluar la concordancia del método en Tubo y agar Rojo Congo frente al método en placa de microtitulación para la formación de biofilm en enterobacterias productoras de carbapenemasas en el Hospital Nacional Hipólito Unanue.

1.4. Justificación

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo la evaluación de tres métodos para detección de biofilm: en Tubo, agar rojo Congo, método en placa de Microtitulación; en enterobacterias productoras de carbapenemasas. En nuestro país no existen muchos trabajos

relacionados a las cepas a tratar, es por ello por lo que se trabaja para poder ampliar el conocimiento sobre este grupo, aislado en el HNHU, institución que tiene gran prevalencia de bacterias productoras de carbapenemasas. Esta última variable, es un gran problema no solo en la institución, sino en la población ya que la diseminación de estas es muy rápida.

Una gran problemática en el tratamiento de los pacientes, al no tener otro grupo de antibióticos que puedan ser eficaces contra estas. Otra cuestión para tratar es la formación de biofilm, sumándole esto a la resistencia contra las carbapenemasas, se podría decir que estas cepas se vuelven invulnerables a todo ello. La existencia de diversos métodos de detección del biofilm, si bien son de gran ayuda en el laboratorio, es necesario saber cuál de todos es el más efectivo para cada determinado aislamiento, y así poder dar el mejor tratamiento. De todos los métodos se debe conseguir cuál de ellos es el más eficiente, rápido y barato.

Se tiene como finalidad buscar el método más eficiente, para evitar encontrar errores en el resultado; el más rápido, porque cada segundo es importante y crucial en la salud de los pacientes; y el más barato, porque en nuestro contexto y en algunos otros países, se presenta escasez en los recursos para el sector salud.

Este trabajo de investigación nos aportará gran conocimiento sobre enterobacterias, carbapenemasas y biofilm.

1.5. Hipótesis

Al ser un estudio descriptivo no lleva hipótesis.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bases Teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1. *Enterobacteriaceae*

La familia *Enterobacteriaceae* está formado por un gran grupo de bacterias gramnegativas de forma de bacilos. Este grupo es el que tiene más aislamientos bacterianos en muestras clínicas. Tiene una distribución en la naturaleza muy amplia, se puede encontrar desde el suelo, aguas, plantas, hasta en el tubo digestivo de animales y plantas, como lo describe su mismo nombre (Winn et al., 2007).

Antes de que aparezcan los tratamientos como los antibióticos o quimioterapia, estas infecciones ya estaban bien definidas; así como los síndromes diarreicos y disentéricos, fiebre se sospecharía de especies de *Salmonella* o *Shigella*; neumonía con esputo color rojo ladrillo, de *Klebsiella pneumoniae*; y así varios agentes de heridas traumáticas o incisiones quirúrgicas contaminadas (Winn et al., 2007).

Por ello, este grupo puede ser encontrado en cualquier tipo de infecciones y ser recuperado en el laboratorio de cualquier tipo de muestra. Las personas inmunocomprometidas o debilitados son más fáciles de adquirir estas infecciones en el hospital, por contaminación de agentes del mismo ambiente o por procesos invasivos (Puerta y Mateos, 2010).

2.1.1.1. Características. Son bacterias aerobias, pero pueden crecer en anaerobiosis (anaerobios facultativos). No forman esporas. La mayoría reducen nitratos a nitritos. No licuan el alginato. Fermentan la glucosa formando ácido, produciendo o no gas. Son oxidasa negativa, excepto la *Plesiomonas*. Producen catalasa. Su crecimiento no se ve favorecido por la presencia de NaCl. Casi todos son móviles (Puerta y Mateos, 2010).

2.1.1.2. Epidemiología. La gran parte se aísla del hombre o animales, con la opción de ser microbiota o transitorias en todo el organismo. Abundantes en la naturaleza, prefieren

ambientes húmedos. En el intestino humano, conforman la microbiota aeróbica, degradando alimentos y produciendo gas debido a la fermentación. Siendo la *E.coli* el agente más constituyente de esta microbiota. En ocasiones, estas infecciones pueden volverse patogénicos como oportunistas en infecciones urinarias, septicemias, pulmonías, entre otras (Winn et al., 2007).

A inicios de los años 2000, Grecia y Estados Unidos fueron los primeros países en notificar cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas. A partir de ahí, se extendieron a varios países. *Klebsiella pneumoniae* es la enterobacteria productora de carbapenemasa aislada más frecuente. Existen dos dificultades de este grupo de gérmenes, la alta mortalidad que suponen estas bacterias y las limitadas opciones terapéuticas que poseemos (Antequera et al., 2020).

2.1.1.3. Estructura. Microorganismos de morfología gran positiva como bacilo, de 1-3 μm de largo y 0,5 μm de ancho. La capa interna o membrana citoplasmática está formada por una bicapa lipídica que regula la entrada de metabolitos, macromoléculas y nutrientes. Otra estructura contigua es el espacio periplasmático, que contiene enzimas. Al borde externo se encuentra una monocapa de peptidoglucano. La membrana externa consiste en otra doble capa fosfolipídica conteniendo lipopolisacáridos, lipoproteínas, proteínas porinas multiméricas y otras proteínas. Entre estas últimas proteínas se extienden hasta el exterior formando: flagelos, fimbrias y pili sexual (Winn et al., 2007).

2.1.1.4. Patógenos Específicos.

A. *Escherichia coli*. Es el microorganismo más estudiado. La mayoría son móviles y también la mayoría fermentan la lactosa. Producen indol a partir del triptófano. Existen diversas variantes de la *E.coli* entre ellas tenemos: *E.coli* enterotoxigénico (ECET), *E.coli* enteropatógeno (ECEP), *E.coli* enterohemorrágico (ECEH), *E.coli* enteroinvasiva (ECEI) y *E.coli* enteroagregativo (Puerta y Mateos, 2010).

Es el más común en sepsis gramnegativa y en shocks producidas por endotoxinas; otras formas más comunes son infecciones del tracto urinario y de heridas, neumonía en hospitalizados y meningitis en neonatos (Winn et al., 2007).

B. *Klebsiella*. Fermentan la lactosa, su crecimiento en placas es mucoide debido a la producción de una capsula de polisacáridos, todas las especies son inmóviles. Usan el citrato como única fuente de carbono. *Klebsiella oxytoca* es la única indol- positivo. Puede causar neumonía o ITU, aunque mayormente se adquiere en el hospital, también lo pueden adquirir personas debilitadas. Ocupa el segundo lugar en incidencia de bacteriemia de gramnegativos (Puerta y Mateos, 2010).

C. *Salmonella*. Poseen antígeno somático, flagelar y capsular. Engloban más de 2200 serotipos clasificados en grupos y serotipos. Se puede llegar a observar cómo diferentes cuadros: portador asintomático, gastroenteritis aguda, bacteriemia, infecciones focales y fiebre tifoidea. Son anaerobias facultativas y móviles, oxidasa negativa y la mayoría son lactosa y sacarosa negativa (Winn et al., 2007).

D. *Enterobacter*. Anteriormente agrupados en el grupo *Klebsiella- Aerobacter*; sin embargo, los *Enterobacter* son móviles y con una capsula menor. Principalmente colonizan a hospitalizados. También asociados en quemaduras de heridas, tracto urinario y vías respiratorias (Puerta y Mateos, 2010).

E. *Serratia*. Producen tres enzimas hidrolíticas: gelatinasa, lipasa y DNasa. Posee resistencia a cefalotina y colistina. La *Serratia marcescens* es la más común de este grupo, la cual se asocia con neumonías y septicemias (Winn et al., 2007).

F. *Hafnia*. Considerado anteriormente del género *Enterobacter*, son bacterias móviles. Relacionado a infecciones nosocomiales, con una sensibilidad similar a *Enterobacter* (Puerta y Mateos, 2010).

G. *Citrobacter*. Este género presenta once especies. No tiene actividad de lisina

descarboxilasa, ni hidrolisis de ONPG. Se han aislado en muestras de orina y respiratorias. Ocasionalmente ocasionan meningitis y abscesos cerebrales (Winn et al., 2007).

H. *Yersinia*. Microorganismos patógenos, zoonosis en animales como roedores, cerdos y aves, el hombre es un huésped accidental. *Yersinia pestis* crece en diferentes medios de cultivo, no fermenta la lactosa, y es el agente causante de la peste. *Yersinia enterocolitica* causa infrecuente de diarrea, pacientes con esta septicemia tienen una mortalidad muy alta (50%) a pesar de recibir tratamiento (Puerta y Mateos, 2010).

I. *Proteus, Providencia, Morganella*. Bioquímicamente presenta desaminación de lisina. Estos géneros se pueden encontrar en suelos, agua y áreas contaminadas por materia fecal. Causantes de infecciones urinarias y de heridas. El género *Proteus* se caracteriza por la producción de H₂F (Winn et al., 2007).

J. *Shigella*. Causante de la disentería bacilar. Cuadro similar al de *E. coli* enterohemorrágico, por la toxina. Origen por la contaminación de vegetales. Se diagnostica por medio del coprocultivo. Y como tratamiento se da rehidratación y antibioticoterapia (Puerta y Mateos, 2010).

K. Otros Géneros. *Edwardsiella tarda*, de importancia médica. Reservorio en reptiles y peces de agua dulce. *Plesiomona shigelloides*, se ha asociado con diarreas hasta infecciones intraintraestinales. La mayoría son resistentes a las penicilinas. *Eginwella americana*, es un patógeno primario de vegetales y saprofito del hombre (Winn et al., 2007).

2.1.2. Antimicrobianos

Los antimicrobianos son sustancias químicas producidas en forma sintética o por microorganismos, con capacidad de inhibir o matar microorganismos. Estos pueden ser clasificados por su estructura química y mecanismo de acción (Rossi y Andreazzi, 2006).

2.1.2.1. Principales mecanismos de acción de los antimicrobianos

A. Efectos sobre la síntesis de la Pared Celular (Betalactámicos, Carbapenémicos y

Glicopéptidos). La síntesis de la pared celular es una reacción catalizadora por enzimas específicas. También participan proteínas reguladoras, llamadas proteínas de liga de la penicilina (PBPs). La pared celular mantiene la presión osmótica de la bacteria. El antibiótico inhibe la síntesis de los mucopeptidos evitando la formación del uridinfosfato, precursor del ácido N- acetilmuramico. Actúa y liga a las PBPs en la membrana, enzimas autolíticas se liberan y degradan la pared ocurriendo así la muerte bacteriana (Fernández-Urday et al., 2015).

B. Inhibición de la Síntesis Proteica (Macrólidos, Aminoglucósidos, Lincosamidas, Tetraciclinas, Oxazolidinona, Streptogramina). Este grupo penetra la membrana por medio de canales proteicos, interactúan con objetivos específicos en el ribosoma, interfiriendo en la síntesis proteica, ocasionando un efecto bacteriostático (Rossi y Andreazzi, 2006).

C. Efectos sobre la Estructura y Función de la Membrana Celular (Polimixina). Cuando el antimicrobiano llega a la membrana se inserta y produce una abertura entre la capa lipídica y las proteínas, llevando así a la ruptura de la membrana. (Fernández-Urday et al., 2015).

D. Interferencia en la Síntesis del Ácido Nucleico (Quinolonas). Inhiben la síntesis del ácido nucleico por liga al ARN polimerasa o inhibición del ADN girasa, provocando el efecto bactericida (Rossi y Andreazzi, 2006).

E. Actividad Antimetabólica o Competitividad Antagónica (Inhibidores del Ácido Fólico). Las sulfonamidas como agentes quimioterápicos son el claro ejemplo de este mecanismo. Este mecanismo llevo a plantear la teoría de los antimetabolitos, la cual fue tomada en diversas áreas como la nutrición, regulación hormonal y farmacología (Fernández-Urday et al., 2015).

2.1.2.2. Principales mecanismos de resistencia de las bacterias

A. Inactivación enzimática. La más frecuente. Algunas bacterias producen enzimas

que neutralizan la droga o sus efectos antimicrobianos (Rossi y Andreazzi, 2006).

B. Alteración de la Permeabilidad de la Membrana. La alteración en la expresión de las porinas altera el ingreso y la consecuente acción de algunos antimicrobianos (Rossi y Andreazzi, 2006).

C. Mutación de genes de resistencia. Estos genes o sus represores pueden ser activados o inactivados por la migración de secuencias de inserción (Fernández-Urday et al., 2015).

D. Eflujo Activo de Antibióticos. Capacidad de expulsar activamente los antibióticos para afuera de la célula, dando una concentración inadecuada del antimicrobiano y así una acción no efectiva (Rossi y Andreazzi, 2006).

E. Alteración del Sitio de Ligación del Antibiótico. Los antibióticos se ligan a sitios específicos en la bacteria, pero si este sitio fuese alterado, no se completaría la ligación y por ello el antimicrobiano sería ineficiente contra la bacteria (Rossi y Andreazzi, 2006).

2.1.3. Carbapenémicos

La obtención de la tienamicina inicio el desarrollo de los carbapenémicos. Sin embargo, su acción antibacteriana no era muy estable es por ello que se tuvo que desarrollar la N-formimidoil tienamicina o imipenem. A pesar de ello la enzima dehidropeptidasa I renal inactivaba su acción, al ver esto se le incluyo un inhibidor de esta enzima. Imipenem/cilastatina fue el primer carbapenem en ser aprobado su uso. Siguiéndole así meropenem, ertapenem, y doripenem (Martínez et al., 2010).

Son los antimicrobianos más efectivos contra los gram negativos y gram positivos. Son menos vulnerables a casi todos los mecanismos de resistencia a los betalactámicos. Se puede decir que son la última esperanza más confiable para enfrentar las infecciones y son más seguros que las polimixinas, de última línea, como el colistin, que traen consigo efectos adversos (Sacsquispe y Bailón, 2017).

El anillo del carbapenem está formado por la condensación de un anillo betalactámico y uno pirrolinídico de cinco miembros (pen). Posee en posición 1 un átomo de carbono (carba) y un enlace no saturado entre 2 y 3 (-em). Los distintos tipos de carbapenémicos son producto de sustituciones en posición 1 y 2. Inhiben la síntesis de la pared celular mediante una transpeptidación uniéndose a residuos de serina de peptidasas ubicadas en las PBPs. La pared celular se debilita y la bacteria se lisa, debido a eso la mayoría son bactericidas (Martínez et al., 2010).

La resistencia que se desarrolla con este grupo de antimicrobianos es poco frecuente, sin embargo, se da en mayor frecuencia en brotes hospitalarios. Esta resistencia se puede deberse a diversas razones como: alteraciones en la permeabilidad, por eflujo activo, inactivación de betalactamasas (carbapenemasas) o por modificaciones de las dianas (Martínez et al., 2010).

Las Enterobacterias resistentes a los carbapenémicos son una problemática a nivel mundial de gran importancia en la salud pública. Son multidrogo resistentes, por ello dificulta el tratamiento. Se podría entender que el uso indiscriminado de estos antimicrobianos facilita esta resistencia (Sacsquispe y Bailón, 2017).

Los carbapenémicos tienen un amplio espectro de actividad, gran capacidad de penetración en la pared celular en los gramnegativos, y la alta afinidad por las PBP esenciales y la alta resistencia a muchas betalactamasas tanto de grampositivos y gramnegativos (Martínez et al., 2010).

2.1.3.1. Técnicas para Detección de Carbapenemasas. Entre los diferentes métodos que existen tenemos las convencionales como lo es el antibiograma, valorando los halos de inhibición que se formen. También tenemos la dilución en agar, micro y macrodilución, tiras con gradiente de antibiótico. Cabe destacar que también existen métodos moleculares, los cuales dan resultados más rápidos, y también microarrays, técnicas inmunocromatográficas,

técnicas colorimétricas, nefelometría, citometría de flujo, quimioluminiscencia y bioluminiscencia, espectrometría de masas, microfluidos y método de lisis bacteriana (March, 2017).

El Test de Hodge modificado permite la detección de producción de carbapenemasas, sin embargo, posee baja especificidad debido a la falsa identificación de hiperproductores de AmpC y baja sensibilidad porque detecta débilmente los productores de NDM. Su importancia radica en la detección de productores de KPC y de OXA 48. El Test de inhibición de ácido borónico es específico para detectar KPC en *K. pneumoniae* usando el imipenem o meropenem (Cercenado, 2015).

La inhibición por EDTA, se usa para detectar fenotípicamente metalo beta lactamasas, usando el disco de EDTA por el método de triple disco. En una placa de Mueller Hinton inoculado con la cepa problema, se coloca un disco con un agente quelante frente a un disco de imipenem y otro de meropenem, se tomará como positivo si se ve un aumento en el halo o si se forma sinergia entre los carbapenémicos y el agente quelante (Nicola et al., 2012).

El E Test MBL permite detectar productores de metalo betalactamasas con base en la inhibición de la actividad MBL por EDTA, útil para detectar alta resistencia a imipenem. Las tiras contienen concentraciones de imipenem en un extremo, y en el otro imipenem con EDTA. Esta quela los iones de zinc que usan las MBLs para catalizar la hidrólisis de imipenem y meropenem, inhibiendo así la actividad de las MBLs (Bora et al., 2014).

La inhibición por ácido fenil borónico (APB) es usado para detectar carbapenemasas de clase A. Limitado para especies productoras de AmpC, por la acción del ácido borónico. La cloxacilina inhibe la actividad de las cefalosporinas, es por ello por lo que se combina con el APB para diferenciar cepas que producen carbapenemasa de clase a y las que producen AmpC (Reyes-Chacón et al., 2017).

El método de inactivación de carbapenémicos fue desarrollado para detectar la

actividad carbapenemasa en bacilos gram negativos. Este método tiene alta concordancia con métodos de PCR para detección de genes que codifican carbapenemasas. Se toma una asada de 10 uL de la cepa problema cultivada en agar MH y se re suspende en 400 uL de agua destilada, agregando dentro un disco de Meropenem 10 ug y se incuba 2 horas a 35°C. Luego se saca el disco y se coloca en una placa de MH previamente sembrada una cepa de *E.coli* ATCC 25922 a una turbidez de 0.5 Mc Farland. Si se forma un halo el resultado sería negativo (Reyes-Chacón et al., 2017).

2.1.4. Biofilm

Llamado así a las comunidades de bacterias adheridos a una superficie inerte o un tejido, crecen rodeados de una matriz extracelular de exopolisacáridos. Esta comunidad está unida irreversiblemente en la superficie, mostrando una alteración del fenotipo con respecto a su crecimiento y transcripción genética. El crecimiento de biofilm es el tipo de crecimiento natural que tienen las bacterias en la naturaleza. Esta capacidad de producir biofilm no está restringida para algún grupo de microorganismo, en condiciones ambientales la mayoría lo pueden formar (Lasa et al., 2005).

Son formaciones supracelulares que surgen con la finalidad de sobrevivir dotándolos de resistencia mecánica, al sistema inmunitario y a los antimicrobianos. Comúnmente los laboratorios estudian los biofilms de forma planctónica, estos al liberarse obtienen una nueva forma con diferentes características, cuyos datos de sensibilidad difieren del anterior estado (Macià et al., 2018).

2.1.4.1. Estructura del biofilm. Con ayuda de un microscopio laser cofocal de barrido se pudo observar un biofilm in vivo. Se podía pensar que el mayor porcentaje del biofilm lo ocupan los microorganismos, pero la realidad no es así, estos solo ocupan el 2-5%. Los principales componentes se encuentran en la matriz extracelular los cuales son: agua (>97%), microorganismos (2-5%), polisacáridos (1-2%), proteínas (<1-2%), ADN y ARN

(<1-2%), todo ello depende de la especie y de los factores del ambiente (Fernández, 2019).

2.1.4.2. Factores que intervienen en la formación del biofilm. La formación del biofilm está determinada por ciertos factores:

A. Superficie. La colonización se beneficia por una superficie rugosa y si el área de superficie es mayor. Muchos investigadores encontraron que la adhesión microbiana es más rápida en las superficies hidrófobas.

B. Especies bacterianas. La capacidad de colonizar diversas superficies depende de la versatilidad metabólica y su plasticidad genotípica de las especies. Presencia de fimbrias y la producción de exopolisacáridos ayudan en la adhesión.

C. Factores medioambientales. Características en el medio acuoso como el pH, cantidad de nutrientes, cargas iónicas, temperatura y fluidez. En algunos estudios se observó que el incremento de cationes afecta la adhesión de algunas bacterias a algunas superficies, pues este aumento reduce las fuerzas repulsivas entre la bacteria y la superficie (Zambrano y Suárez, 2006).

2.1.4.3. Fases de formación del biofilm.

A. Adsorción de moléculas del huésped y bacterias a la superficie. Casi siempre, las superficies expuestas absorben moléculas que acondicionan la adhesión de bacterias formando una película. Los metabolitos y enzimas de la bacteria se unen y acondicionan la adherencia. La formación de esta película es importante ya que altera la energía superficial, esta película da sitios de anclaje para la adherencia de las bacterias, facilitando así la colonización. Algunas bacterias no tienen la capacidad de adherencia es por ello que esta película es esencial (Zambrano y Suárez, 2006).

B. Adhesión bacteriana primaria. Se da por la interacción entre la superficie y la célula planctónica. Esta fase es reversible. La bacteria se une ya sea por flujo, quimiotaxis o por su movilidad. Una vez que las bacterias estén cerca se da la unión para ello depende de la

suma de las fuerzas de unión y repulsión (Zambrano y Suárez, 2006).

C. Adhesión bacteriana secundaria. Luego de la unión de bacterias se da paso a la formación del exopolisacárido, este se une con la superficie por ligandos específicos localizados en pilis, fimbrias y fibrillas. Esta fase es irreversible, la bacteria queda firmemente unida. Aquí las bacterias se pueden unir con otras similares (co- agregación) o con especies diferentes (co- adhesión) (Zambrano y Suárez, 2006).

D. Maduración del biofilm. La densidad y complejidad del biofilm empieza a crecer, debido al aumento de las bacterias. Los componentes extracelulares reaccionan con la materia orgánica e inorgánica creando así el glicocalix. El crecimiento del biofilm depende mucho del acceso de los nutrientes, su difusión, la eliminación de sus desechos (Zambrano y Suárez, 2006).

E. Desprendimiento activo. En esta fase, las capas más externas producen células planctónicas activas y con la capacidad de dividirse, las cuales pueden seguir colonizando otras superficies. Se da por dos mecanismos: erosión y migración (Zambrano y Suárez, 2006).

2.1.4.4. Quorum Sensing. Llamado así a la señalización que liberan los microorganismos al producir moléculas que regulan la densidad de la población de bacterias. Adecuan la expresión de genes a la situación externa. El quorum sensing regula los genes mediante la secreción y detección de señales químicas llamadas autoinductores. Cuando estos alcanzan un valor determinado, se disparan los genes de función cooperativa y favorece la adaptación al entorno (Ramirez-Mata et al., 2014).

2.1.4.5. Biofilm En El Organismo Humano. Según el Instituto Nacional de Salud de EE. UU, el 60% de las infecciones microbianas son causadas por biofilms. La infección que causa un biofilm es detectada en pleno tratamiento. En el cual no se conoce el agente causal es por ello por lo que es difícil su erradicación. El biofilm es la causa más común en infecciones del tracto urinario, otitis media, endocarditis de válvulas mitrales e infecciones

pulmonares. Actualmente se han desarrollado materiales que pueden ser implantados en el organismo sin dar reacción adversa, como, por ejemplo: implantes de cadera, de válvulas cardíacas, marcapasos, catéteres; a pesar de estas novedades, estas no se libran de ser un buen nicho para la formación de biofilm (Zambrano y Suárez, 2006).

Mediante un tratamiento antimicrobiano hacia el biofilm formado, se estima que se reduce la carga microbiana incluso hasta los síntomas. No ocurriría esto con infecciones asociadas a biofilm o pacientes inmunocomprometidos, estas células que sobrevivirían colonizarían otras zonas y producirían otras infecciones. También estos tratamientos pueden generar resistencias y mutaciones ocasionando así mayor supervivencia de estos microorganismos (Paraje, 2018).

Davies y Hoyle et al, plantearon que una bacteria planctónica es fenotípicamente diferente a una dentro de un biofilm, debido a su actividad metabólica, propiedades de adhesión y susceptibilidad. La protección contra varios antimicrobianos se puede dar por dos mecanismos: producción excesiva de exopolisacáridos y disminución en la velocidad de crecimiento bacteriano, por lo tanto, queda con un metabolismo lento. Algunas bacterias desarrollan una resistencia a antimicrobianos a nivel genético o también por transferencia por plásmidos (Zambrano y Suárez, 2006).

2.1.4.6. Métodos para detección de formación de biofilm in vitro. En el laboratorio de microbiología, existen 2 tipos de pruebas para la detección de biofilm: cualitativas (en Tubo y en placa con agar Rojo Congo) y cuantitativas (método en Placa de Cultivo de Tejido).

A. En tubo. Es el método más práctico y rápido que existe hasta ahora para la detección de biofilm. La cepa problema se inocula en un tubo con 5 ml de caldo tripticasa de soya. Y se incuba a 37°C por 24 horas, luego se decanta el tubo y se agrega 4 ml de safranina al 2% y se deja reposando por 5 minutos, nuevamente se decanta el tubo. La biofilm se

adhiera a las paredes del tubo y se tiñe, así se detecta macroscópicamente, sin embargo, se necesita una confirmación microscópicamente (Christensen et al., 1985).

B. Placas de agar rojo Congo. Las cepas problemáticas se siembran en placas de agar rojo Congo para obtener colonias individuales y se incuban durante toda la noche a 37°C en aire y unas 24 horas en temperatura ambiente. Las cepas productoras de biofilm aparecen de color negro y las no productoras de color rojo (Peña y Uffo, 2013).

C. En placa de Microtitulación. Las bacterias problema se inoculan en 10 ml de caldo tripticasa de soya (TSB) con 0,25% de glucosa y se incuban durante toda la noche con agitación a 37°C en aire. Esta solución se diluye con TSB con glucosa en 1:100, y 200 ml se inoculan en placas de poliestireno con 96 pocillos. Las placas se incuban durante la noche a 37°C en aire, se lava, y se tiñe con safranina o cristal violeta. La densidad óptica del biofilm adherido se lee con un lector de ELISA a 490 nm o 630 nm si se usa el cristal violeta (Salinas et al., 2017).

D. PCR cuantitativa. Permite la identificación de microorganismos en heridas en pocas horas. Este tipo de pruebas no distinguen entre el crecimiento de biofilm y la presencia de células planctónicas (Torregrosa, 2015).

E. FISH con sonda de ADN. Obtiene prevalencia, organización, y además permite visualizar las comunidades bacterianas en los biofilms. La identificación bacteriana se logra a través del FISH (Torregrosa, 2015).

F. Microscopia de escaneo laser confocal (CLSM) y microscopia electrónica de barrido (SEM). Las técnicas más apropiadas para ver biofilms en biopsias (Torregrosa, 2015).

III. MÉTODO

3.1. Tipo de investigación

El tipo de investigación fue de enfoque cuantitativo, de tipo no experimental. Por el nivel de investigación fue descriptiva. Por el número de mediciones fue transversal. Por el tiempo de ocurrencia fue prospectivo.

3.2. Ámbito temporal y espacial

La investigación se realizó en el mes de enero - febrero del año 2022, en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional Hipólito Unanue.

3.3. Variables

3.4.1. *Variables Dependientes*

Formación de biofilm por el método en tubo en EPCs en HNHU.

Formación de biofilm por el método en agar rojo Congo en EPCs en HNHU.

Formación de biofilm por el método en placa de microtitulación en EPCs en HNHU.

3.4.2. *Variables Independientes*

Enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPCs) en el HNHU.

Tipo de Variable	Variable	Definición conceptual	Definición Operacional (lenguaje informal)	Dimensión	Categoría	Escala
Variable Independiente	Enterobacterias productoras de Carbapenemasas	Bacterias Gramnegativas pertenecientes al grupo Enterobacteriaceae, que producen enzimas que inhiben la acción de los carbapenémicos.	Usando métodos fenotípicos como la inactivación de carbapenemasas, se puede determinar la producción de carbapenemasas.	Género de enterobacterias	Presencia de carbapenemasas por pruebas fenotípicas.	Presente Ausente
Variable Dependiente	Formación de biofilm (por el método en Tubo)	Comunidades microbianas adheridas a una superficie, rodeada por una matriz extracelular polimérica de origen microbiano y otros compuestos del medio.	Formación de biofilm detectado por el método en tubo, visualizando un sedimento coloreado en el fondo del tubo.	De laboratorio	Formación de biofilm detectado por el método en Tubo.	- + ++ +++

Variable Dependiente	Formación de biofilm (por el método en Agar Rojo Congo)	Comunidades microbianas adheridas a una superficie, rodeada por una matriz extracelular polimérica de origen microbiano y otros compuestos del medio.	Formación de biofilm detectado por el método en agar rojo Congo, visualizando colonias negras.	De laboratorio	Formación de biofilm detectado por el método en Agar Rojo Congo.	Formadora No formadora
Variable Dependiente	Formación de biofilm (por el método en placa de Microtitulación)	Comunidades microbianas adheridas a una superficie, rodeada por una matriz extracelular polimérica de origen microbiano y otros compuestos del medio.	Formación de biofilm detectado por el método de placa de microtitulación, midiendo la absorbancia que dan los pocillos de las placas.	De laboratorio	Formación de biofilm detectado por el método en Placa de microtitulación.	Fuerte Moderado Bajo Negativo

3.4. Población y muestra

3.4.1. Población

La población estuvo formada por 264 aislamientos de especies de enterobacterias a partir de muestras clínicas que presentaron resistencia a carbapenémicos y producción de carbapenemasas demostrado por métodos fenotípicos detectados en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional Hipólito Unanue desde 2016 hasta 2019.

3.4.2. Muestra

Se trabajó con una muestra de 70 cepas de enterobacterias que frente al disco de meropenem presentaron halo de inhibición menor a 22 mm, y fueron aisladas desde el año 2016 hasta 2019. Las cepas cumplieron con los criterios de inclusión.

3.4.3. Criterios de inclusión

Cepas que mostraron viabilidad.

Cepas con halo de inhibición menor a 22 mm frente al meropenem.

Cepas con presencia de carbapenemasas.

3.4.4. Criterios de exclusión

Cepas que no mostraron viabilidad.

Cepas contaminadas.

Cepas provenientes del mismo paciente. Sólo se consideró una cepa por paciente.

3.5. Instrumentos

Se utilizó fichas de datos (anexo B), donde se registró los datos de cada muestra. Para validar las fichas se realizó Juicio de Expertos, entrevistando a tecnólogos médicos que laboran en el área de microbiología.

3.6. Procedimientos

Para ejecutar este proyecto, se dividió por pasos:

3.6.1. Producción de carbapenemasas

Las cepas conservadas en congelación (-20°C) en viales con caldo tripticasa de soya, fueron sembradas en agar sangre para confirmar su viabilidad. Se dejó incubar por 24 horas a 37°C. Al día siguiente, luego de confirmar la viabilidad de las cepas, se incluyó las cepas que tienen halo menor a 22 mm a meropenem.

Se detectó la producción de carbapenemasas, con el método de inactivación de carbapenemasas, descrito por Zwallow y col. 2015. El cual se detalla a continuación, con un asa de 10 µL se tomó cada una de las cepas cultivadas anteriormente en agar Mueller Hinton e incubadas por 24 horas a 35°C y se re suspendió en 400 µL de agua destilada estéril. Inmediatamente se sumergió un disco de meropenem de 10 ug y se incubó durante 2 horas a 35°C. Luego de la incubación se retiró el disco con una pinza estéril y se colocó en una placa de agar Mueller Hinton ya sembrada con la cepa de *E. coli* ATCC 25922 a una turbidez de 0.5 en escala de Mc Farland. La interpretación se fue por la presencia (negativo para carbapenemasas) o ausencia (positivo para carbapenemasas) del halo de inhibición (Reyes-Chacón et al.,2017).

3.6.2. Detección de formación de biofilm por el método en tubo

En un tubo, que contiene 10 ml de TSB, se inoculo una asada de la cepa previamente cultivada en agar sangre. Se incubó por 18 horas a 35°C. Luego se decantó los tubos, quedando así un sedimento adherido, este se coloreo con safranina. La producción de biofilm se consideró positiva si es que se observa una película coloreada en el tubo (Christensen et al., 1985).

3.6.3. Detección de formación de biofilm por el método en agar rojo Congo

Se inocularon por estría las cepas en el medio rojo Congo y se incubó en medio aeróbico, por 24 horas a 37°C. Seguido de esto pasó a un mantenimiento a temperatura ambiente por 48 horas. Se usaron controles positivo y negativo. Se interpretó como positivo a las colonias negras de consistencia cristalina seca (Peña y Uffo, 2013).

3.6.4. Detección de formación de biofilm por el método en placa de microtitulación

Las cepas problemáticas se inocularon en caldo tripticasa de soja (TSB) y se incubaron por 24 horas a 37°C.

Luego, se preparó una dilución 1:100 en TSB con 1% de glucosa. De esta dilución se tomó alícuotas de 200 µL de suspensión de cada aislado y se agregó a cada pocillo de la placa de microtitulación, se incluyeron pocillos con caldo TSB glucosado al 1% como blanco.

Luego se decantó el sobrenadante y se hicieron dos lavados con 200 µL de PBS. Para la fijación, se agregó 200 µL de etanol al 95% a los pocillos. Se decantó el etanol y se dejó secar al aire durante 24 horas. Para la tinción se usó 200 µL de safranina para cada pocillo. Se dejó por 30 minutos, luego se removió y se hicieron tres lavados con agua destilada, se dejó secar las placas por 2 horas.

Se añadió 200 µL una solución etanol 96%, para la lectura del biofilm formado se utilizó un lector de ELISA a una longitud de onda de 620 nm, y se registró la densidad óptica (DO) del biofilm adherido y coloreado de cada unidad muestral. Primero se halló el valor de corte de la densidad óptica, siendo este el promedio de la densidad óptica de todos los controles negativos sumando tres desviaciones estándar. Una vez hallada este valor de corte, se procedió a buscar las escalas de la producción por este método, con ayuda de la DO sumando las desviaciones estándar por 2x y 4x. Y así se dio la interpretación de la producción de biofilm, el cual está basado en los criterios de Stepanovic et al. (Anexo C) (Salinas et al., 2017).

Una vez conseguido los resultados, se llevó estos a tablas de doble entrada, comparando los Verdaderos Positivos, Verdaderos Negativos, Falsos Positivos y Falsos Negativos de los métodos a investigar contra el método patrón de oro. De esta forma usamos las fórmulas y hallamos los parámetros diagnósticos (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, exactitud diagnóstica). Estos parámetros nos

ayudaron a evaluar la efectividad de los métodos a investigar.

3.7. Análisis De Datos

Las bases de datos de las muestras fueron recogidas usando el programa Whonet 5.6.

Una vez registrados los datos, se evaluaron las variables mediante estadística descriptiva, desarrollando una presentación en tablas y figuras mediante el programa Microsoft Excel.

3.8. Consideraciones Éticas

No se realizó consentimiento informado, dado que se trabajó con cepas aisladas de muestras clínicas. Las cepas aisladas fueron codificadas por el investigador, quien fue el único en conocer los datos del paciente, guardando la confidencialidad. El trabajo presentó una declaración jurada en la que detalla que todos los datos utilizados fueron recolectados del Hospital Nacional Hipólito Unanue en el Servicio de Microbiología, Inmunología y Biología Molecular (Anexo E). El trabajo fue presentado ante el Comité de Ética del Hospital Nacional Hipólito Unanue.

IV. RESULTADOS

Durante el periodo enero 2016 a diciembre 2018, a partir de una población de 264 aislamientos de especies de *Enterobacterales* se recuperaron una muestra de 70 cepas productoras de carbapenemasas, provenientes de los pabellones de hospitalización y consultorios del Hospital Nacional Hipólito Unanue.

Del total, se pudo identificar las especies de los aislamientos (Figura 1), siendo estos: *Enterobacter cloacae*, 3 aislamientos (4,29%); *Escherichia coli*, 2 aislamientos (2,86%); *Klebsiella aerogenes*, 2 aislamientos (2,86%) y por último el agente más aislado del grupo estudiado fue *Klebsiella pneumoniae*, 63 aislamientos (90%).

Figura 1

Frecuencia de los microorganismos de los aislamientos de Enterobacterales productoras de carbapenemasas. Hospital Nacional Hipólito Unanue. Enero 2016- junio 2018.



Fuente: Servicio de Microbiología. Hospital Nacional Hipólito Unanue.

El método de referencia para la detección de biofilm (Tabla 1), el método en placa de microtitulación, detectó 37 cepas como productoras de biofilm, siendo el principal microorganismo asociado con la producción de biofilm en esta metodología las especies de

Klebsiella pneumoniae (89.19%), seguido de *Klebsiella aerogenes* (5.41%), y *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli* (ambos con 2.70%).

Tabla 1

Frecuencia de agentes formadores de Biofilm, en aislamientos de Enterobacterales productores de carbapenemasas por el método en Placa de Microtitulación.

Microorganismo	N° de cepas	Biofilm ausente		Biofilm presente	
		n	(%)	n	(%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	2	6.06	1	2.70
<i>Escherichia coli</i>	2	0	0.00	2	5.41
<i>Klebsiella aerogenes</i>	2	0	0.00	2	5.41
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	63	31	93.94	32	86.48
TOTAL	70	33	100.00	37	100.00

Fuente: Servicio de Microbiología. Hospital Nacional Hipólito Unanue.

El método de referencia para la detección de biofilm, el método en placa de microtitulación, detectó 37 cepas como productoras de biofilm, presentando unas 34 con débil producción de biofilm y 3 con moderada producción de biofilm (Tabla 2).

Tabla 2

Detección de biofilm por el método de referencia, Método en Placa para Cultivo de Tejido en aislamientos de Enterobacterales productores de carbapenemasas.

Microorganismo	N° de cepas	No Productor		Productor Débil		Productor Moderado	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	2	6.06	1	2.94	0	0.00
<i>Escherichia coli</i>	2	0	0.00	2	5.88	0	0.00
<i>Klebsiella aerogenes</i>	2	0	0.00	1	2.94	1	33.33
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	63	31	93.94	30	88.24	2	66.67
TOTAL	70	33	100	34	100.00	3	100.00

Fuente: Servicio de Microbiología. Hospital Nacional Hipólito Unanue

Uno de los métodos a evaluar fue el Tubo en Safranina, en este método se midió el resultado por cruces (+, ++, +++), dando como resultado: los productores moderados (++) fueron 27 cepas, los productores débiles (+) fueron 27 y no productores fueron 16 (Tabla 3).

Siendo el microorganismo detectado con la mayor producción de biofilm *Klebsiella pneumoniae* (96.30%), seguido de *Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli* (3.70%).

Tabla 3

Detección de biofilm por el Método de Tubo en Safranina, en aislamientos de Enterobacteriales productores de carbapenemasas.

Microorganismo	N° de cepas	No Productor		Productor 1+		Productor 2+	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	2	12.5	0	0.00	1	3.70
<i>Escherichia coli</i>	2	1	6.25	0	0.00	1	3.70
<i>Klebsiella aerogenes</i>	2	0	0	1	3.70	1	3.70
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	63	13	81.25	26	96.30	24	88.89
TOTAL	70	16	100	27	100.00	27	100.00

Fuente: Servicio de Microbiología. Hospital Nacional Hipólito Unanue.

El segundo método para evaluar fue el Cultivo en Agar Rojo Congo, donde solo 1 de las 70 cepas aisladas fueron colonias compatibles con las formadoras de biofilm (negras cristalinas secas). La única cepa que dio la única positividad a esta prueba fue una de las *Escherichia coli*. Todas las demás cepas no produjeron colonias negras cristalinas secas, como podemos observar en la Tabla 4.

Tabla 4

Detección de biofilm por el Método de Agar Rojo Congo en aislamientos de Enterobacterales productores de carbapenemasas.

Microorganismo	N° de cepas	No Productor		Productor	
		n	(%)	n	(%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	3	4.35	0	0.00
<i>Escherichia coli</i>	2	1	1.45	1	100.00
<i>Klebsiella aerogenes</i>	2	2	2.90	0	0.00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	63	63	91.30	0	0.00
TOTAL	70	69	100.00	1	100.00

Fuente: Servicio de Microbiología. Hospital Nacional Hipólito Unanue

Con todos los resultados se realiza una tabla de tamizaje para las tres metodologías: el método estándar en placa de microtitulación (PCT), cultivo en agar rojo Congo (ARC) y método de tubo en safranina (MTS). Caracterizándose como no formador, débil y moderado; para los métodos PCT y MTS; y como no formador y formador para el método ARC (Tabla 5); mientras que en la figura 2 se muestra el tamizaje de métodos, mostrando la frecuencia de formadores fuertes, moderados, débiles y no formadores; por cada método.

Tabla 5

Tamizaje de los aislamientos de Enterobacterales productores de carbapenemasas para la detección de biofilm por los métodos en Placa de microtitulación, Agar rojo Congo y en Tubo en safranina.

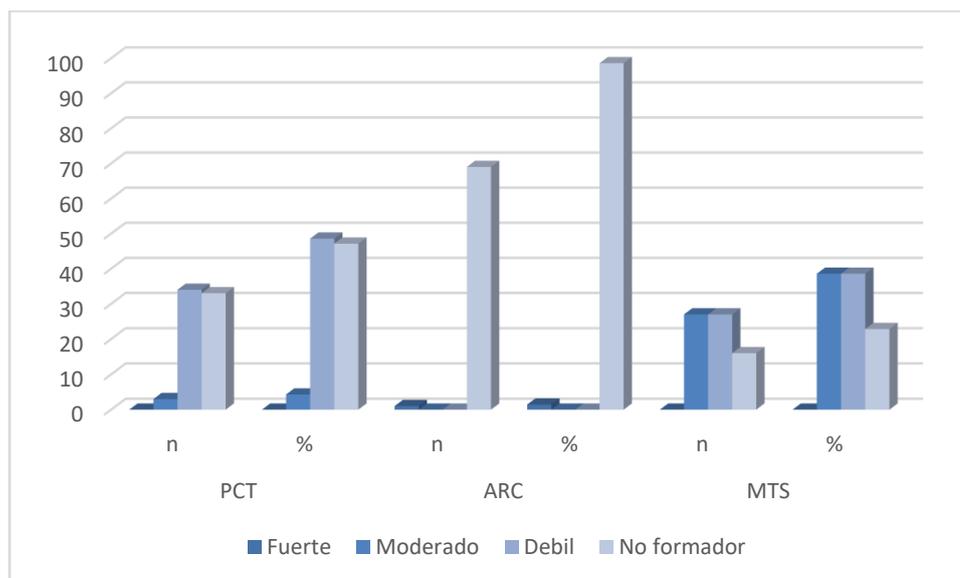
Formación de biofilm	PCT		ARC		MTS	
	n	%	n	%	n	%
Fuerte	0	0.00	1	1.43	0	0.00
Moderado	3	4.29	-	-	27	38.57
Débil	34	48.57	-	-	27	38.57

No formador	33	47.14	69	98.57	16	22.86
-------------	----	-------	----	-------	----	-------

Fuente: Servicio de Microbiología. Hospital Nacional Hipólito Unanue

Figura 2

Frecuencia de aislamientos de Enterobacterales formadores de biofilm, productores de carbapenemasas por método de tamizaje.



Fuente: Servicio de Microbiología. Hospital Nacional Hipólito Unanue.

Los valores diagnósticos del método en Tubo frente al método en Placa de microtitulación, nos permitió consignar los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y exactitud diagnóstica, según visto en la Tabla 6.

Tabla 6

Resultados del Método en Tubo y la detección de Biofilm en Placa de Cultivo de Tejido en aislamientos de Enterobacterales productores de carbapenemasas.

Resultado del Método en Tubo	Detección de biofilm por el patrón de oro, Método en placa para cultivo de tejido		
	Presente	Ausente	Total
Positivo	36 (VP)	18 (FP)	54

Negativo	1 (FN)	15 (VN)	16
Total	37	33	

Donde VP: Verdaderos Positivos, VN: Verdaderos Negativos, FP: Falsos Positivos, FN: Falsos Negativos.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FN} = \frac{36}{36+1} = 97.3\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN+FP} = \frac{15}{15+18} = 45.5\%$$

$$\text{Valor Predictivo Positivo} = \frac{VP}{VP+FP} = \frac{36}{36+18} = 66.7\%$$

$$\text{Valor Predictivo Negativo} = \frac{VN}{VN+FN} = \frac{1415}{15+1} = 93.8\%$$

$$\text{Exactitud Diagnostica} = \frac{VP+VN}{VP+FP+VN+FN} = \frac{36+15}{36+18+1+15} = 72.9\%$$

La determinación de los parámetros diagnósticos del método en Tubo para detectar biofilm, muestra una sensibilidad y especificidad de 97.3% y 45.5%, respectivamente, con un valor predictivo positivo de 66.7% y un valor predictivo negativo de 93.8%. Presentando así una exactitud diagnóstica para la prueba de 72.9%.

Los valores diagnósticos del método en cultivo en Agar Rojo Congo frente al método en Placa de microtitulación, nos permitió consignar los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y exactitud diagnóstica, según visto en la Tabla 7.

Tabla 7

Resultados del Método Agar Rojo Congo y la detección de biofilm en Placa de Cultivo de Tejido en aislamientos de Enterobacteriales productores de carbapenemasas.

Resultado del Método Agar Rojo Congo	Detección de biofilm por el patrón de oro, Método en placa para cultivo de tejido		
	Presente	Ausente	Total
Positivo	1 (VP)	0 (FP)	1

Negativo	36 (FN)	33 (VN)	69
Total	37	33	

Donde VP: Verdaderos Positivos, VN: Verdaderos Negativos, FP: Falsos Positivos, FN: Falsos Negativos.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FN} = \frac{1}{1+36} = 2.7\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN+FP} = \frac{33}{33+0} = 100.0\% \dots 99.9\%$$

$$\text{Valor Predictivo Positivo} = \frac{VP}{VP+FP} = \frac{1}{1+0} = 100.0\% \dots 99.9\%$$

$$\text{Valor Predictivo Negativo} = \frac{VN}{VN+FN} = \frac{33}{33+36} = 47.8\%$$

$$\text{Exactitud Diagnostica} = \frac{VP+VN}{VP+FP+VN+FN} = \frac{1+33}{1+0+33+36} = 48.6\%$$

La determinación de los parámetros diagnósticos del método en Tubo para detectar biofilm, muestra una sensibilidad y especificidad de 2.7% y 99.9%, respectivamente, con un valor predictivo positivo de 99.9% y un valor predictivo negativo de 47.8%. Presentando así una exactitud diagnostica para la prueba de 48.6%.

En la siguiente tabla (Tabla 8), se registran los parámetros diagnósticos de los métodos en Tubo y en Agar Rojo Congo, notándose que los resultados obtenidos en los 70 aislamientos muestran al método en Tubo poseer mayor sensibilidad y valor predictivo negativo que el método Agar Rojo Congo, el cual posee mayor especificidad y valor predictivo positivo.

Tabla 8

Evaluación de parámetros diagnósticos de los métodos en Tubo y Agar Rojo Congo para la detección de biofilm. (n=70)

Métodos	S (IC 95%)	E (IC 95%)	VPP (%)	VPN (%)
Método en Tubo	97.3% (86.2-99.5)	45.5% (29.8-62.0)	66.7% (53.4-77.8)	93.8% (71.7-98.9)

Agar Rojo Congo	2.7% (0.5-13.8)	100.0% (89.6- 100.0)	100.0% (20.7- 100.0)	47.8% (36.5-59.4)
-----------------	-----------------	----------------------	----------------------	-------------------

Donde: S: Sensibilidad, E: Especificidad, VPP: Valor Predictivo Positivo, VPN: Valor Predictivo Negativo, IC 95%: Intervalo de confianza del 95%.

El coeficiente Kappa de Cohen (k) se utiliza para valorar el grado de concordancia entre dos pruebas diagnósticas, cuando la variable evaluada es cualitativa o dicotómica y puede variar de -1 a 1 según el nivel de concordancia. Se calcula por la diferencia entre la proporción observada y la proporción esperada, si esta diferencia es cero, se podría decir que las pruebas no presentan concordancia; en cambio si es mayor, presentara concordancia. Se clasificará según la escala de valoración del k que propusieron Landis y Koch. (Anexo D). Esta escala mide la concordancia numéricamente en muy buena, buena, moderada, débil, muy débil y no concordancia.

Al calcular el índice Kappa para comparar la concordancia entre el método en Tubo y el método patrón de oro, Cultivo en Placa de Microtitulación, encontrando un coeficiente de Kappa de 0.44, dando una concordancia moderada.

Para el método Agar Rojo Congo frente al método patrón de oro, se encontró un coeficiente de Kappa de 0.03, dando una concordancia muy débil en la escala.

V. DISCUSION DE RESULTADOS

El presente trabajo tiene como fin proporcionar conocimiento sobre los métodos de detección de biofilm, así como comparar dos métodos no tan conocidos con el patrón de oro, que es la Placa de microtitulación.

Así como en otros países, en Perú, tenemos un elevado incremento de microorganismos resistentes a los antibióticos. En diversos centros de salud e instituciones se llevan a cabo los controles de vigilancia, los mapeos microbiológicos son muy importantes para ello. Esto último también ha ayudado a mostrarnos como avanza los microorganismos resistentes (Bora et al., 2014).

Los carbapenémicos son antimicrobiano de última línea usada en el Perú. La resistencia a estos supone una evolución que está relacionada a la mala terapia y uso de carbapenémicos. La resistencia a estos ha aumentado los últimos años, y al igual que en la Unión Europea, aquí en Perú, *Klebsiella pneumoniae* es la bacteria multirresistente más prevalente (De Zaro Alcalá, s.f.).

Los biofilms han representado una gran problemática en el tratamiento de las infecciones por microorganismos, generando gran cantidad de tasas de mortalidad y morbilidad. En nuestro estudio se usó el método de Cultivo de Placa de microtitulación como método de patrón de oro, el mismo que en otros estudios se nombra base de diagnóstico de biofilm (Ortega y Hernández, 2018) evidenciando mayor importancia en detectar la capacidad de formar biofilm, a diferencia de los métodos microscópicos que detectan al biofilm como tal.

En el presente estudio, se evaluaron las características de producción de carbapenemasas y la capacidad de formar biofilm, prestando así este trabajo para que en un futuro se pueda estudiar la asociación de estas. Así como en un estudio que se llevó a cabo en el mismo centro de salud, Hospital Nacional Hipólito Unanue, buscando la asociación entre

la producción de betalactamasas de espectro extendido y la capacidad de formar biofilm (Hurtado y Casablanca, 2019), demostrando que existe una asociación significativa de 43%.

El método que usamos como patrón de oro, método en Placa de Cultivo de microtitulación, es un método de elección para detectar la capacidad de formar biofilm, que fue usado en diversos estudios, uno de ellos fue en el que evaluaron la capacidad de formar biofilm en *Staphylococcus aureus*, dando resultado el 100% como formador moderado (Salinas et al., 2017). En nuestro trabajo si bien no se obtuvo ese resultado con el mismo método, se debe considerar que las cepas trabajadas no fueron gram positivos sino gram negativas y fueron distintas bacterias.

Un trabajo similar en Colombia (Estrada, 2016), en el cual trabajó también con cepas de *Klebsiella pneumoniae*, usando los métodos Agar Rojo Congo y en Placa de microtitulación, dando como formador de biofilm cerca del 80%. El autor también concluye que el mejor método para detectar biofilm es el Método en Placa de microtitulación, siendo este el más específico y capaz de caracterizar el resultado en fuerte, moderado, débil y no formador.

Otro estudio (Christensen et al, 1985) en el cual se evaluaba modelos cuantitativos para formación de biofilm, nos menciona una gran variedad de métodos, entre ellos el método en Placa de microtitulación y método en tubo. En este último se evalúa el coeficiente de correlación, con el método en placa de microtitulación, demostrando una correlación de 0.60 dando una correlación moderada, igual al de nuestro trabajo. Este estudio también demuestra un punto clave del método en tubo, que es la lectura del biofilm, que puede ser interpretada de diferente manera según el observador, sin embargo, al evaluar la correlación de la lectura de los diferentes observadores también demostró una correlación moderada.

Todo esto demuestra que para hablar sobre biofilm, aún tenemos bastante por conocer, debido a que estos tres trabajos presentados en nuestro estudio no son los únicos

capaces de detectar la capacidad para formar biofilm. Otros estudios muestran métodos más precisos para detectar presencia de biofilm como tal, como los métodos microscópicos o las técnicas moleculares, que es muy diferente a tener la capacidad para formar biofilm. Todo esto debería ser evaluado y establecer la relación costo - beneficio, siendo los métodos presentados en nuestro estudio, los más baratos, rápidos y sencillos.

VI. CONCLUSIONES

- El método más eficiente para detectar la capacidad de formar biofilm en el grupo de Enterobacterias productoras de carbapenemasas; según los parámetros diagnósticos hallados, el método en Tubo de safranina posee mejores parámetros, por ende, se puede concluir que este método es más eficiente.
- El método en Placa de microtitulación confirmó 37 (52,86%) cepas formadoras de biofilm.
- Para el método en Tubo de safranina, se obtuvo una sensibilidad de 97.3% y especificidad de 45.5% comparando con el patrón de oro, presentando un valor predictivo positivo de 66.7% y un valor predictivo negativo de 93.8%.
- Para el método Agar Rojo Congo, se obtuvo una sensibilidad y especificidad de 2.7% y 99.9%, respectivamente, un valor predictivo positivo de 99.9% y un valor predictivo negativo de 47.8%.
- La concordancia de los métodos Tubo en safranina y Agar Rojo Congo fueron 0,44 y 0,03, respectivamente; siendo el primero el que posee una concordancia moderada mientras que el método Agar Rojo Congo una concordancia débil.

VII. RECOMENDACIONES

- Al ser un tema de salud pública, se recomienda tomar las siguientes medidas en los diferentes campos:
- Se recomienda usar el método en Tubo de safranina para detectar formación de biofilm en enterobacterias productoras de carbapenemasas. Los parámetros diagnósticos son mejores que el método agar Rojo Congo. Y también lleva siendo el más rápido y sencillo de ejecutar.
- Si se tiene la oportunidad de realizar el método en placa de microtitulación se recomienda usar este, ya que es la más eficiente, siendo este el método de referencia del presente trabajo.
- No se recomienda usar el método agar Rojo Congo, debido a su baja sensibilidad y gran cantidad de falsos resultados.
- Se recomienda para futuros estudios similares, ampliar población y muestra de estudio.
- Como último punto, se recomienda seguir llevando un control y vigilancia microbiológica no solo del hospital donde se llevó a cabo el estudio, sino en cualquier centro de salud donde se encuentren estas resistencias antimicrobianas.

VIII. REFERENCIAS

- Alonso, B., Pérez-Granda, M., Latorre, M., Sánchez-Carrillo, C., Bouza, E., Muñoz, P. y Guembe, M. (2021). Production of biofilm by *Staphylococcus aureus*: Association with infective endocarditis? *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)*, S0213-005X (21)00081-1. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2021.03.012>
- Antequera, A., Sáez, C., Ciudad, M., García, M., Moyano, B., Rodríguez, P., Roy, E., Aguilera, M., Alonso, E., Cárdenas, M., Castro, S., Domingo, D. y Barrios, A. (2020). Epidemiología, tratamiento y mortalidad en pacientes infectados por enterobacterias productoras de carbapenemasas: estudio retrospectivo. *Revista Chilena de Infectología*, 37 (3), pp 295-303. <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182020000300295>
- Bora, A., Sanjana, R., Jha, B., Mahaseth, S. y Pokharel, K. (2014). Incidence of metallo-beta-lactamase producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in central Nepal. *BMC research notes*, 7(1), pp 557. <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/7/557>
- Cárdenas, M., Cruz y López, O., Gándara, J., & Pérez, M. (2014). Factores de virulencia bacteriana: “la inteligencia” de las bacterias. *Elementos* 94, (2014), pp 35-43. <https://elementos.buap.mx/directus/storage/uploads/00000001145.pdf>
- Cercenado, E. (2015). Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio. *Rev Esp Quimioter*, 28(1), pp 8-11. https://seq.es/wp-content/uploads/2015/02/seq_0214-3429_28_sup1_cercenado.pdf
- Christensen, G., Simpson, W., Younger, J., Baddour, L., Barrett, F., Melton, D. y Beachey, E. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of*

- clinical microbiology*. 22(6), pp 996-1006. <http://10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>
- De Zaro Alcalá, M. M. (s.f.). *Carbapenemasas: un mecanismo de resistencia bacteriana frente las carbapenemas, antibióticos de último recurso*. [Trabajo de fin de grado, Universidad Complutense de Madrid]. Repositorio de la Universidad Complutense de Madrid. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/56486/>
- Estrada Cota, K. (2016) *Detección de formación de biofilm en cepas de Klebsiella pneumoniae aisladas de muestras clínicas, Cartagena- Colombia* [Tesis de grado, Universidad de Cartagena]. Repositorio Institucional de la Universidad de Cartagena. <https://repositorio.unicartagena.edu.co/handle/11227/3514>
- Fernández, B. A. (2019). *Bacteriemia relacionada con el catéter y neumonía asociada a ventilación mecánica: nuevas estrategias de erradicación del biofilm* [Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/56658/>
- Fernández, J., Viaña J. & Tantaleán J. (2015) *Apuntes de antibióticos de ayer y hoy*. Editorial Universitaria.
- García, A., Martínez, C., Isela, R., Tellez, R., Paredes, M., Herrera, M. & Giono, S. (2019) Resistencia a la meticilina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativa* en México. *Biomédica*. 2019(39), pp 513-23. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4131>
- Hurtado Quispe, L. y Casablanca Alvarado, J. (2019). *Asociación entre la formación de biofilm y la producción de betalactamasas de espectro extendido en Escherichia coli aislados de urocultivo en el Hospital Nacional Hipólito Unanue de enero-junio 2018*. [Tesis para optar el título profesional de licenciado en Tecnología Médica en Laboratorio clínico y Anatomía patológica, Universidad Privada Norbert Wiener]. Repositorio de la Universidad Norbert Wiener. <http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/2918>
- Lasa, I., Del Pozo, J., Penadés, J. y Leiva, J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *In*

Anales del Sistema Sanitario de Navarra, 28(2), 163-175.
<https://doi.org/10.4321/s1137-66272005000300002>

Macià, M. D., Del Pozo, J. L., Díez-Aguilar, M., & Guinea, J. (2018). Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con la formación de biopelículas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 36(6), pp 375–381.
10.1016/j.eimc.2017.04.006

March-Rosselló, G. (2017). Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(3), pp 182- 188.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.12.005>

Martínez, M., García, M., Garcia, E. y Garcia, J. (2010). Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 28(Supl 2), pp 53-64. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70031-8](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70031-8)

Nicola, F., Nievas, J. y Smayevsky, J. (2012). Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas KPC en *Klebsiella pneumoniae*. *Revista Argentina de Microbiología*, 44(4), pp 290-302.
https://www.researchgate.net/publication/262507263_Evaluacion_de_diversos_metodos_fenotipicos_para_la_deteccion_de_carbapenemasas_KPC_en_Klebsiella_pneumoniae

Ortega-Peña, S. y Hernández-Zamora, E. (2018). Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 75(2), pp 79-88. DOI: 10.24875/BMHIM.M18000012

Paraje, M. (2018). Persiste y triunfarás: células persistentes en biofilm microbianos. *Revista Argentina de microbiologia*, 50(3), pp 231–233.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.07.001>

Peña, J. y Uffo, O. (2013). Producción de biofilme en genotipos de *Staphylococcus aureus*

- aislados de mastitis bovina en Cuba. *Revista de Salud Animal*, 35(3), 189-196.
<http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RSA/article/view/334>
- Puerta-García, A. y Mateos-Rodríguez, F. (2010). *Enterobacterias*. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 10(51), 3426-3431.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3181423>
- Quispe, H., Melina, L. & Casablanca Alvarado, J. (2019). *Asociación entre la formación de biofilm y la producción de betalactamasas de espectro extendido en Escherichia coli aislados de urocultivo en el Hospital Nacional Hipólito Unanue de enero-junio 2018*. [Tesis de pregrado. Universidad Privada Norbert Wiener]. Repositorio de la Universidad Norbert Wiener.
<http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/2918>
- Ramírez-Mata, A., Fernández-Domínguez, I., Nuñez-Reza, K., Xiqui-Vázquez, M. y Baca, B. (2014). Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: quorum sensing, di-GMPc y óxido nítrico. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(3), pp 242–255. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70079-3](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70079-3)
- Reyes-Chacón, J., Villacís-Acuña, J., Chicaiza-Alomoto, S., Satán-Salazar, C., Salas-Iglesias, S., Ushiña-Cueva, L., Villavicencio-Zambrano, F., Tamayo-Trujillo, R., Rivera-Villalba, R., Esparza-Sánchez, G. y Escalante-Vanoni, S. (2017). Inactivación del carbapenémico, un método alternativo para detectar carbapenemasa tipo KPC en *Enterobacteriaceae*. *Infectio*, 21(4), pp 251-254.
<http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v21n4/0123-9392-inf-21-04-00251.pdf>
- Rocha, C., Reynolds, N. y Simons, M. (2015). Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(1), pp 139-145.
http://dev.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-

46342015000100020&lng=es&tlng=es.

Rossi, F. & Andreazzi, D. (2006). *Resistencia bacteriana: interpretando el antibiograma*. Sao Paulo, Brasil. Editorial Atheneu.

Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G. y Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 9(1), pp 522–554. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>

Sacsquispe-Contreras, R. y Bailón-Calderón, H. (2018). Identificación de genes de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias de hospitales de Perú, 2013-2017. *Revista Peruana de Medicina experimental y Salud pública*, 35(2), pp 259–264. doi: 10.17843/rpmesp.%25Y.%25v%25i.3474

Salinas, C., Escobar, F., Rodríguez, F., Campuzano de Rolón, A., Almada, P., Ortellano, J., Basualdo, W., Zárate, N., Samudio, G., Gomez, G., Castro, H., Rodriguez, M., Grau, L., Espinola, M., Velázquez, G. y Guillén, R. (2017). Evaluación de la capacidad formadora de biofilm de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina que infectaron a niños paraguayos. *Pediatría (Asunción)*, 44(3), pp 233-238. <https://doi.org/10.18004/ped.2017.diciembre.233-238>

Torregrosa Jerez, L. (2015). *Métodos de diagnóstico para la identificación de Biofilm en heridas crónicas. Revisión sistemática*. [Tesis de grado. Universidad de Alicante, España]. Repositorio de la Universidad de Alicante. https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/47746/1/METODOS_DE_DIAGNOSTICO_PARA_LA_IDENTIFICACION_DE_B_TORREGROSA_JEREZ_LAURA.pdf

Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. y Woods, G. (2007). *Koneman Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas en color* (2ª ed.). Editorial Medica Panamericana.

Zambrano, M. y Suárez L. (2006). Biofilms bacterianos: sus implicaciones en salud y enfermedad. *Universitas Odontológica*, 25(57), pp 19-25.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231220955004>

IX. ANEXOS

Anexo A: Matriz de consistencia

TEMA	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	OBJETIVOS DE ESTUDIO	VARIABLES DE ESTUDIO	INDICADORES	DESIÑO DE INVESTIGACION
<p>Título: Comparación de métodos para detección de biofilm en enterobacterias productoras de carbapenemasas, Hospital Nacional Hipólito Unanue.</p>	<p>1. Pregunta General: ¿Cuál es el método más eficiente para detectar biofilm en enterobacterias productoras de carbapenemasas en el Hospital Nacional Hipólito Unanue?</p> <p>2. Preguntas Específicas: ¿Qué enterobacterias productoras de carbapenemasas forman biofilm por el método de placa de microtitulación en el Hospital Nacional Hipólito Unanue? ¿Cómo es la producción de biofilm del método en Tubo frente al método en Placa de</p>	<p>1. Objetivo General: • Comparar el método más eficiente para detectar biofilm en enterobacterias productoras de carbapenemasas en el Hospital Nacional Hipólito Unanue.</p> <p>2. Objetivos Específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> Determinar la producción de biofilm de enterobacterias productoras de carbapenemasas por el método en Placa de microtitulación en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. Establecer la producción de biofilm de enterobacterias productoras de carbapenemasas por el método en Tubo frente al método en Placa de Microtitulación en el Hospital Nacional 	<p>Variables: Enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPCs). Formación de biofilm por método en tubo en EPCs en HNHU. Formación de biofilm por método en agar rojo Congo en EPCs en HNHU. Formación de biofilm por método en placa de microtitulación en EPCs en HNHU.</p>	<p>Presencia de carbapenemasas por pruebas fenotípicas. Formación de biofilm mediante el método en tubo. Formación de biofilm mediante el método en agar rojo Congo. Formación de biofilm mediante el método en placa de microtitulación.</p>	<p>Nivel de estudio: El tipo de investigación fue de enfoque cuantitativo. Por el nivel de investigación fue descriptiva. Por el número de mediciones fue transversal. Por el tiempo de ocurrencia fue prospectivo.</p> <p>Diseño: No Experimental.</p> <p>Población: La población estuvo formada por 264 aislamientos de especies de enterobacterias a partir de muestras clínicas que presentaron resistencia a carbapenémicos y producción de carbapenemasas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional</p>

	<p>Microtitulación en el Hospital Nacional Hipólito Unanue?</p> <p>¿Cómo es la producción de biofilm del método en agar rojo Congo frente al método en Placa de Microtitulación en el Hospital Nacional Hipólito Unanue?</p> <p>¿Qué concordancia tiene el método en Tubo y agar rojo Congo frente al método en Placa de Microtitulación para la formación de biofilm en enterobacterias productoras de carbapenemasas en el Hospital Nacional Hipólito Unanue?</p>	<p>Hipólito Unanue.</p> <ul style="list-style-type: none"> Examinar la producción de biofilm de enterobacterias productoras de carbapenemasas por el método en agar rojo Congo frente al método en Placa de Microtitulación en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. Evaluar la concordancia del método en Tubo y agar Rojo Congo frente al método en placa de microtitulación para la formación de biofilm en enterobacterias productoras de carbapenemasas en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. 			<p>Hipólito Unanue desde 2016 hasta 2019.</p> <p>Muestra:</p> <p>Se trabajó con una muestra de 70 cepas de enterobacterias que frente al disco de meropenem presentaron halo de inhibición menor a 22 mm, y fueron aisladas desde el año 2016 hasta 2019. Las cepas cumplieron con los criterios de inclusión.</p>
--	---	---	--	--	---

Anexo B:**Ficha de datos**

1. CÓDIGO:
2. FECHA DE MUESTRA: .../.../...
3. SEXO: () Masculino () Femenino
4. EDAD:.....
5. TIPO DE MUESTRA:
6. PROCEDENCIA:
7. AISLAMIENTO BACTERIANO:
8. PRODUCCIÓN DE CARBAPENEMASAS: () Positivo () Negativo
9. FORMACIÓN DE BIOFILM: () Positivo () Negativo
 - Por método en tubo:
 - Por método en agar Rojo Congo:
 - Por método en placa de poliestireno:

Anexo C:**Interpretación de la producción de Biofilm por el método de Placa de microtitulación.
(PCT)**

Valor promedio de la Densidad Óptica	Producción de Biofilm
$\leq \text{DOc} / \text{DOc} < o \leq 2x \text{DOc}$	Negativo / Débil
$2x \text{DOc} < o \leq 4x \text{DOc}$	Moderado
$> 4x \text{DOc}$	Fuerte

(Cut-off) Valor de corte de la Densidad Óptica (DOc) = Promedio DO de controles negativos + 3x desviación estándar del control negativo

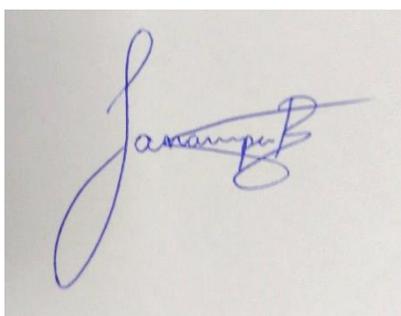
Anexo D:**Escala de valoración del índice Kappa (k). (Landis y Koch)**

Kappa (k)	Grado de acuerdo
< 0,00	No concordancia
0,00 - 0,20	Concordancia muy débil
0,21 - 0,40	Concordancia débil
0,41 - 0,60	Concordancia moderada
0,61 - 0,80	Concordancia buena
0,81 - 1,00	Concordancia muy buena

Anexo E:**DECLARACION JURADA**

Yo, Cristian Marcos Janampa Bautista, identificado con número de DNI 73528855, y con domicilio en Urbanización Las Praderas de Santa Anita 3ra Etapa Mz P Lote 9, DECLARO BAJO JURAMENTO, que la recolección de los datos se dio en el Servicio de Microbiología del Hospital Nacional Hipólito Unanue y la veracidad de los datos consignada en la TESIS denominada **“COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA DETECCIÓN DE BIOFILM EN ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS, HOSPITAL NACIONAL HIPÓLITO UNANUE”** es información original.

De identificarse algún tipo de falsificación, asumo las consecuencias y sanciones que de mi accionar se deriven.



Firma

Nombres y Apellidos: Cristian Marcos Janampa Bautista

DNI: 73528855

Anexo F: Validación de Juicio de Expertos del instrumento de investigación

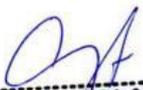
VALIDACION DE JUICIO DE EXPERTOS DEL INSTRUMENTO DE INVESTIGACION

DATOS GENERALES:

1. APELLIDOS Y NOMBRES DEL EXPERTO: CHAMPI MERINO ROLY GIOVANNI
2. INSTITUCION DONDE LABORA/ CARGO: Hospital Nacional Hipólito Unzué
3. TITULO PROFESIONAL: Lic. TECNÓLOGO MÉDICO
4. GRADO ACADEMICO: MAESTRÍA
5. TITULO DEL PROYECTO: "COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA DETECCIÓN DE BIOFILM EN ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS, HOSPITAL NACIONAL HIPÓLITO UNANUE".

ASPECTOS DE VALIDACION:

INDICADORES	CRITERIOS	DEFICIENTE (0-19)	BAJA (20-39)	REGULAR (40-59)	BUENA (60-79)	MUY BUENA (80-100)
1. Claridad de la redacción	Esta formulado con lenguaje apropiado y entendible.					X
2. Objetividad	Esta expresado en conductas observables y medibles hacia los objetivos de la investigación.				X	
3. Pertinencia	Es útil y adecuado, los items están relacionadas al tema de investigación.					X
4. Organización	Hay una secuencia lógica en las preguntas.					X
5. Suficiencia	El número de items es adecuado, y tiene calidad en la transmisión de estas.				X	
6. Intencionalidad	El conjunto de items del cuestionario cumple en registrar, estructurar las funciones, finalidad, organización, tipo de preguntas, características, utilizando las estrategias científicas para alcanzar las metas del estudio de investigación.					X
7. Consistencia	Existe solidez y coherencia entre sus preguntas en función al avance de las ciencias de la salud en aspectos teóricos científicos.					X
8. Metodología	Los items responden a la temática de estudio que está en relación con el proceso del método científico.					X
9. Inducción a la respuesta (calidad)	Entre la comprensión del ítem y la expresión de la respuesta.					X
10. Lenguaje	Esta acorde al nivel del tema de investigación.					X

OPINION DE APLICABILIDAD:a) Deficiente ___ b) Baja ___ c) Regular ___ d) Buena ___ e) Muy buena PROMEDIO DE VALORACION: Muy buena**OBSERVACIONES:**Se sugiere aplicar el instrumento indicado

Lic. Champi Maribó Rokky Giovanni
Especialista en
Microbiología
C.T.M.P. 3818 R.N.E. 00365

FIRMA

VALIDACION DE JUICIO DE EXPERTOS DEL INSTRUMENTO DE INVESTIGACION

DATOS GENERALES:

1. APELLIDOS Y NOMBRES DEL EXPERTO: Silva Zalada Maria
2. INSTITUCION DONDE LABORA/ CARGO: HNHU / Tecnóloga Médica
3. TITULO PROFESIONAL: Licenciada en Tecnología Médica
4. GRADO ACADEMICO: Licenciada
5. TITULO DEL PROYECTO: "COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA DETECCIÓN DE BIOFILM EN ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS, HOSPITAL NACIONAL HIPÓLITO UNANUE".

ASPECTOS DE VALIDACION:

INDICADORES	CRITERIOS	DEFICIENTE (0-19)	BAJA (20-39)	REGULAR (40-59)	BUENA (60-79)	MUY BUENA (80-100)
1. Claridad de la redacción	Esta formulado con lenguaje apropiado y entendible.					85
2. Objetividad	Esta expresado en conductas observables y medibles hacia los objetivos de la investigación.					80
3. Pertinencia	Es útil y adecuado, los items están relacionadas al tema de investigación.				75	
4. Organización	Hay una secuencia lógica en las preguntas.					80
5. Suficiencia	El número de items es adecuado, y tiene calidad en la transmisión de estas.					90
6. Intencionalidad	El conjunto de items del cuestionario cumple en registrar, estructurar las funciones, finalidad, organización, tipo de preguntas, características, utilizando las estrategias científicas para alcanzar las metas del estudio de investigación.				75	
7. Consistencia	Existe solidez y coherencia entre sus preguntas en función al avance de las ciencias de la salud en aspectos teóricos científicos.					85
8. Metodología	Los items responden a la temática de estudio que está en relación con el proceso del método científico.					80
9. Inducción a la respuesta (calidad)	Entre la comprensión del ítem y la expresión de la respuesta.					85
10. Lenguaje	Esta acorde al nivel del tema de investigación.					80

OPINION DE APLICABILIDAD:a) Deficiente ___ b) Baja ___ c) Regular ___ d) Buena ___ e) Muy buena **PROMEDIO DE VALORACION:** Muy buena**OBSERVACIONES:**

MINISTERIO DE SALUD
Hospital Nacional de Niños Unime
Lic. MARIA B. SILVA ZELADA
Tecnólogo Médico
C.I.M.P. 9586

FIRMA

VALIDACION DE JUICIO DE EXPERTOS DEL INSTRUMENTO DE INVESTIGACION

DATOS GENERALES:

1. APELLIDOS Y NOMBRES DEL EXPERTO: HURTADO VILCOTOMA JOHNNY
2. INSTITUCION DONDE LABORA/ CARGO: HOSPITAL NACIONAL HIPOLITO UNANUE
3. TITULO PROFESIONAL: LIC. TECNOLOGO MEDICO
4. GRADO ACADEMICO: LICENCIATURA
5. TITULO DEL PROYECTO: "COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA DETECCIÓN DE BIOFILM EN ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS, HOSPITAL NACIONAL HIPÓLITO UNANUE".

ASPECTOS DE VALIDACION:

INDICADORES	CRITERIOS	DEFICIENTE (0-19)	BAJA (20-39)	REGULAR (40-59)	BUENA (60-79)	MUY BUENA (80-100)
1. Claridad de la redacción	Esta formulado con lenguaje apropiado y entendible.					X
2. Objetividad	Esta expresado en conductas observables y medibles hacia los objetivos de la investigación.					X
3. Pertinencia	Es útil y adecuado, los items están relacionadas al tema de investigación.					X
4. Organización	Hay una secuencia lógica en las preguntas.				X	
5. Suficiencia	El número de items es adecuado, y tiene calidad en la transmisión de estas.					X
6. Intencionalidad	El conjunto de items del cuestionario cumple en registrar, estructurar las funciones, finalidad, organización, tipo de preguntas, características, utilizando las estrategias científicas para alcanzar las metas del estudio de investigación.					X
7. Consistencia	Existe solidez y coherencia entre sus preguntas en función al avance de las ciencias de la salud en aspectos teóricos científicos.					X
8. Metodología	Los items responden a la temática de estudio que está en relación con el proceso del método científico.					X
9. Inducción a la respuesta (calidad)	Entre la comprensión del ítem y la expresión de la respuesta.					X
10. Lenguaje	Esta acorde al nivel del tema de investigación.					X

OPINION DE APLICABILIDAD:

a) Deficiente ___ b) Baja ___ c) Regular ___ d) Buena ___ e) Muy buena

PROMEDIO DE VALORACION: Muy buena

OBSERVACIONES:


JUAN PERAZA
FARMACIA MEDICA S.A.S. 2004
LABORATORIO S.A.S. - MANIZALES