



**Universidad
Norbert Wiener**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA
MÉDICA**

“RELACIÓN ENTRE LA FORMACIÓN DE BIOFILM Y RESISTENCIA
A OXACILINA EN *Staphylococcus aureus* AISLADOS DE
HEMOCULTIVOS. HOSPITAL NACIONAL HIPOLITO UNANUE,
JULIO 2016 – JUNIO 2018”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO
EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN LABORATORIO CLÍNICO Y
ANATOMÍA PATOLÓGICA.

Presentado por:

Bachiller TM ZAVALA CASTILLO, ROSA IRIS
Bachiller TM YALLE COTRINA, OLIVER FRANCISCO

ASESOR:

LIC. TM. CHAMPI MERINO, ROKY GOVANNI

LIMA – PERÚ

2020



**Universidad
Norbert Wiener**

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, por darme vida, salud y las fuerzas necesarias para culminar mi carrera y continuar luchando día tras día, para el logro de mis metas.

A mi hija Pía Valentina por ser mi verdadero motor y motivo de vida.

A mis padres Eduardo y Elena, a mis hermanos, a quienes amo mucho, por estar siempre a mi lado, apoyándome en todo momento, para lograr uno de mis objetivos y ser una profesional de éxito.

Zavala Castillo Rosa Iris

DEDICATORIA

*Dedico esta tesis en primer lugar a Dios
por darme salud, vida y tres personitas
“mis hijos” por los cuales he luchado y
lucharé ya que son quienes inspiraron mi
espíritu para la conclusión de esta tesis.*

*A mis padres quienes me dieron vida,
educación, apoyo y consejos.*

*A mi familia quienes sin su ayuda nunca
hubiera podido culminar y avanzar un
escalón más.*

Yalle Cotrina Oliver Francisco

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por darnos vida, salud y las fuerzas necesarias para culminar con éxito nuestra carrera profesional y la tesis.

A nuestros padres, hermanos, por su inmenso amor y por su apoyo constante e incondicional en todo momento.

A nuestro asesor Lic. Roky Giovanni Champi Merino, por su apoyo, asesoramiento, valioso tiempo y darnos la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia.

Autoras

Asesor de tesis

Lic. Champi Merino, Roky Govanni.

Tecnólogo Médico

JURADOS

Presidente

Secretario (a)

Vocal

INDICE

| | Pagina |
|--|-----------|
| CAPITULO I. EL PROBLEMA..... | 14 |
| 1.1 Planteamiento del problema | 15 |
| 1.2 Formulación del problema | 17 |
| 1.3 Justificación | 18 |
| 1.4 Objetivos | 19 |
| 1.4.1. Objetivos Generales | 19 |
| 1.4.2. Objetivos Específicos | 19 |
| CAPITULO II. MARCO TEORICO..... | 20 |
| 2.1 Antecedentes | 21 |
| 2.2 Base teórica | 24 |
| 2.3 Hipótesis | 37 |
| 2.4 Variables e indicadores | 37 |
| 2.5 Definición operacional de términos | 37 |
| CAPITULO III. DISEÑO METODOLOGICO..... | 38 |
| 3.1 Tipo de investigación | 39 |
| 3.2 Ámbito de investigación | 39 |
| 3.3 Población y muestra | 40 |
| 3.3.1 Población | 40 |
| 3.3.2 Muestra | 40 |
| 3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos | 41 |
| 3.5 Plan procesamiento de datos y análisis estadístico | 44 |
| 3.6 Aspectos éticos | 44 |
| CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSION..... | 46 |
| 4.1 Resultados | 46 |
| 4.2 Discusión | 51 |
| CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 53 |
| 5.2 Conclusiones | 54 |
| 5.3 Recomendaciones | 55 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 56 |
| ANEXOS..... | 60 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|--|-----------|
| Gráfico 1. Formación de biofilm en <i>Staphylococcus aureus</i> aislada de hemocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue. Julio 2016 – junio 2018 | 48 |
|--|-----------|

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resistencia a los antimicrobianos en *Staphylococcus aureus* aislado de hemocultivos. Hospital Nacional Hipolito Unanue. Julio 2016- junio 2018. **47**

Tabla 2. Distribución de la formación de biofilm en *Staphylococcus aureus* aislado de hemocultivos de pacientes hospitalizados. Hospital Nacional Hipolito Unanue. Julio 2016 - Junio 2018 **.49**

Tabla 3. Relación entre la formación de biofilm y resistencia a oxacilina en *Staphylococcus aureus* aislados de hemocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, Julio 2016 – junio 2018. **50**

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. El ciclo del biofilm. Un proceso de cuatro pasos.

33

RESUMEN

Objetivo: Determinar la relación entre la formación de biofilm y resistencia a oxacilina en *Staphylococcus aureus* aislados de hemocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, julio 2016 – junio 2018.

Materiales y métodos: Estudio cuantitativo, observacional, correlacional. Para determinar la frecuencia de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina se realizó el antibiograma por el método de disco de difusión de Kirby Bauer, y para demostrar la capacidad de formación de biofilm se empleó el método en Placa de cultivo de tejido (PCT), las variables fueron descritas con frecuencias absolutas y porcentuales, la relación entre las variables fue determinada mediante el estadístico Chi cuadrado.

Resultado: A partir de 71 cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de hemocultivos, 63.4% presentaron resistencia a oxacilina y el 77.5% fueron formadores de biofilm; siendo la distribución con un 22.5% de no formadores, 9.9% débil, 18.3% moderado y 49.3% fuerte formadores de biofilm. Se determinó la relación entre las variables resistencia a oxacilina y formación de biofilm.

Conclusión: No existe relación estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre la formación de biofilm y la resistencia a oxacilina en *Staphylococcus aureus* aislados de hemocultivos. La prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina fue de 63.4% en el Hospital Nacional Hipólito Unanue, julio 2016 – junio 2018.

Palabras claves: *Biofilm, resistencia a oxacilina, Staphylococcus aureus, hemocultivos.*

Summary

Objective: To determine the relationship between biofilm formation and oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated in blood cultures at the National Hospital Hipólito Unanue, July 2016 - June 2018.

Materials and methods: Quantitative, observational, correlational study. To determine the frequency of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*, the antibiogram was performed by Kirby Bauer's diffusion disc method, and to demonstrate the biofilm formation capacity the tissue culture plate (PCT) method was used, the variables were described using absolute and percentage frequencies, the relationship between the variables was determined by the Chi squared statistic.

Results: From 71 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood cultures, 63.4% had resistance to oxacillin and 77.5% were biofilm formators; being the distribution with 22.5% non-trainers, 9.9% weak, 18.3% moderate and 49.3% strong biofilm formators. The relationship between oxacillin resistance and biofilm formation variables was determined.

Conclusion: There is no statistically significant relationship ($p > 0.05$) between biofilm formation and oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from blood cultures. The prevalence of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* was 63.4% at the National Hospital Hipólito Unanue, July 2016 - June 2018.

Keywords: Biofilm, resistance to oxacillin, *Staphylococcus aureus*, blood cultures.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

I. EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

Las bacterias están disponibles en la naturaleza como estructuras planctónicas y formando biopelículas. La secuencia típica de formación de biopelícula se ha considerado de esta manera: fijación primaria, adhesión celular, proliferación de biofilm, maduración y liberación de células planctónicas de la biopelícula.⁽¹⁾

Muchas especies bacterianas patógenas distribuidas en el medio ambiente tienen capacidad de formar una estructura multicelular compleja, conocida como biofilm. En las superficies *Staphylococcus aureus*, patógeno bien conocido que puede vivir en una amplia variedad de entornos, y tiene una capacidad inherente para formar biofilm en superficies bióticas y abióticas. Las estructuras de estas comunidades microbianas van desde la monocapa de células individuales dispersas hasta la estructura multicapa de moco viscoso de dimensiones macroscópicas. Además, la composición química dentro del biofilm es altamente dinámica; promueve la formación de gradiente de soluto y el intercambio de nutrientes.⁽²⁾

Una vez que la población bacteriana se establece en forma de biofilm en un lugar adecuado, se requiere un mecanismo para evitar la invasión de competidores potenciales para la persistencia a largo plazo. Como competidores, las bacterias tienden a apartarse del consorcio denso y sin recursos para colonizar nuevas superficies con más recurso. En



Staphylococcus, moléculas inhibitoras específicas, median en la dispersión del biofilm, sin embargo, el mecanismo de desprendimiento exacto aún no se ha resuelto. ⁽³⁾ El mecanismo de dispersión de biofilm descrito implica cambios que se regulan en respuesta a una señal ambiental por la cual la vía de transducción de señales afecta la inhibición de los exopolisacáridos. ⁽³⁾

Una de las principales causas de sepsis e infecciones del torrente sanguíneo, pulmonar, de la piel y de los tejidos blandos en todo el mundo es *Staphylococcus aureus*, tanto en entornos comunitarios como nosocomiales. Encuestas internacionales informan que evaluaron la prevalencia y los patrones de susceptibilidad de la infección por *S. aureus* en diferentes regiones del mundo y han revelado altas tasas de resistencia a la meticilina y a múltiples drogas, particularmente en Sudáfrica, y América Latina.

Sin embargo, datos publicados de América Latina puede no ser representativo de la región, porque pocos hospitales fueron incluidos en cada país participante y porque varios países no fueron incluidos en estos estudios. Por ejemplo, Perú, un país con unos 30 millones de habitantes, y un tercio de su población concentrada en Lima, presenta pocos patrones de susceptibilidad de los principales patógenos bacterianos para el sistema de vigilancia internacional. En base a ello la presente investigación trata de ampliar el conocimiento sobre la relación que existe entre la formación de



biofilm y la resistencia a la oxacilina en aislamientos bacterianos procedentes de hemocultivos.

1.2 Formulación del problema de investigación

¿Qué relación existe entre la formación de biofilm y resistencia a oxacilina en *Staphylococcus aureus* aislados de hemocultivos? ¿Hospital Nacional Hipólito Unanue, Julio 2016 – junio 2018?

1.3 Justificación

La investigación presenta justificación teórica porque se tuvo en cuenta antecedentes de estudios y bases teóricas seleccionadas sobre las variables de la formación de biofilm, y sobre la resistencia al antimicrobiano oxacilina, en aislamientos de *Staphylococcus* recuperados a partir de hemocultivos.

Se encontraron estudios potenciales relaciones con la presencia de factores de virulencia. A nivel mundial y nacional el aumento de la resistencia bacteriana, y el aumento de infecciones, en el ámbito comunitario y en instituciones hospitalarias hace indispensable el uso de herramientas que permitan detectar la resistencia antimicrobiana, así como su relación con la presencia de biofilm a fin de mejorar el conocimiento sobre este problema.

(4)

Así mismo la investigación es importante porque logra el aporte al conocimiento sobre la relación que existe en la formación de biofilm y la resistencia a los antimicrobianos como la oxacilina en hemocultivos, situando la base para futuras investigaciones sobre la formación de biofilm.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

- Determinar la relación entre la formación de biofilm y resistencia a oxacilina en *Staphylococcus aureus* aislados de hemocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, Julio 2016 – junio 2018

1.4.2 Objetivos Específicos

- Determinar la frecuencia de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina aislados de hemocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, Julio 2016 – junio 2018.
- Determinar la frecuencia de la formación de biofilm de *Staphylococcus aureus* aislados de hemocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, julio 2016 – junio 2018.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Antecedentes Internacionales

Cordeiroa Erlon realizó un estudio en Brasil en el año 2015, su objetivo fue observar la formación de biopelículas por eyección progresiva de células extracelulares y sustancias poliméricas ricas en polisacáridos y proteínas, observando la adhesión de bacterias en la superficie sólida. En base a sus resultados se muestra que el polímero sintetizado se caracteriza por la dispersión de polímeros y alto nivel de rugosidad. ⁽⁴⁾ concluyendo que la alta conductividad y la superficie disponible mejorada de soporte polimérico para la deposición de biofilm son importantes parámetros para detectar formación de biofilm de *S. aureus*. La alta conductividad asociada a la porosidad de polipirrol contribuye con una fuerte interacción y adsorción de biofilm en superficies. ⁽⁴⁾

Gil Marielsa en su investigación en Venezuela en el año 2015, con el objetivo de investigar la capacidad de formación de biofilm en aislados clínicos de *S. aureus* según la sensibilidad antimicrobiana y la procedencia clínica. Encontró que el 92% de la población bacteriana fue capaz de formar biofilm, y que las cepas sensibles y resistentes mostraron indistintamente un grado de formación entre débil y moderado, y las de procedencia infecciosa mostraron ser moderadamente formadoras 28% y las de portadores asintomáticos expresaron una tendencia débilmente formadora 27%. Encontrando que no existe asociación entre sensibilidad

antimicrobiana y procedencia clínica con la capacidad de formación de biopelículas. Sin embargo, si existe asociación significativa entre el grado de formación con respecto a la procedencia clínica.⁽⁵⁾

Antecedentes Nacionales

López Robinen (2016) con el objetivo de investigar la resistencia antimicrobiana en *Staphylococcus aureus* recuperado de quesos procedentes de varios distritos de Lima, con contaminación por diversos factores. Encontrando muestras contaminadas con bacterias, con recuentos bacterianos superiores a 10^5 unidades formadoras de colonias por gramo. Se realizó la sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión de Kirby-Bauer, siendo 31 cepas de *S. aureus* que mostraron resistencia a penicilina (96,8%), oxacilina (77,4%), gentamicina (3,2%), ciprofloxacino (3,2%) y sensibilidad a vancomicina en todos los aislamientos (100%).⁽⁷⁾

2.2 Bases teóricas

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

2.2.1.1 Características microbiológicas y patogenia

Staphylococcus aureus es una bacteria caracterizada morfológicamente en la coloración gram como cocos gram positivos no móviles, que puede disponerse agrupado en forma de racimos. Presenta metabolismo anaerobio facultativo, desarrollándose bien en condiciones aerobias; es parte de la microbiota normal. Siendo las fosas nasales su principal reservorio. La pared celular presenta rigidez y estabilidad, siendo el peptidoglicano el más importante componente, encontrándose relacionadas a los ácidos teicoicos. ⁽¹⁰⁾

Presentan 32 especies las bacterias del género *Staphylococcus*, siendo la mayoría de especies recuperadas en humanos. Se atribuye la patogenicidad a factores predisponentes en el huésped como la inmunosupresión. La principal característica bioquímica que diferencia a la especie *Staphylococcus aureus* de las otras especies de *Staphylococcus* es la producción de la enzima coagulasa, adicionalmente resiste el calor y la desecación, creciendo en altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl 7,5%). Manifiestan beta hemólisis en el Agar sangre, además es importante para su identificación la fermentación de azúcares, como el manitol para producir ácido láctico ⁽¹⁰⁾.

Staphylococcus aureus se puede desarrollar adecuadamente en diversos medios de cultivo, como agar sangre, mostrando crecimiento de colonias convexas que pueden medir de 1 a 3 milímetros, además en este medio

muchas cepas producen hemólisis a partir de 24 a 36 horas de incubación. Asimismo, pueden producir un característico pigmento amarillo dorado por la presencia de carotenoides. ⁽¹⁰⁾

2.2.1.2 Factores de Virulencia de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus puede sobrevivir en ambientes adversos, sobre todo por la acción de algunos factores de virulencia. Siendo clasificados en:

- a) **Composición de la pared celular:** peptidoglican (activación del complemento), ácidos teicoicos, proteína A (acción antifagocitaria) y cápsula (adherencia).⁽¹¹⁾
- b) **Enzimas:** peroxidasa o catalasa (catalizadora del peróxido de hidrógeno), coagulasa (formación de abscesos), fibrinolisin (lisis del coágulo), hialuronidasa (invasión hística), betalactamasas (inactivación de betaláctamicos) y lipasas (colonización).⁽¹¹⁾
- c) **Toxinas:** hemolisinas (lisis de membrana en hematíes), leucocidinas (altera permeabilidad celular), toxina exfoliativa (epidermólisis), toxina TSST (shock toxico) y entero toxina (intoxicación alimentaria).⁽¹¹⁾

2.2.1.3 Patología del *Staphylococcus aureus*

Este agente ocasiona graves complicaciones en los pacientes del ámbito hospitalario como la resistencia antimicrobiana, por tener una respuesta adaptativa rápida a la presión selectiva de agentes antimicrobianos como la oxacilina, contribuyendo con su diseminación. La adquisición de determinantes de resistencia siempre ha determinado mayores niveles de patogenicidad. ⁽¹²⁾

2.2.1.4 Pruebas de identificación para *Staphylococcus aureus*

Se utilizan para la identificación de la especie *Staphylococcus aureus*, pruebas convencionales de microbiología como la Tinción Gram, la prueba de catalasa, desarrollo en medios hipertónicos con sal, fermentación del manitol, así como la prueba de la Coagulasa.

2.2.1.5 Resistencia Antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*

Una bacteria se considera resistente frente a un agente antimicrobiano cuando la concentración del antibiótico en el sitio de la infección no es capaz de destruir o inhibir el desarrollo de la población bacteriana. Presentando la resistencia antimicrobiana aspectos farmacológicos y clínicos, que varían según el antimicrobiano, el agente bacteriano involucrado. El mecanismo de resistencia se asocia frecuentemente con la adquisición de elementos genéticos móviles que pueden portar genes de resistencia, los genes logran codificar proteínas que aumentan la resistencia tanto para un solo antimicrobiano como para agentes pertenecientes a una misma clase o familia. (16, 17)

***Staphylococcus aureus* Resistente a Oxacilina**

Los aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a la oxacilina, se denominan como de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM), ya que inicialmente las pruebas para identificar la resistencia se realizaban con este fármaco. Entre las principales causas de infecciones adquiridas en

hospitales se encuentran las infecciones por SARM. Notándose que en los últimos años es una causa cada vez más frecuente de enfermedades en la comunidad. ⁽¹⁶⁾

Este agente es causa frecuente de infecciones adquiridas en hospitales y surgió como causa de enfermedades de pacientes en la comunidad. La mayoría de cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes son resistentes a varias clases de agentes antimicrobianos, como macrólidos, lincosamidas, aminoglicosidos, cloranfenicol, tetraciclinas y fluoroquinolonas. Asimismo por el mecanismo de resistencia implicado, las cepas meticilino resistentes deben considerarse resistentes a toda la familia de los agentes betalactámicos. ⁽¹⁷⁾

Mecanismos de Resistencia a Betalactámicos

En los aislamientos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM), se han referido tres mecanismos de resistencia en los agentes betalactámicos: Modificación de las proteínas fijadoras de penicilina, Inactivación por enzimas betalactamasas y Fenómeno de tolerancia.

Estos mecanismos pueden ser de naturaleza cromosómica o plasmídica. Siendo la resistencia cromosómica la que surge por mutación, mientras que los plásmidos y otros elementos móviles pueden ser transferidos de manera horizontal o vertical entre bacterias. ⁽¹⁸⁾

a) Modificación de Proteínas Fijadoras de Penicilina (PBP2a)

Las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP) son enzimas que tienen como función el desarrollo de la pared celular bacteriana, y están en la membrana bacteriana. Los agentes betalactámicos se unen mediante enlaces covalentes a las PBP para ejercer su acción bactericida; afectando la síntesis de peptidoglicano de la pared celular bacteriana. Las enzimas PBP en cada especie bacteriana varían en tamaño, número y afinidad frente a los agentes antimicrobianos. La modificación de las PBP en su estructura determina en la pérdida de afinidad, disminuyendo la actividad bactericida de los agentes betalactámicos. Observándose este mecanismo principalmente en gram positivos como *Staphylococcus aureus* ⁽¹⁹⁾.

Staphylococcus aureus metilino resistente (SARM) produce una PBP modificada por mutación, denominada PBP2a, la que presenta menor afinidad por metilino y por el resto de agentes betalactámicos. La PBP2a para evitar la muerte del microorganismo realiza la síntesis de la pared bacteriana mientras las otras proteínas fijadoras de penicilinas permanecen saturadas por el agente antimicrobiano. Esta resistencia se codifica cromosómicamente en la región denominada “*mec*”, que existe en las cepas resistentes, y está constituida por el gen “*mec A*” que es responsable de la síntesis de la PBP2a y marcador genético de la resistencia; y asimismo por el gen “*mec R*” o represor. ⁽²⁰⁾

b) Inactivación por betalactamasas excretadas al medio extracelular

Las enzimas betalactamasas penicilinasas son secretadas en gran cantidad al medio externo de la bacteria. La producción de betalactamasas está regulada por un gen cromosómico o transferido por otros elementos genéticos móviles. La síntesis de estas enzimas suele ser inducible, y es dependiente de la mayor o menor presencia de agentes betalactámicos. Las penicilinasas inactivan a la penicilina mediante unión e hidrólisis del anillo betalactámico, inactivando el agente antimicrobiano y perdiendo la capacidad de unirse a las PBP. Así, el grado de resistencia correlaciona con la concentración, afinidad y propiedades hidrolíticas de los diferentes betalactámicos.⁽²¹⁾

2.2.2 Biofilm Bacteriano

Se entiende por biofilm a una estructura de bacterias embebidas en una matriz propia de polímero los cuales están compuestos en su mayoría por polisacáridos, proteínas y ADN. Biofilm bacterianos causan infecciones crónicas ya que muestran mayor tolerancia a los antibióticos, desinfectantes químicos y resisten la fagocitosis del sistema inmune.⁽²²⁾

Característicamente, la gradiente de nutrientes y oxígeno desde la parte superior hacia el fondo de los biofilm se asocian con disminución de la actividad metabólica bacteriana e incremento del tiempo de crecimiento bacteriano, las bacterias latentes son responsables de la tolerancia a los antibióticos.⁽²²⁾

El crecimiento del biofilm está asociado nivel incrementado de mutaciones y con mecanismos regulados por *quórum sensing*. Mecanismos de resistencia

convencionales en la bacteria como beta-lactamasa cromosómica, bombas de eflujo y mutaciones de las moléculas blanco de antibióticos también contribuyen a la supervivencia de los biofilm. ⁽²²⁾

Suele prevenirse mediante la profilaxis o terapia antibiótica agresiva temprana y pueden ser tratados por terapia supresora crónica. Una estrategia prometedora puede ser el uso de enzimas para disolver la matriz del biofilm (DNasa, alginatoliasa, etc.) y los inhibidores de quórum sensing, que incrementarían la susceptibilidad del biofilm a los antibióticos. ⁽²²⁾

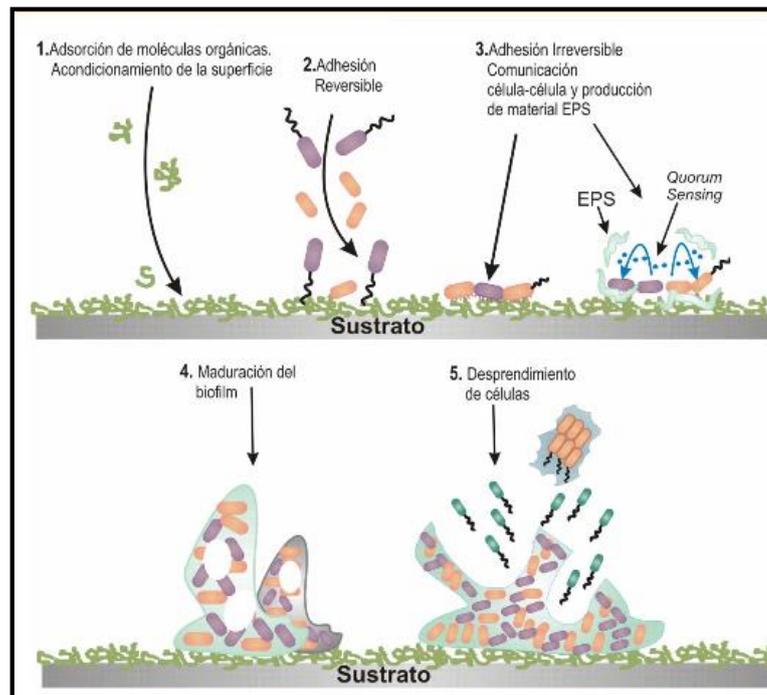


Figura 1. El ciclo del biofilm. Un proceso de cuatro pasos.⁽³⁹⁾

- 1) Adsorción inicial de las células a la superficie del biomaterial.
- 2) Acumulación en múltiples laminas.
- 3) Maduración del Biofilm: producción de exopolisacarido (PNAG), proteínas (Bap, Aap, SasG, SasCyFnbpB), eDNA

- 4) Desprendimiento de las células del interior del biofilm a un estado plantónico: señales ambientales, signos de transducción y efectores.

2.2.2.1 Fases de desarrollo del Biofilm

a) Acondicionamiento de la superficie. Las bacterias se unen con la materia orgánica del agua, depositándose en la interfase agua / superficie cambiando sus propiedades químicas y físicas, mejorando la fijación bacteriana para formar *biofilm*.⁽¹¹⁾

b) Adherencia bacteriana. es reversible, siendo la adhesión sobre una superficie o sustrato. Activa: mediado por flagelos, fimbrias tipo I y IV, adhesinas, cápsulas y cargas de superficie, las bacterias alcanzan la superficie y equilibran repulsiones hidrofóbicas. Pasiva: Las bacterias por medio de la gravedad, difusión y dinámica de fluidos se adhieren a cualquier superficie, siendo útil la motilidad.⁽²³⁾

Adherencia irreversible. A través de apéndices y la producción de exopolisacárido, así la bacteria asegura la adhesión formando un complejo con el material superficial y receptores, con ligandos específicos.⁽²³⁾

c) Maduración. Matriz extracelular. A continuación, la bacteria se adhiere a la superficie y empieza a dividirse, produciendo polímeros que son excretados al exterior para mantener la unión entre células, y la superficie. Un exopolisacárido se excreta desde la pared celular y se une con grupos de polisacáridos neutros o portadores de cargas eléctricas, aumentando la

adherencia, la capacidad de actuar como un sistema de intercambio iónico para atrapar y agrupar nutrientes. ⁽²³⁾

- d) **Cooperación entre especies.** En el exopolisacárido se encuentran diferentes especies del *biofilm*, atrapadas en la matriz extracelular por captación física o atracción electrostática, estas diferentes especies viven en un nicho mínimo especializado. Si una especie crea residuos tóxicos, otra los eliminara eficazmente, regulando los recursos de todos los habitantes del *biofilm*. ⁽²³⁾
- e) **Crecimiento y dispersión.** Las divisiones continuas de las bacterias liberan residuos y nutrientes que podrán utilizarse para organizar nuevas superficies y para alimentar a otras células. ⁽²³⁾

2.2.2.2 Métodos para evaluar la formación de biofilm

Las bacterias organizadas formando el biofilm presentan diferencias específicas tanto fenotípicas, bioquímicas y morfológicas distintas a su forma planctónica, que les permiten la supervivencia en el biofilm. Adaptándose a la hostilidad del entorno y la cantidad de nutrientes del medio con patrones estructurales en las comunidades microbianas. El sistema de organización complejo explica lo importante del conocimiento adecuado de su estructura y los mecanismos que permiten organizarse a modo de biofilm. Siendo muy importante determinar qué especies bacterianas son capaces de formar biofilm y encontrar métodos adecuados que permitan la cuantificación de la formación de biofilm en las distintas especies bacterianas. ⁽²⁴⁾



Para demostrar la formación de biofilm existen muchos métodos, algunos se fundamentan en colorear el biofilm formado en un tubo de cultivo o en el fondo de una placa de micro titulación para demostrar su presencia, aportando información cualitativa del biofilm (su existencia o ausencia) pero no permite establecer relaciones entre la presencia y la capacidad del microorganismo de producir biofilm. Por lo que es preciso usar un método de cuantificación de formación de biofilm aplicable al biofilm producido por cualquier microorganismo y reproducible en cualquier caso, lográndose al medir la densidad óptica del biofilm, que varia por las características intrínsecas del biofilm ofreciendo información sobre la estructura en relación al tipo de microorganismo implicado.⁽²⁵⁾

Según la capacidad de formar biofilm, las bacterias son clasificadas como: No Formadoras, Formadores débiles, Formadores moderados, Formadores fuertes.⁽²⁶⁾

2.3 Hipótesis

- H_a : Existe relación entre la formación de biofilm y resistencia a oxacilina en *Staphylococcus aureus* aislados de hemocultivos. Hospital Nacional Hipolito Unanue, Julio 2016 – junio 2018.
- H_0 : No existe relación entre la formación de biofilm y resistencia a oxacilina en *Staphylococcus aureus* aislados de hemocultivos. Hospital Nacional Hipolito Unanue, julio 2016 – junio 2018.

2.4 Variables e indicadores

- **Variable I:** Formación de biofilm.
- **Variable II:** Resistencia a oxacilina.

2.5 Definición operacional de términos

| VARIABLE | DEFINICION CONCEPTUAL | DEFINICION OPERACIONAL | DIMENSIONES | INDICADORES |
|-------------------------|--|--|---------------------------------|--------------------------|
| Formación de Biofilm | Las bacterias constituidas formando un biofilm desarrollan diferencias fenotípicas, bioquímicas y morfológicas respecto a su presentación en forma planctónica. | La formación de biofilm se determina fenotípicamente por el método en placa de cultivo de tejido (PCT) | $DO \leq 0.037$ | No formador |
| | | | $0.037 < DO \leq 0.074$ | Débil |
| | | | $0.074 \leq DO_c < 0.148$ | Moderado |
| | | | $DO_c > 0.148$ | Fuerte |
| Resistencia a oxacilina | La prueba es utilizada para detectar la presencia del gen <i>mecA</i> que codifica una Proteína de unión a Penicilina alterada (PBP2A) en <i>Staphylococcus aureus</i> (SARM o MRSA) | La resistencia a oxacilina se evidencia en la prueba de disco difusión, por la ausencia o menor diámetro del halo de sensibilidad a cefoxitina | De laboratorio de Microbiología | Sensible ≥ 22 mm |
| | | | | Resistencia ≤ 22 mm |

CAPÍTULO III

DISEÑO METODOLÓGICO

III. DISEÑO Y MÉTODO

3.1 Tipo de investigación

La investigación muestra un enfoque de tipo cuantitativo, debido que las variables fueron medibles dentro del entorno de la problemática planteada, tomando en cuenta lo sectores de la formación de biofilm y el nivel de resistencia a la oxacilina. ⁽²⁷⁾

La investigación muestra un nivel de investigación de tipo correlacional, debido a que se buscó la asociatividad entre las variables de estudios a través de técnicas descriptivas y estadísticas, porque se manifestó la determinación de encontrar una relación entre el comportamiento de la formación de biofilm en las distintas fases de la resistencia a la oxacilina a las cepas aisladas con *Staphylococcus aureus*. ⁽²⁸⁾

3.2 Ámbito de Investigación

El estudio se realizó en el Hospital Nacional Hipólito Unanue, institución de tercer nivel, ubicado en el distrito de El Agustino, Lima - Perú. Durante el periodo julio del 2016 a junio del 2018.

3.3 Población y muestra

3.3.1 Población

La población fue conformada por 104 cepas clínicas identificadas como *Staphylococcus aureus* aisladas de hemocultivos de pacientes atendidos en el Hospital Nacional Hipólito Unanue durante el periodo de estudio.

3.3.2 Muestra

Se recuperaron en aislamiento 71 cepas que cumplieron con los criterios de inclusión. Las cepas de *Staphylococcus* fueron aisladas de hemocultivos de pacientes que se atendieron en el Hospital Nacional Hipólito Unanue, durante el periodo julio 2016 – junio 2018.

Muestreo. No se realizó un cálculo muestral debido a que se trabajó con todas las muestras que cumplían con los criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión

- Aislamientos recuperados dentro del periodo de estudio.
- Cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de hemocultivos no repetidos.

Criterios de exclusión

- Cultivos contaminados.
- Cepas de *Staphylococcus aureus*, aisladas de diferentes muestras a hemocultivo.

3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Las técnicas e instrumentos de recolección de datos se realizaron mediante ensayos basados en protocolos definidos como el ensayo en placas de poliestireno para microtitulación. **(Anexo 5)**

Preparación de medios y reactivos de laboratorio

- Se elaboraron los medios de cultivo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.
- Los medios de identificación bioquímica (agar sangre, agar manitol), de preservación de cepas (caldo tripticasa soya con glicerol) y los utilizados para la detección de biofilm (caldo tripticasa glucosado al 1%), fueron pesados en una balanza de precisión, autoclavados y repartidos en placas y/o tubos, según correspondía.
- Los colorantes y soluciones se prepararon según la norma descrita.

Detección de biofilm en placa para cultivo de tejido (PCT)

- Las cepas aisladas y la cepa control se inocularon en 10 mL de caldo Tripticasa de soya glucosado al 1%, incubación 37°C por 24 horas.
- Los cultivos y el control se diluyeron 1:100 con medio fresco.
- En pocillos Individuales estériles de fondo plano de poli estireno se llenaron con 200 μ L del cultivo diluido. Incubación 37°C por 24 horas.
- Se utilizó como control negativo el caldo Tripticasa estéril. Incubación 37°C por 24 horas.
- Se eliminó el contenido de cada pocillo, luego se lavó con 0.2 mL de PBS (pH 7.2) por cuatro veces.
- Se realizó la fijación con una solución de acetato de sodio al 2% y luego una coloración con cristal violeta al 0.1%.
- Se removió el exceso de colorante con agua desionizada y se secó.
- Usando un lector de ELISA a una longitud de onda de 570 nm, se leyó la densidad óptica (OD) del biofilm adherido y coloreado.

- La interpretación de la capacidad de formación de biofilm se realizó de acuerdo a los criterios de Stepanovic et al. **(anexo 3)**.

La interpretación de las lecturas de densidad óptica, requirió definir un valor de corte para diferenciar las bacterias no formadoras de biofilm de aquellas que sí son formadoras de biofilm. Para lo cual se utilizó los criterios descritos por Stepanovic para interpretar los resultados. Se calculó la media de la densidad óptica (DO) de los controles y se midió la DO de cada cepa bacteriana individualmente. A continuación, se definió el punto de corte (DOc) como tres desviaciones estándar (SD) sobre la DO media de los controles: $DOc = DO \text{ media de los controles} + (3 \times SD \text{ de los controles})$. La DO final de cada cepa fue el valor de la DO medido para cada una de las cepas sustrayendo el valor de DOc ($DO = DO \text{ de una cepa} - DOc$). Si el valor de DO tiene resultado negativo, se considera como valor cero, mientras que cualquier valor positivo indicaría la producción de biofilm. ⁽¹⁴⁾

Detección de biofilm por el método Agar Rojo Congo (ARC)

- Las placas con Agar Rojo Congo se inocularon por estría con el microorganismo e incubado a 37°C por 24 horas aeróbicamente.
- En la lectura las colonias negras con una consistencia cristalina seca indicaron la producción de biofilm. **(anexo 4)**

Instrumentos

Se utilizó una Ficha de recolección de datos. Lo que corresponde al constructo de una ficha para la recopilación de datos obtenidos mediante



la observación del comportamiento y características las variables sometidas a investigación, sujetas al procedimiento establecido en la problemática del estudio. **(Anexo 2)**

3.5 Plan de procesamiento y análisis de datos

Para el proceso y la observación de resistencia microbiana de *Staphylococcus aureus* a oxacilina los datos fueron registrados en el programa WHONET 5.6.

Dentro de la aplicación estadística para la determinación de la relación entre las variables y la observación de formación de biofilm se utilizó el programa estadístico SPSS.

3.6 Aspectos éticos

No se presentó inconvenientes éticos debido a que durante el desarrollo del proyecto de investigación se mantuvo la confidencialidad de los datos de cada paciente. No existe conflicto de interés en la ejecución de la presente investigación de tesis. El proyecto de investigación fue revisado y aprobado por el comité institucional de ética del Hospital Nacional Hipólito Unanue.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Resultados

A partir de 7461 muestras de hemocultivos procesadas en el Hospital Nacional Hipólito Unanue durante el periodo de estudio, procedentes de servicios de hospitalización, consulta externa y emergencia. Se identificaron 1346 agentes bacterianos en 1150 pacientes. Se identificaron 104 cepas de *Staphylococcus aureus* en 86 pacientes. Se seleccionaron 71 cepas de *Staphylococcus aureus* que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión.

Para determinar la frecuencia de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina aislados en hemocultivos en las cepas seleccionadas se realizó el antibiograma por el método de disco difusión de kirby-Bauer determinándose la resistencia a los antimicrobianos por los puntos de corte según los criterios del Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI). Se encontró un 63,4% de resistencia a oxacilina en *Staphylococcus aureus* aislados de hemocultivos en el Hospital Nacional Hipólito Unanue, durante el periodo de estudio. (Tabla 1).

Tabla 1. Resistencia a los antimicrobianos en *Staphylococcus aureus* aislado de hemocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue. Julio 2016- junio 2018.

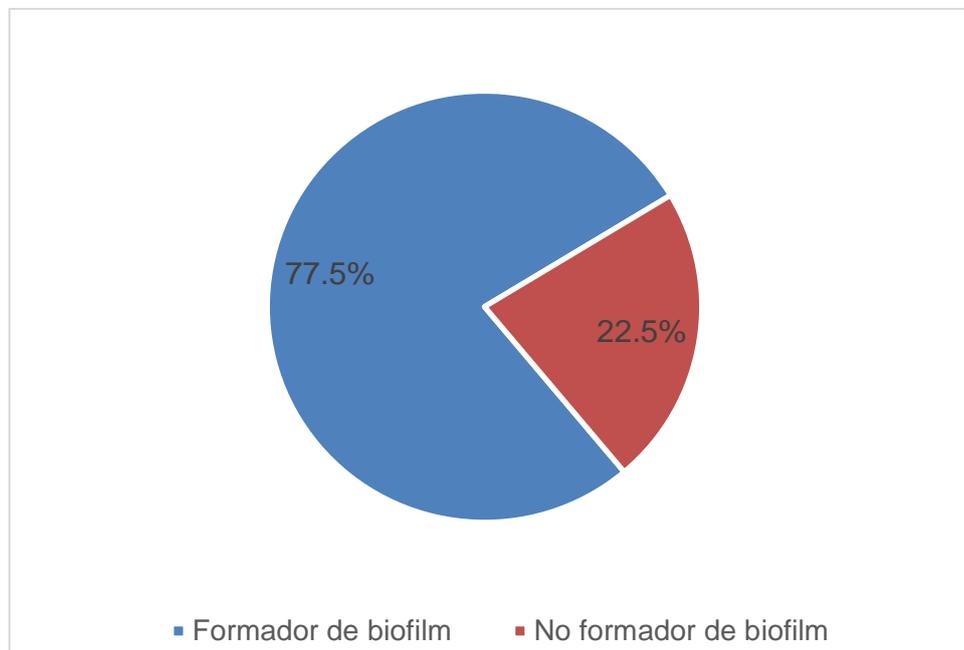
| Antibiótico | %R | %S | %R 95%I.C. |
|-----------------------------|------|------|------------|
| Penicilina G | 93 | 7 | 83.7-97.4 |
| Eritromicina | 81.7 | 18.3 | 55.3-77.9 |
| Oxacilina | 63.4 | 36.6 | 51.1-74.3 |
| Gentamicina | 64.8 | 35.2 | 49.7-73.0 |
| Clindamicina | 56.3 | 43.7 | 44.0-67.9 |
| Ciprofloxacina | 63.4 | 36.6 | 41.3-65.3 |
| Trimetoprima/Sulfametoxazol | 29.6 | 70.4 | 17.3-38.8 |
| Cloramfenicol | 8.5 | 91.5 | 3.5-18.2 |
| Rifampicina | 7 | 93 | 2.6-16.3 |
| Doxiciclina | 2.8 | 97.2 | 0.5-10.7 |
| Teicoplanina | 0 | 100 | 0.0-6.4 |
| Vancomicina | 0 | 100 | 0.0-6.5 |
| Linezolid | 0 | 100 | 0.0-6.4 |

Fuente: datos obtenidos de la investigación

La formación de biofilm en nuestro estudio en cepas de *Staphylococcus aureus* se determinó por el método en placa de cultivo de tejido (PCT), y se clasificó la formación de biofilm según los criterios de Stepanovic (Anexo 2), El valor de absorbancia media fue 0,012 y la desviación estándar de 0,009 por lo tanto, se estableció como valor de corte de la densidad óptica (DOc) una absorbancia de 0,039. En base al valor de corte, las cepas se clasificaron en: no formadoras de biofilm si la absorbancia del pocillo fue menor o igual a 0,039, formadoras débiles de biofilm si la absorbancia del pocillo era mayor de 0,039 y menor o igual a 2 veces el valor de corte ($\leq 0,156$), formadoras moderadas de biofilm si la absorbancia del pocillo resultó mayor a 0,078 y menor o igual a 4 veces el valor de corte ($\leq 0,156$) y fuerte formador de biofilm cuando la absorbancia supero el valor 0,156. (Anexo 3)

Las 71 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de hemocultivos fueron distribuidas según la capacidad de formación de biofilm mediante el método en placa de cultivo de tejido en dos grupos, así se observó 55 cepas (77,5%) con capacidad de formación de biofilm y 16 cepas (22.5%) fueron no formadoras de biofilm. (Grafico 1)

Grafico 1. Formación de biofilm en *Staphylococcus aureus* aislada de hemocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue. Julio 2016 – Junio 2018



Fuente: Datos de la investigación.

Asimismo, cuando se estratificó las cepas de *Staphylococcus aureus* aislado de hemocultivos por su capacidad de formación de biofilm, mediante el método en placa de cultivo celular se observa que las cepas con formación fuerte de biofilm representaron el 49,3% (35), con formación moderada el 18.3% (13), y con formación débil el 9,9% (7), solo un 22.5% (16) no presentaron capacidad de formar biofilm. (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de la formación de biofilm en *Staphylococcus aureus* aislado de hemocultivos de pacientes hospitalizados. Hospital Nacional Hipólito Unanue. Julio 2016- Junio 2018.

| Formación de biofilm | N° | % |
|----------------------|----|------|
| Negativo | 16 | 22.5 |
| Débil | 7 | 9.9 |
| Moderado | 13 | 18.3 |
| Fuerte | 35 | 49.3 |
| Total | 71 | 100 |

Fuente: Datos de la investigación.

Para determinar la relación entre la formación de biofilm y resistencia a oxacilina en *Staphylococcus aureus* aislados en hemocultivos, mediante el estadístico Chi cuadrado se encontró un valor de 2,613 con tres grados de libertad y un valor de p mayor de 0.05, que nos indica que no existe una relación estadísticamente significativa entre las variables. Se muestra los resultados obtenidos con el software estadístico. (Tabla 3)



Tabla 3. Relación entre la formación de biofilm y resistencia a oxacilina en *Staphylococcus aureus* aislados en hemocultivos Hospital Nacional Hipólito UnanueEl Agustino, Julio 2016 – junio 2018.

| | | Oxacilina | | Total |
|----------------------|-------------|------------|----------|--------|
| | | Resistente | Sensible | |
| Formación de Biofilm | Fuerte | 19 | 16 | 35 |
| | | 45,2% | 55,2% | 49,3% |
| | Moderado | 7 | 6 | 13 |
| | | 16,7% | 20,7% | 18,3% |
| | Debil | 6 | 1 | 7 |
| | | 14,3% | 3,4% | 9,9% |
| | No formador | 10 | 6 | 16 |
| | | 23,8% | 20,7% | 22,5% |
| Total | | 42 | 29 | 71 |
| | | 100,0% | 100,0% | 100,0% |

| Pruebas de chi-cuadrado | | | |
|-------------------------|--------------------|----|---------------------------|
| | Valor | gl | Sig. asintótica (2 caras) |
| Chi-cuadrado de Pearson | 2,613 ^a | 3 | ,455 |
| Razón de verosimilitud | 2,914 | 3 | ,405 |
| N de casos válidos | 71 | | |

a. 2 casillas (25,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 2,86.

4.2 Discusión

Los factores de virulencia favorecen el desarrollo de las infecciones en el ser humano, en nuestra investigación analizamos la formación de biofilm y su asociación con un mecanismo de resistencia a los antimicrobianos como es el caso de resistencia a oxacilina. Las infecciones por *Staphylococcus aureus* son una causa significativa de morbilidad y mortalidad en adultos mayores. ^(29, 30)

Se encontró una alta frecuencia de resistencia a oxacilina con 63.4% en cepas de *Staphylococcus aureus* aislada de pacientes con hemocultivos en el Hospital Nacional Hipólito Unanue en El Agustino durante el periodo de estudio. Este valor es inferior al encontrado por otros investigadores en nuestro país, 71.4% en el Hospital Nacional de Arequipa, Siguas y col ⁽³²⁾. 90% en el Hospital Almenara, Vásquez y Luchetti ⁽³³⁾. 85% en el Hospital Rebagliati por Echevarría y col ⁽³⁴⁾.

Se encontró en nuestra investigación que en las 104 cepas de *Staphylococcus aureus* seleccionados, el 49.3% tenían la capacidad de producir biofilm, mientras que el 22.5% no tenían dicha capacidad. Gil M y col, en su estudio encontró como productoras de biofilm 92%, no productoras de biofilm 5% ⁽³⁵⁾.

Así mismo Nava K y col, en su estudio encontró 21% de las cepas fueron productoras de biofilm mientras que el 27% no fueron productoras de biofilm ⁽³⁸⁾.

Del mismo modo Gil M y col, con 92% de cepas productoras de biofilm, respaldaron nuestro estudio. Observando una disociación entre las variables resistencia a oxacilina y formación de biofilm. Esta referencia es relevante dado que el grosor de la biopelícula se relaciona directamente con la dificultad de erradicarla, por lo que es interesante conocer la capacidad del microorganismo en formar biopelículas y el qué grado en que lo produce. ⁽³⁵⁾.



**Universidad
Norbert Wiener**

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- No existe relación estadísticamente significativa entre la resistencia a la oxacilina y la formación de biofilm en *Staphylococcus aureus* aislado de Hemocultivos de pacientes hospitalizados. Hospital Nacional Hipólito Unanue. Julio 2016 – junio 2018.
- La resistencia a oxacilina en *Staphylococcus aureus* aislados de hemocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue. Julio 2016 – junio 2018. fue de 63.4%.
- La frecuencia de pacientes que presentaron aislamiento de *Staphylococcus aureus*, Hospital Nacional Hipólito Unanue. Julio 2016 – junio 2018. según el sexo fue predominante en el femenino con 53,5%; la edad promedio fue de 52 años, siendo la procedencia más frecuente en los servicios de Consulta externa (50,7%), y menos frecuente en servicios de hospitalización (49.3%).

5.2 Recomendaciones

- Se debería implementar métodos para determinar la presencia de biofilm para conocer la magnitud de factores de virulencia en aislamientos bacterianos de muestras clínicas y con resistencia a los antimicrobianos.
- De acuerdo a nuestro estudio se observa un mayor predominio de infecciones en pacientes femeninos de consulta externa, siendo fomentado las investigaciones en este grupo de pacientes por presentar un mayor riesgo y ser un problema de salud pública.
- Para una mejor correlación y /o asociación entre los factores de virulencia se podría evaluar dos poblaciones con una mayor proporción, que permita analizar el comportamiento de las dos variables.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Tsuneda S, Extracellular polymeric substances responsible for bacterial. Vol 1. Nevada; FEMS Microbiology Letters; 2003.
2. Watnick P; Biofilm: city of microbes Vol 1. Florida; American Society for Microbiology, 2000.
3. Vu, B; Bacterial Extracellular polysaccharides involved in biofilm México; 2009.
4. Cordeiro E; *Staphylococcus aureus* biofilm formation on polypyrrole: na electrical overview. Vol 1. Brasil: Instituto de Pesquisa em Ciência dos Materiais; 2015.
5. Gil M; Formación de biopelículas en aislados de *Staphylococcus aureus* según la susceptibilidad antimicrobiana y la procedencia clínica. Vol1. Caracas: Universidad Central de Venezuela; 2015.
6. Gonzales M; Detección de biofilm en *Staphylococcus aureus* aislados de nasofaringe en equinos. Volumen 1; Buenos Aires: Secretaría de Ciencia y Técnica; 2010.
7. López R; Determinación de la resistencia microbiana de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos frescos provenientes de mercados de Lima Metropolitana. Vol 1; Lima; Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2016.
8. García C. Diagnóstico de las infecciones asociadas a catéteres vasculares centrales, vol 1; Lima; Revista chilena de infectología; 2003.
9. Bustos, J. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad Buenos Aires; Vol 1; Buenos Aires; Rev. Biomed; 2006.
10. Bustos Martínez J, Hamdan-Partida A, Gutiérrez-Cárdenas M. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Vol 1; Rev. Biomed. 2006 (17):287-305.



11. Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*. 2003 (112): 1466–77.
12. Arciola C, Campoccia Davide S, Montanaro L, Costerton J; Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*. 2012. (33) 5967 – 5982.
13. Salvador C ACBA. Técnicas para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el laboratorio de microbiología clínica. Asociación Española de Farmacéuticos Analistas. 2005; 1:74-78.
14. Salas-Sánchez OA, Rivera-Morales I. Incidencia de infecciones relacionadas a catéteres venosos centrales (CVC) en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) de un hospital universitario. *Medicina Universitaria* 2010; 12 (47):91-95.
15. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24(1):25-9
16. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis*. 2011; 15(4):305-311.
17. Solano C, Echeverz M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*. 2014, 18:96–104.
18. Carmen Gil, Cristina Solano, Saioa Burgui, Cristina Latasa, Begoña García, Alejandro Toledo-Arana, Iñigo Lasa, Jaione Valle. Biofilm Matrix Exoproteins Induce a Protective Immune Response against *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection. *Infection and Immunity*. Vol 82 (2014). N°3: 1017 – 1029.
19. Nilima V. Telang, Meena G. Satpute, Krishna B. Niphadkar, Suresh G. Joshi. An increased incidence of biofilm producing multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary care hospital from India: A 2-year study. *American Journal of Infection Control*. 2010. Vol. 38 No. 2: 165-166.

20. Karen Smith, Ana Perez, Gordon Ramage, Curtis G. Gemmell, Sue Lang. Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. International Journal of Antimicrobial Agents. 2009; 33: 374–378.
21. Londoño F; Epidemiología de la infección asociada a catéter venoso central. Rev. Chile Pediatría 2011; 82 (6): 493-501.
22. Ping C, Johnathan J. Abercrombie R. Jeffrey K; An improved medium for growing *Staphylococcus aureus* biofilm. Journal of Microbiological Methods. 2012. 115–118.
- 23 Ojeda, F. Infecciones asociadas a catéteres Lima; 2000.
24. Stepanovic S; A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. 175 179th ed.: Microbiol Methods; 2000.
25. Stepanovic S; Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci APMIS, editor. 2007.
26. Stapleton P; Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Vol1 Europe PMC Funders Group; 2002.
27. Hurtado J; El proyecto de investigación: Comprensión holística. Vol 2 Caracas; Librería de la U; 2014.
28. Creswell J; Research Design. Qualitative, quantitative and mixed methods approaches. Vol12; Londres: SAGE Publications; 2014.
29. Kluitmans J, Belkum AV, Verbruger H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*; epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin microbial, Rev. 1997; 10: 505 -20.
30. Mainous AG, Hueston WJ, Everett CJ, et al. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001 – 2002. Ann Fam. Med. 2006; 4:132-7.
31. Chaves E, Rojas JA, Rivera P, Hernández F. Prevalencia de cepas de *Staphylococcus* productoras de biopelículas y con receptores FC aislados de muestras clínicas y de individuos sanos. Rev. Cost. De ciencias médicas 200; 21:51.



32. Siguas A, Salazar N. et al. Susceptibilidad del *Staphylococcus* en un servicio de medicina. Boletín de la Sociedad Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales – SPEIT 1997; 6:41.
33. Vásquez H, Luchetti A. Sensibilidad del *Staphylococcus aureus* en cultivos de heridas, esputos y úlceras, HNERM, 1997. Boletín de la sociedad de enfermedades infecciosas y tropicales – SPEIT 1997; 6: 43.
34. Echevarría JE, Ore L, Zerpa R, et al. Prevalence of Methicillin Resistant *Staphylococcus Strains*, in Hospitalized patients and susceptibility to teicoplanin in Lima Perú. 20th International Congress of Chemotherapy. Sidney – Australia. Junio 1997. International Society of Chemotherapy.
35. Gil M, Merchan B, Quevedo G, et al. Formación de biopelículas en aislados de *Staphylococcus aureus* según la susceptibilidad antimicrobiana y la procedencia clínica. Academia Biomédica de Real. 2001, n°62.
36. Irala JD, Sanabria G. Progresión de la resistencia a la oxacilina de *Staphylococcus aureus* aisladas entre 2011 – 2013 en un Hospital de referencia de Asunción – Paraguay. Rev. Inst. Med. 2017; 12(1): 5 – 9.
37. Montalvo R, Huaroto L, Álvarez J, et al. Prevalencia de portadores nasales por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en personal de salud del servicio de cuidados intensivos, Hospital Nacional en El Agustino Dos de Mayo. Revista Peruana de Epidemiología, vol. 13. N°2, 2009: 1 – 5.
38. Nava K, Sánchez D, Colina G, Valero K. Enterotoxinas, biofilm y resistencia a los agentes antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus coagulasa negativa* aislados de hemocultivos. Kasmera, vol. 41, N°02. Maracaibo 2013.
39. Diaz C. Descripción del biofilms, desarrollo e importancia de su estudio, impacto de las técnicas de micronano fabricación en sistemas biológicos. Universidad de la plata, facultad de Medicina, 2011.



**Universidad
Norbert Wiener**

ANEXOS

Anexo 01. Matriz de Consistencia

Título: Relación entre la formación de biofilm y resistencia a oxacilina en *Staphylococcus aureus* aislados de hemocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, julio 2016 – junio 2018

| PROBLEMAS | OBJETIVOS | HIPÓTESIS | VARIABLES | DIMENSIONES | INDICADORES | METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN |
|---|---|--|----------------------------|-----------------------|---|---|
| 1. Problema Principal ¿Qué relación existe entre la formación de biofilm y resistencia a oxacilina en <i>Staphylococcus aureus</i> aislado de hemocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, Julio 2016 – Junio 2018? | 1. Objetivo general Determinar la relación entre la formación de biofilm y resistencia a oxacilina en <i>Staphylococcus aureus</i> aislado de hemocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, Julio 2016 – Junio 2018 | 1.Hipótesis general Existe relación entre la formación de biofilm y la resistencia a oxacilina en <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de hemocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, Julio 2016 – Junio 2018. | 1. Formación de biofilm | Producción de biofilm | No formado | <u>Tipo de Investigación</u> |
| | | | | | Débil | Aplicado |
| | | | | | Moderado | <u>Nivel de la Investigación</u> |
| | | | | | Fuerte | Correlacional |
| 2. Problemas Secundarios a. ¿Cuál es la frecuencia de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a oxacilina aislado de hemocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, Julio 2016 – Junio 2018? b. ¿Cuál es la frecuencia de la formación de biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados en hemocultivos en el Hospital Nacional Hipólito Unanue El Agustino, Julio 2016 – Junio 2018? | 2. Objetivos Específicos a. Determinar la frecuencia de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a oxacilina aislado en hemocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, Julio 2016 – junio 2018. b. Determinar la frecuencia de la formación de biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados en hemocultivos en el Hospital Nacional Hipólito Unanue El Agustino, Julio 2016 – Junio 2018. | | 2. Resistencia a Oxacilina | Microbiología | Sensible <i>Staphylococcus aureus</i> ≥ 22 mm | <u>Diseño de Investigación</u> No experimental |
| | | | | | | <u>Población de Investigación</u> Se conforma por todas las cepas clínicas identificadas con <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas en hemocultivos |
| | | | | | | <u>Técnicas de Investigación</u> Observación directa |
| | | | | | | <u>Herramientas de Investigación</u> Guía de observación |
| | | | | | Resistente <i>Staphylococcus aureus</i> ≤ 22 mm | |

Anexo 2 Instrumentos de recolección de datos
Medición de la resistencia de *Staphylococcus aureus* oxacilina

| cepa | Comportamiento a CEFOXITIN | Resultado | |
|------|---------------------------------------|-----------|------------|
| | <i>Halos de inhibición</i> ≤ 22 mm | Sensible | Resistente |
| 1 | 19mm | | X |
| 2 | 20mm | | X |
| 3 | 21mm | | X |
| 4 | 16mm | | X |
| 5 | 18mm | | X |
| 6 | 19mm | | X |
| 7 | 21mm | | X |
| 8 | 15mm | | X |
| 9 | 22mm | | X |
| 10 | 18mm | | X |
| 11 | 19mm | | X |
| 12 | 11mm | | X |
| 13 | 19mm | | X |
| 14 | 17mm | | X |
| 15 | 20mm | | X |
| 16 | 12mm | | X |
| 17 | 18mm | | X |
| 18 | 22mm | | X |
| 19 | 22mm | | X |
| 20 | 20mm | | X |
| 21 | 18mm | | X |
| 22 | 16mm | | X |
| 23 | 14mm | | X |
| 24 | 19mm | | X |
| 25 | 21mm | | X |
| 26 | 20mm | | X |
| 27 | 19mm | | X |
| 28 | 21mm | | X |
| 29 | 21mm | | X |
| 30 | 16mm | | X |
| 31 | 13mm | | X |
| 32 | 16mm | | X |
| 33 | 18mm | | X |
| 34 | 15mm | | X |
| 35 | 21mm | | X |
| 36 | 22mm | | X |

| cepa | Comportamiento a CEFOXITIN | Resultado | |
|------|------------------------------------|-----------|------------|
| | <i>Halos de inhibición</i> ≤ 22 mm | Sensible | Resistente |
| 37 | 16mm | | X |
| 38 | 19mm | | X |
| 39 | 12mm | | X |
| 40 | 15mm | | X |
| 41 | 18mm | | X |
| 42 | 17mm | | X |
| 43 | 21mm | | X |
| 44 | 20mm | | X |
| 45 | 15mm | | X |
| 46 | 14mm | | X |
| 47 | 16mm | | X |
| 48 | 18mm | | X |
| 49 | 22mm | | X |
| 50 | 20mm | | X |
| 51 | 14mm | | X |
| 52 | 19mm | | X |
| 53 | 22mm | | X |
| 54 | 16mm | | X |
| 55 | 12mm | | X |
| 56 | 21mm | | X |
| 57 | 20mm | | X |
| 58 | 17mm | | X |
| 59 | 15mm | | X |
| 60 | 16mm | | X |
| 61 | 11mm | | X |
| 62 | 9mm | | X |
| 63 | 18mm | | X |
| 64 | 22mm | | X |
| 65 | 20mm | | X |
| 66 | 21mm | | X |
| 67 | 18mm | | X |
| 68 | 16mm | | X |
| 69 | 14mm | | X |
| 70 | 17mm | | X |
| 71 | 15mm | | X |
| 72 | 20mm | | X |

Medición de la formación de biofilm en hemocultivos

| Cepa | Nivel de formación de biofilm | | | |
|------|-------------------------------|-----------------------|----------------------|---------------|
| | Fuerte | Moderado | Débil | No Formado |
| | $4DOc < DO$ | $2DOc < DO \leq 4DOc$ | $DOc < DO \leq 2DOc$ | $Do \leq DOc$ |
| 1 | 0.196 | | | |
| 2 | 0.301 | | | |
| 3 | 0.159 | | | |
| 4 | 0.200 | | | |
| 5 | 0.169 | | | |
| 6 | 0.202 | | | |
| 7 | 0.174 | | | |
| 8 | | 0.117 | | |
| 9 | 0.252 | | | |
| 10 | 0.365 | | | |
| 11 | 0.236 | | | |
| 12 | 0.172 | | | |
| 13 | 0.248 | | | |
| 14 | 0.561 | | | |
| 15 | 0.326 | | | |
| 16 | 0.182 | | | |
| 17 | | | | 0.036 |
| 18 | | | | 0.000 |
| 19 | CONTROL 1 | | | |
| 20 | 0.510 | | | |
| 21 | 0.243 | | | |
| 22 | 0.169 | | | |
| 23 | 0.252 | | | |
| 24 | 0.319 | | | |
| 25 | 0.325 | | | |
| 26 | 0.202 | | | |
| 27 | 0.217 | | | |
| 28 | 0.233 | | | |
| 29 | | | 0.038 | |
| 30 | | 0.081 | | |
| 31 | 0.157 | | | |
| 32 | CONTROL 2 | | | |
| 33 | | | | 0.022 |
| 34 | | 0.094 | | |
| 35 | | | | 0.032 |
| 36 | | | | 0.031 |

| Cepa | Nivel de formación de biofilm | | | |
|------|-------------------------------|-----------------------|----------------------|---------------|
| | Fuerte | Moderado | Débil | No Formado |
| | $4DOc < DO$ | $2DOc < DO \leq 4DOc$ | $DOc < DO \leq 2DOc$ | $Do \leq DOc$ |
| 37 | 0.191 | | | |
| 38 | CONTROL 3 | | | |
| 39 | | | | 0.031 |
| 40 | | | | 0.020 |
| 41 | | | 0.041 | |
| 42 | | | | 0.020 |
| 43 | | 0.116 | | |
| 44 | | | | 0.034 |
| 45 | | | 0.047 | |
| 46 | 0.210 | | | |
| 47 | | | 0.060 | |
| 48 | | | 0.041 | |
| 49 | 0.177 | | | |
| 50 | | 0.126 | | |
| 51 | 0.243 | | | |
| 52 | | | 0.068 | |
| 53 | CONTROL 4 | | | |
| 54 | 0.766 | | | |
| 55 | 0.223 | | | |
| 56 | | | 0.057 | |
| 57 | | 0.118 | | |
| 58 | | 0.089 | | |
| 59 | | 0.123 | | |
| 60 | CONTROL 5 | | | |
| 61 | 0.149 | | | |
| 62 | | 0.127 | | |
| 63 | 0.373 | | | |
| 64 | 0.305 | | | |
| 65 | 0.171 | | | |
| 66 | 0529 | | | |
| 67 | | 0.123 | | |
| 68 | | 0.112 | | |
| 69 | | | 0.064 | |
| 70 | | | | 0.006 |
| 71 | | 0.121 | | |
| 72 | CONTROL 6 | | | |

ANEXO 3

Interpretación de la producción de Biofilm por método de Placa de cultivo de tejido. (PCT)

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

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

ANEXO 4

AGAR ROJO DE CONGO

Para la preparación de 100 ml de Agar Rojo de Congo, se utilizó la siguiente formula.

| | |
|----------------------------|--------------|
| Caldo de Tryptona | 1 gramo |
| Agar | 1.5 gramos |
| Extracto de levadura | 0.5 gramos |
| Congo Red | 0.004 gramos |
| Azul brillante de Coomasie | 0.002 gramos |
| Etanol | 1.4 ml |
| Agua c.s.p | 100 ml |

La preparación una vez disuelta homogéneamente, se llevó a la autoclave y se esterilizó (121°C por 15 minutos – presión de 1 atmosfera)

ANEXO 5

Detección de biofilm en placa para cultivo de tejido (PCT)

- Las cepas aisladas y la cepa control se inocularon en 10 mL de caldo Tripticasa de soya glucosado al 1%, incubación 37°C por 24 horas.
- Los cultivos y el control se diluyeron 1:100 con medio fresco.
- En pocillos Individuales estériles de fondo plano de poli estireno se llenaron con 200 µL del cultivo diluido. Incubación 37°C por 24 horas.
- Se utilizó como control negativo el caldo Tripticasa estéril. Incubación 37°C por 24 horas.
- Se eliminó el contenido de cada pocillo, luego se lavará con 0.2 mL de PBS (pH 7.2) por cuatro veces.
- Se realizó la fijación con una solución de acetato de sodio al 2% y coloración con cristal violeta al 0.1%.
- Se removió el exceso de colorante con agua desionizada y se secó.
- Usando un lector de ELISA a una longitud de onda de 570 nm, se leyó la densidad óptica (OD) del biofilm adherido y coloreado.
- La experiencia se realizó por triplicado y se repitió tres veces.
- La interpretación de la capacidad de formación de biofilm se realizó de acuerdo a los criterios de Stepanovic et al. (**anexo 3**).

ANEXO 6

