



UNIVERSIDAD PRIVADA NORBERT WIENER

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA

“ASOCIACIÓN ENTRE LA FORMACIÓN DE BIOFILM Y LA PRODUCCIÓN
DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN *Escherichia coli*
AISLADOS DE UROCULTIVO EN EL HOSPITAL NACIONAL HIPOLITO
UNANUE DE ENERO - JUNIO 2018”

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

Presentado por:

CASABLANCA ALVARADO, JUANA.

HURTADO QUISPE, LUZ MELINA.

ASESOR: Lic. TM. CHAMPI MERINO, ROKY GOVANNI.

LIMA - PERÚ

2018

Dedicatoria

A Dios siempre por bendecirme, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este tiempo. A mi familia, que ha sido mi ejemplo de lucha, forjaron en mí que todo objetivo trazado se alcanza con perseverancia, fortaleza, firmeza y amor.

A mi adorable hermana y sobrinos por depositar toda su confianza y transmitirme moralmente energías en mis momentos difíciles, y tomarme como ejemplo de superación y ser su orgullo.

A mi enamorado, amigos y compañeros por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido llegar hasta lo que soy ahora.

A mi compañera de tesis Melina, por estar ahí y levantarme en los momentos de crisis.

Casablanca Alvarado, Juana.

Dedicatoria

En primera instancia, agradezco a nuestro Dios por darme la vida, agradecerle por guiarme y darme las fuerzas necesarias para luchar en alcanzar mis metas.

A mis padres pues han sido el principal cimiento para la construcción de mi vida profesional, sentar en mí el deseo de superación.

A mis difuntas abuelas, sé que desde algún lado estarán brindándome su apoyo y fortaleza para los diversos retos que afrontaré.

A esas personas importantes en mi vida, familiares y amigos que siempre estuvieron listos para proporcionarme toda su ayuda, además a todos los docentes que tuve a través de toda mi carrera.

Hurtado Quispe, Luz Melina.

Agradecimientos

Ante todo, a nuestro Dios creador y dador de vida por habernos permitido llegar hasta esta instancia y darnos las fuerzas necesarias para cumplir nuestra meta.

A nuestro asesor el Lic. TM. Champi Merino, Roky Giovanni por brindarnos su apoyo, conocimiento y orientación en nuestra investigación.

Al Mg. TM. Saldaña Orejón, Italo Moisés por brindarnos su orientación, un espacio valioso y sus consejos atinados, fue un privilegio contar con usted.

Autoras

Asesor de tesis

Lic. Champi Merino, Roky Giovanni.

Tecnólogo médico

JURADOS

Presidente

Dr. Juan Carlos Benites Azabache.

Secretario (a)

Mg. Roberto Eugenio Rojas León.

Vocal

Mg. Maria del Carmen Quispe Manco.

INDICE

	Pág.
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	15
1.1 Planteamiento del problema	16
1.2 Formulación del problema	18
1.3 Justificación	18
1.4 Objetivos	19
1.4.1. Objetivos Generales	19
1.4.2. Objetivos Específicos	19
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	20
2.1. Antecedentes	21
2.2. Bases teóricas	26
2.3. Hipótesis	44
2.4. Variables e indicadores	44
CAPÍTULO III. DISEÑO METODOLÓGICO	45
3.1. Tipo de investigación	46
3.2. Ámbito de investigación	46
3.3. Población y muestra	46
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	48
3.5. Plan de procesamiento y análisis de datos	49
3.6. Aspectos éticos	51
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1. Resultados	54
4.2. Discusión	68
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	75
5.1. Conclusiones	76
5.2. Recomendaciones	77
REFERENCIAS	78
ANEXOS	87

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Relación entre la población y la muestra de cepas de *Escherichia coli* aislada de urocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero - junio 2018. 54

Gráfico 2. Distribución de la producción de betalactamasas de espectro extendido en la muestra de *Escherichia coli* aislada de urocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero - junio 2018. 55

Gráfico 3. Formación de biofilm en *Escherichia coli* aislada de urocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero - junio 2018.

57

Gráfico 4. Distribución de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido aislada de urocultivos según formación de biofilm. Hospital Nacional Hipólito Unanue enero - junio 2018. 61

Gráfico 5. Distribución según el sexo de pacientes con *Escherichia coli* aislada en urocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero - junio 2018. 63

Gráfico 6. Distribución según grupos de edad de pacientes con aislamientos de *Escherichia coli* en urocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero - junio 2018. 65

Gráfico 7. Distribución de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido aislada de urocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue,

enero - junio 2018.

66

Gráfico 8. Distribución de pacientes con aislamientos de *Escherichia coli* en urocultivos según procedencia, Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero - junio 2018. 67

Gráfico 9. Frecuencia de urocultivos negativos y positivos procesados en los seis meses que duro el estudio. Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero - junio 2018. 94

Gráfico 10. Distribución de aislamientos de *Escherichia coli* en urocultivos por meses que duro el estudio. Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero - junio 2018. 95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabulación cruzada entre la producción de betalactamasas de espectro extendido y la formación de biofilm en *Escherichia coli* aislado de urocultivos, Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero – junio 2018. 58

Tabla 2. Tabulación cruzada entre la producción de β lactamasas de espectro extendido y la intensidad de formación de biofilm en *Escherichia coli* aislado de urocultivos, Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero - junio 2018. 59

Tabla 3. Formación de Biofilm en cepas de *Escherichia coli* aisladas de urocultivos, Hospital Nacional Hipolito Unanue, enero- junio 2018.

60

Tabla 4. Prueba de chi cuadrado para establecer la asociación entre la producción de betalactamasas de espectro extendido y la formación de biofilm. Hospital Nacional Hipolito Unanue, enero - junio 2018.

62

Tabla 5. Distribución según grupos de edad de pacientes con aislamientos de *Escherichia coli* en urocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero - junio 2018. 64

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores de virulencia de las cepas de <i>Escherichia coli</i> involucradas en infecciones urinarias.	29
Figura 2. Clasificación de betalactamasas según Bush, Jacoby y Medeiros.	31
Figura 3. Composición de los biofilm.	38

Resumen

Objetivo: Determinar la asociación entre la formación del biofilm y producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en *Escherichia coli* aislados de urocultivos en el Hospital Nacional Hipólito Unanue durante enero - junio 2018.

Materiales y métodos: Estudio cuantitativo, observacional y de corte transversal, Para demostrar la producción de BLEE se utilizó el método de Jarlier y para demostrar la capacidad de formación de biofilm el método en Placa de cultivo de tejido (PCT), las variables fueron descritas utilizando frecuencias absolutas y porcentuales, la asociación entre las variables fue determinada mediante el estadístico Chi cuadrado de independencia.

Resultados: A partir de 190 cepas de *Escherichia coli* aisladas de urocultivos, 48,9% (93 cepas) presentaron BLEE y 73,2% (139) eran formadores de biofilm; siendo 58,3% débil, 30,2% moderado y 11,5% fuerte. Se determinó la asociación entre las variables producción de BLEE y formación de biofilm encontrándose una asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Conclusión: Se determinó que existe una asociación significativa entre la formación de biofilm y la producción de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* aislado de urocultivos La prevalencia de *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido en urocultivos fue de 43% en el Hospital Nacional Hipólito Unanue durante enero – junio del 2018

Palabras claves: *Biofilm, Betalactamasas de espectro extendido, Escherichia coli, urocultivos.*

Summary

Objective: To determine the association between the formation of biofilm and production of beta-lactamase (ESBL) spread spectrum in *Escherichia coli* isolated from urine cultures at the National Hospital Hipolito Unanue during January - June 2018.

Materials and methods: quantitative, observational and cross-sectional, study to demonstrate ESBL production Jarlier method is used and to demonstrate the ability of biofilm formation method in (PCT) tissue culture dish, the variables were described using frequencies absolute and percentage, the association between variables was determined by the statistical Chi square of independence.

Results: From 190 strains of *Escherichia coli* isolated from urine cultures, 48.9% (93 strains) ESBL and 73.2% presented (139) were trainers of biofilm; still weak 58.3%, 30.2% moderate and 11.5% strong. It was determined the association between variables BLEE and formation of biofilm production found a statistically significant Association ($p < 0,05$).

Conclusion: It was determined that there is a significant association between biofilm formation and the production of beta-lactamase spectrum extended in *Escherichia coli* isolated from urine cultures the prevalence of *Escherichia coli* beta-lactamase-producing of spectrum spread in urine cultures was 43% in the National Hospital Hipólito Unanue during January - June 2018.

Keywords: *Biofilm, Extended Spectrum Betalactamase, Escherichia coli, Urocultures.*

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

I. EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema.

La infección del tracto urinario (ITU) constituye una de las causas más frecuentes de enfermedad infecciosa⁽¹⁾, se caracteriza por la presencia de microorganismos a cualquier nivel desde el extremo distal de la uretra hasta la corteza renal (uretra, vejiga, próstata, uréteres, pelvis renal o riñones)⁽²⁾. Siendo el agente etiológico *Escherichia coli* una de las enterobacterias más frecuentes de procesos infecciosos nosocomiales y adquiridos en la comunidad⁽³⁾. Se determina la infección microbiana mediante el urocultivo. Más del 95% de las ITU están causadas por *Escherichia coli* se estima que entre el 75 - 95% son causas de episodios de cistitis aguda no complicada⁽⁴⁾.

Latinoamérica ocupa el primer lugar en ITU causadas por *Escherichia coli* con un 45% de incremento en los aislamientos de bacilos gram negativos productores de BLEE⁽²⁾. Un estudio realizado en Perú en pacientes ambulatorios con ITU se encontró que la *Escherichia coli* era el principal agente causal y un 41% de aislamientos eran productoras de BLEE⁽⁵⁾.

El aumento de la resistencia bacteriana es un hecho evidente a la vez que es un problema antiguo, tanto en la comunidad como en el hospital se han convertido en un problema creciente⁽⁷⁾, dicha resistencia se transmite por elementos genéticos móviles^(6,8), la matriz extracelular también alberga enzimas, tales como betalactamasas las cuales actúan destruyendo la integridad estructural de los antibióticos⁽⁹⁾.

Las BLEE, se definen como enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas, pero no las carbapenemas⁽⁹⁾, sin embargo, ciertos antibióticos como los betalactámicos estimulan la formación de biofilm en bacilos gram negativos⁽¹⁰⁾. Según Herrera los antibióticos bacteriostáticos que inhiben el crecimiento contribuyen a la persistencia y a la preservación del biofilm; la persistencia depende de la dosis del antibiótico y del tiempo de duración. Según estas consideraciones se podría afirmar que el uso de un antibiótico en su concentración bactericida mínima en el tratamiento de una infección causada por biofilm, resultaría en el decrecimiento del 99.9% del número de células vivas, lo que clínicamente resultaría satisfactorio ya que generalmente el sistema inmune colabora⁽⁴⁵⁾. Correlacionaron de forma inversamente proporcional los efectos de los betalactámicos en los biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* con la actividad metabólica de éstas. La comunicación “*quorum-sensing*” es uno de los mecanismos propuestos en el desarrollo y organización del biofilm, como es el caso del sistema quorum sensing LasR/LasI y RhIR/ RhII que facilita la formación de biopelícula favoreciendo así la evasión de la acción de los antimicrobianos⁽¹¹⁾.

La formación del biofilm impide notablemente el tratamiento de las ITU debido a que estas protegen a las bacterias encapsulándolas tanto de la respuesta inmune del huésped como de la terapia antimicrobiana⁽¹²⁾. Algunos estudios han informado sobre la asociación de algunas expresiones del factor de unión, como la formación de biofilm por *E. coli*, con su producción⁽¹³⁾.

1.2 Formulación del problema.

¿Cuál es la asociación que existe entre la formación de biofilm y la producción de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* aislados de urocultivo, Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero a junio 2018?

1.3 Justificación.

En la actualidad las infecciones por *Escherichia coli* muestran incrementos en su resistencia a los antimicrobianos a través de diversos mecanismos, siendo el más frecuente la producción de BLEE⁽¹⁴⁾. El uso inapropiado de antibióticos frente a los uropatógenos genera fracaso de la terapia antimicrobiana con el aumento de la morbimortalidad. La resistencia de agentes bacterianos que producen este tipo de infecciones constituye un problema social y económico para el paciente y el sistema de salud⁽¹⁵⁾.

Existen pocos estudios en nuestro país sobre factores de virulencia como el biofilm en *Escherichia coli* y la asociación frente a mecanismos de resistencia importantes como la producción de BLEE, por lo que la presente investigación contribuirá aportando conocimiento sobre este problema. Teniendo en cuenta la importancia en las implicancias sobre el bienestar y pronóstico de vida del paciente, así es propicio abordarlo como tema de investigación que permitirá contribuir como fuente de información a las autoridades y profesionales del sector salud a fin de establecer estrategias dirigidas a mejorar las acciones y el adecuado uso de antimicrobianos.

Algunos estudios demuestran que la formación del biofilm, dificulta enormemente el tratamiento de las ITU, siendo el biofilm un factor de virulencia importante que permite encapsular a las comunidades bacterianas

limitando la acción de los antimicrobianos.⁽¹²⁾ Por lo que consideramos que nuestra investigación sobre la asociación del biofilm con la producción de BLEE en *Escherichia coli* aislado de infecciones del tracto urinario, permitirá aportar en la búsqueda de nuevas estrategias para disminuir la morbilidad asociada.

1.4 Objetivos.

1.4.1. Objetivos Generales.

- Determinar la asociación entre la formación del biofilm y producción de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* aislados de urocultivo en el Hospital Nacional Hipólito Unanue durante enero - junio 2018.

1.4.2. Objetivos Específicos.

- Determinar la frecuencia de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* aislados de urocultivo en el Hospital Nacional Hipólito Unanue, durante enero - junio 2018.
- Evaluar la formación de biofilm en cepas de *Escherichia coli* aislados de urocultivo en el Hospital Nacional Hipólito Unanue, durante enero - junio 2018.
- Describir los factores demográficos de pacientes con aislamiento de *Escherichia coli* en urocultivo en el Hospital Nacional Hipólito Unanue, durante enero - junio 2018.

CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes.

El 2015, en Turquía Nermin A, et al⁽¹⁶⁾, realizaron un estudio de tipo descriptivo, prospectivo, de corte transversal. *Escherichia coli* fue la cepa aislada de diferentes muestras (orina, aspirado traqueal y herida) del nosocomio las cuales fueron agrupadas en cuatro categorías: 31% fuertes formadores de biofilm, 27% moderado formador de biofilm, 25% débil formador de biofilm y 17% no presento dicha capacidad. *Escherichia coli* fueron en su mayoría aislado de infecciones del tracto urinario y de mujeres que están en el período posmenopáusico. Se investigaron los patrones de susceptibilidad a antibióticos. La mayor susceptibilidad frente a amikacina y una menor susceptibilidad frente a trimetoprim/sulfametoxazol. En consecuencia, las cepas no formadoras de biofilm de *Escherichia coli* fueron más susceptibles a ocho antibióticos que las cepas formadoras de biofilm.

El 2013 en Iraq Al-Kareem S, et al.⁽¹⁷⁾ con el objetivo de analizar biofilm microbianos en dispositivos intrauterinos su infección asociada en la vagina y cuello uterino en usuarios de dispositivos intrauterinos. Compuesto por 50 participantes. Gran número de mujeres prefieren el dispositivo intrauterino (DIU) como método de anticoncepción. Hay una alta frecuencia de formación de biofilm microbianos en los DIU y también un alto porcentaje de infecciones cervico vaginales asociadas en los DIU usuarios el estudio mostro 84% de los dispositivos intrauterinos extraídos se infectaron con una biopelícula que contenía diferentes tipos de microorganismos y el 92.8% de estos DIU infectados se asociaron con

altos niveles de infección cervical. Se encontró que *Escheriacha coli* era el microorganismo más común 61.5% de las infecciones, *Staphylococcus aureus* 43.6%, *Pseudomonas spp.* 15.3%, *Candida albicans* 10.3%, *Neisseria gonorrhoeae* 5.1%.

El 2012 en La India Niveditha S, et al.⁽¹⁸⁾. Con el objetivo de determinar la formación de biofilm y uropatógenos en pacientes con infecciones del tracto urinario asociadas al catéter, realizaron un estudio analítico, prospectivo recolectaron 50 muestras de orina, de pacientes con catéteres urinarios, el método utilizado fue el de adherencia del tubo y el método agar rojo congo. Observando a *Escherichia coli* como el patógeno con mayor frecuencia (70%), seguido de *Klebsiella pneumoniae* (16%), *Pseudomonas aeruginosa* (4%), *Acinetobacter spp* (2%), *Estafilococos* coagulasa negativos (6 %) y *Enterococcus spp* (2%). Encontrando que hubo bacteriuria significativa en todos los pacientes sintomáticos cateterizados y *Escherichia coli* fue el más frecuente en las infecciones del tracto urinario en los pacientes con cateterismo.

El 2017 en Cuba Hernández R, et al.⁽¹⁹⁾ Con el objetivo de determinar los patrones de resistencia y la capacidad para la formación de biofilm en aislados de *Escherichia coli* procedentes de gallinas ponedoras en granjas de la provincia Mayabeque, Cuba. Se colectaron 183 exudados cloacales en gallinas ponedoras con diarrea en cuatro unidades productivas. En el resultado del estudio se determinó la susceptibilidad in vitro a diez antibióticos por el método de Difusión en Agar y la capacidad de formar biofilm por el método de adherencia en placa. Se determinó la concentración Mínima Inhibitoria para el crecimiento planctónico (MICP) y para la inhibición de la formación de biofilm (MCIB). Concluyeron que el

14 % de *E. coli* formaron biofilm in vitro. La MCIB fue mayor que la MCIP, lo cual evidencia que la formación de biofilm contribuye con la tolerancia a los antibióticos.

El 2010, en Madrid Plinio L.⁽²⁰⁾, su estudio titulado “Formación de biopelículas por *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas”. El estudio de tipo cuantitativo prospectivo, descriptivo y relacional. Para comparar la actividad de antimicrobianos, sobre cepas patógenas de *Escherichia coli* planctónicas y asociadas a biopelícula. Empleó la técnica de microdilución en caldo y azul de alamar de las 15 cepas estudiadas. Para la sensibilidad de los antimicrobianos, utilizó la fórmula del fabricante con filtro para las lecturas de absorbancia $R_0 = AO_{530nm} / AO_{630nm}$. Las cepas formadoras débiles de biopelícula fueron más resistentes, mientras que las cepas de *E. coli* formadoras fuertes de biopelículas fueron sensibles a cefotaxima, gentamicina y ciprofloxacina. Los organismos asociados a biopelículas fueron mucho menos sensibles a la acción de los antibióticos que sus correspondientes células planctónicas.

El 2016 en Nepal Neupane S. et al.⁽²¹⁾ Con el objetivo determinar la correlación entre la formación del biofilm y resistencia a los medicamentos con antibióticos de uso común con la producción de BLEE en *Escherichia coli*. El estudio fue de tipo transversal. Utilizaron 1480 muestras de orina de flujo medio, se usó el método de Kirby Bauer para la determinación de BLEE y el método rojo congo para la determinar la intensidad del biofilm. De 69 BLEE que producen cepas uropatógenas de *E. coli*, 20 (29%) eran productores fuertes de biofilm, 22 (31.9%) eran productores moderados de biofilm, 11 (15.9%) fueron débiles los productores

de biofilm y 16 (23.2%) fueron no productores de biofilm. Se encontró que la capacidad de formación de biofilm es significativamente mayor en cepas productoras de BLEE de *E. coli* que en las cepas no productoras de BLEE ($p < 0.05$).

El 2016 en Buenos Aires Velez M, et al.⁽²²⁾ realizaron un estudio de la Influencia del hipoclorito de sodio en los biofilm formados por *Escherichia coli*. Para determinar la capacidad de formar biofilm de cepas *Escherichia coli* toxina shiga (STEC) sobre distintas superficies inertes. Seleccionaron al azar 7 cepas STEC aisladas de hamburguesas de carne bovina, hamburguesas de pollo y carne bovina picada, emplearon la técnica descrita por Polifroni, R. Obteniendo como resultado un notable efecto del hipoclorito de sodio, siendo proporcional este efecto a la mayor exposición y mayor concentración. En los ensayos de desarrollo de biofilm en las placas de acero inoxidable no presento formación debido a que todas las cepas se agruparon como no formadoras de biofilm. Concluyendo que el desarrollo de biofilm sobre poliestireno es mucho mayor al desarrollo sobre acero inoxidable.

El 2017 en Uruguay González M. et al.⁽⁴⁹⁾ Con objetivo de evaluar el efecto de diferentes antibióticos en biofilm por *Escherichia coli* aisladas de niños con ITU y para correlacionar factores de virulencia en comunidades bacterianas intracelulares (IBC). En 116 cepas de *Escherichia coli* se analizaron la formación de biofilm utilizando la técnica en microplaca. El 58.6% de las cepas no produjeron biofilm, mientras que el 16.4% formaron biobilm débiles, 18.1% formaron biofilm moderado y 6.8% formaron biofilm fuertes. No se encontró correlación entre la capacidad de formar biofilm y la presencia de comunidades

bacterianas intracelulares (IBC). En el caso de infecciones urinarias recurrentes potencialmente asociadas con la presencia de biofilm, recomiendan el uso de cefalosporinas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos de tercera generación. Estos antibióticos demostraron reducir la biomasa de biofilm producida incluso por cepas resistentes.

El 2014 en Perú Coveñas C, et al.⁽²³⁾ En un trabajo titulado Efecto de lactoferrina bovina en la formación de biofilm en cepas clínicas de *Escherichia coli* enteroagregativa. Estudio tipo experimental para determinar el efecto de lactoferrina bovina (BLF) en la formación de biofilm en cepas clínicas de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC). Con 122 cepas clínicas de EAEC aisladas e identificadas por PCR múltiple a tiempo real buscando la presencia del gen *aggR*, se evaluaron 31 cepas con y sin hierro. En las cepas sin hierro se observó la formación de biofilm el cual fue de 77% (24/31) en el grupo control versus 58% (14/31) con BLF de 0,01 mg/mL y 4% (1/31) con 1 mg/mL. Con hierro la formación de biofilm fue 90% (28/31) en el grupo control versus 55% (17/31) con BLF de 0,01 mg/mL y 4% (1/31) a 1 mg/mL. (b) Método cuantitativo: sin hierro la absorbancia medida a OD 560 nm del grupo control fue $0,7 \pm 0,5$ versus $0,4 \pm 0,3$ con BLF 0,01mg/mL y $0,3 \pm 0,2$ con bLf de 1 mg/mL ($p < 0,0001$). Esta disminución en presencia de BLF incluso se dio con hierro. La BLF tiende a disminuir la formación de biofilm, mostrando un efecto inhibitorio en las cepas clínicas de EAEC, este efecto no es hierro-dependiente.

2.2. BASES TEORICAS

2.2.1. INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO

Las infecciones del tracto urinario son una de las infecciones más frecuentemente encontradas en la comunidad. Estas infecciones representan una carga para la salud pública y la sociedad, cerca de 40% de las mujeres y el 12% de los hombres tendrán al menos un caso de ITU durante su vida adulta; la infección se asocia con altas tasas de recurrencia y si no se instaura un manejo antibiótico adecuado, puede progresar rápidamente a sepsis severa y muerte⁽²⁴⁾. Los patógenos más frecuentemente implicados son las enterobacterias en especial *Escherichia coli*, que es causante del 80% de estas infecciones de origen comunitario. En los últimos años se ha observado en la práctica clínica un aumento de resistencia de esta bacteria frente a los antibióticos de primera línea para este tipo de infecciones, tanto en las bacterias de origen nosocomial y de la comunidad⁽²⁵⁾.

La bacteriuria es la presencia de bacterias en orina, se clasifica en significativa o no, según si el número de unidades formadoras de colonia por mililitro de orina sembrada (UFC/ml) es mayor a 100 000, pero esta definición no debe realizarse de manera taxativa y debe admitirse una cierta laxitud, depende también de la edad, sexo y síndrome clínico del paciente. Asimismo, cuando la bacteriuria no se acompaña de síntomas clínicos se denomina bacteriuria asintomática⁽²⁴⁾.

2.2.2. ENTEROBACTERIACEAE

La familia Enterobacteriaceae, son bacilos gram negativos, anaeróbios facultativos de gran importancia en la patología infecciosa, que se encuentran

implicados en diferentes síndromes clínicos⁽²⁷⁾. Las enterobacterias son el grupo más extenso y heterogéneo, son organismos ubicuos que yacen en el suelo, el agua y la vegetación; y es el componente mayor de la flora normal intestinal, aunque son poco frecuentes en otros sitios del organismo.

2.2.2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli se describió por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodore Escherich. Fue nombrada inicialmente como "*Bacterium coli commune*" pero en 1919 fue renombrada con el nombre actual en honor a su descubridor⁽²⁸⁾. *E. coli*, bacilos gram negativos, anaeróbicos facultativos, fermentadores son bacilos tanto móviles como no móviles por flagelos peritricosos (flagelos distribuidos uniformemente en la superficie bacteriana)⁽²⁹⁾, es una bacteria mesófila, que se desarrollan a temperatura de 20 a 45 °C, con una temperatura óptima del 37°C y se desarrollan a un pH de 6 - 8⁽³⁰⁾.

2.2.2.2. Hábitat

Escherichia coli tiene como hábitat natural el tubo digestivo y colon humano, coloniza vagina y uretra; desde la uretra asciende y causa infección del tracto urinario (ITU). *E. coli* es la causa principal de ITU adquirida comunitariamente y hospitalaria, septicemia, meningitis neonatal y gastroenteritis. En la infección urinaria los factores que predisponen a ITU en mujeres son la proximidad del ano a la vagina y uretra, así como una pequeña uretra; esto lleva a colonización de uretra y vagina por flora fecal; anomalías anatómicas también predisponen; el uso de sonda urinaria predispone debido a que las cepas muestran propiedades de adherencia⁽²⁷⁾.

2.2.2.3. Patogénesis

La patogénesis producida por *Escherichia coli* consiste en la colonización del intestino y producción de daño al hospedador debido a la producción de toxina. Sin embargo, este es un mecanismo que involucra múltiples procesos y una compleja interacción entre factores bacterianos y del hospedador ⁽³⁰⁾. El género *Escherichia* puede infectar sistema nervioso central, tracto respiratorio bajo, torrente sanguíneo, tracto gastrointestinal y tracto urinario ⁽²⁸⁾.

2.2.2.4. Factores de virulencia

Las cepas patógenas de *Escherichia coli* poseen una serie de factores de virulencia implicados en la producción de los diferentes síndromes clínicos, incluyendo adhesinas, toxinas, sideróforos y sistemas de secreción, entre otros ⁽¹⁸⁾. Además poseen plásmidos que son unidades de ADN extracromosómicos, intracitoplasmáticos, con capacidad de autorreplicación y que juegan un papel fundamental en la codificación de información para su acción patógena así como para la resistencia a los antibióticos ⁽³¹⁾.

Factor de virulencia	Función
Superficie	
Fimbria tipo 1	Adhesión al epitelio de la mucosa y a la matriz tisular, invasión, formación de biopelícula.
Fimbria P	Adhesión al epitelio de la mucosa y a la matriz tisular, inducción de citocinas.
Fimbria S	Adhesión a la célula de la mucosa, células endoteliales y a la matriz tisular.
Fimbria F1C	Adhesión a la célula de la mucosa y endoteliales.
Curli	Adhesión a las células de la mucosa y a la matriz tisular, formación de biopelícula.
Flagelo	Movilidad.
Capsula	Efectos antifagocitarios y anticomplemento, resistencia sérica y evasión del reconocimiento inmune.

Lipopolisacárido	Efectos endotóxicos, antígeno O, inducción de citosinas, resistencia sérica, inmunoadyuvante.
Proteínas de membrana externa	Receptor y transporte.
Exportado	
α – Hemolisina	Citotoxicidad, hemolisis.
Factor citotóxico necrotizante 1	Interferencia entre la fagocitosis y apoptosis.
Toxina secretada autotransportadora	Citotoxicidad.
Toxina dilatadora citoletal	Citotoxicidad.
Citolisina A	Citotoxicidad.
Enterobactina	Captación de hierro.
Aerobactina	Captación de hierro.
Yersiniabactina	Captación de hierro.

Figura 1. Factores de virulencia de las cepas de *Escherichia coli* involucradas en infecciones urinarias⁽²⁰⁾.

Es el cultivo de orina para diagnosticar infección sintomática del tracto urinario o infección asintomática (bacteriuria asintomática) en pacientes con riesgo de infección. Está basada en la presencia de un número significativo de bacterias generalmente >100.000 UFC/ml. La piuria junto con la bacteriuria, es un dato muy importante para el diagnóstico de infección del tracto urinario, debido a que prácticamente está presente en todas las infecciones urinarias. Una excepción es la bacteriuria asintomática en la que la piuria puede estar ausente⁽³²⁾.

2.2.3. BETALACTAMASAS

Las betalactamasas son enzimas fijadoras de penicilina que catalizan la hidrólisis del anillo betalactámico separando el enlace amida impidiendo al antibiótico inhibir la síntesis de la pared celular. Pueden localizarse a nivel endocelular o a nivel

extracelular⁽³³⁾. En las bacterias gram negativas los betalactámicos entran a la célula a través de las porinas⁽³⁴⁾.

Un anillo betalactámico es un heterociclo de cuatro átomos, que tiene un oxígeno en posición β con relación al nitrógeno de la lactama, siendo esencial para la acción de los antimicrobianos betalactámicos; sin embargo, aislado carece de actividad antimicrobiana, por lo que necesita ser activado por otros radicales para unirse a las dianas donde ejerce su acción. La naturaleza de los radicales esenciales que se unen al anillo betalactámico, definen los diferentes grupos o clases de antibióticos betalactámicos⁽²⁶⁾.

2.2.3.1. BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)

El mecanismo frecuente por el cual se desarrolla de resistencia a *Escherichia coli*, es la producción de betalactamasas, debido a que estas son enzimas que modifican químicamente el anillo betalactámico. Se ha descrito que las principales bacterias productoras de betalactamasas son los gérmenes urinarios. En nuestro ámbito, las BLEE más frecuentes son *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*⁽²⁵⁾. Se han aislado y caracterizado numerosos tipos de betalactamasas y se han clasificado desde un punto estructural (Ambler) y funcional (Bush, Jacoby y Madeiros). Las betalactamasas se unen al grupo carboxilo y rompen el enlace amídico del anillo betalactámico lo cual hace que se pierda la capacidad de unión a las PBP. (Figura 2)^(33, 35).

Se han descrito más de 200 β -lactamasas diferentes, algunas son específicas para penicilinas o cefalosporinas, mientras que otras son capaces de inactivar la

mayoría de antibióticos β -lactámicos⁽³⁶⁾. Este último grupo de β -lactamasas están codificadas en plásmidos y pueden transferirse de un organismo a otro⁽³⁷⁾.

Grupo funcional	Clase molecular	Microorganismos	Inhibición	Configuración
Grupo 1 de Bush	Clase C de Ambler	Gram negativos	No se inactivan con ácido clavulánico	Cromosómica
Grupo 2 de Bush	Clase A de Ambler	Gram negativos	Ácido clavulánico	Plasmídica
	Clase D de Ambler		Ácido clavulánico (en grado variable)	
Grupo 3 de Bush	Clase B de Ambler metalobetalactamasas	Gram positivos Gram negativos	Quelantes (EDTA)	Cromosómicas y Plasmídicas

Figura 2. Clasificación de betalactamasas de Bush, Jacoby y Medeiros

(modificado)⁽³³⁾.

A los microorganismos se incorporan piezas genéticas (plásmidos o transposones conjugativos) portadores de genes de betalactamasas que modifican el perfil de sensibilidad natural de las cepas salvajes de enterobacterias a los antibióticos β -lactámicos. Las betalactamasas plasmídicas son generalmente, constitutivas (no inducibles). Por lo tanto, todas estas enzimas pueden ser producidas a bajo nivel o hiperproducidas⁽²⁾.

Las BLEE generalmente se refiere a enzimas codificadas por plásmidos; éstos representan un mayor problema epidemiológico por su capacidad elevada de diseminación entre cepas de la misma especie o entre cepas distintas⁽²⁷⁾. La mayoría de las betalactamasas inactivan ya sea penicilinas o cefalosporinas de amplio espectro, y de allí su denominación como BLEE, confieren resistencia a las penicilinas, a todas las cefalosporinas y al aztreonam pero no a los carbapenems ni a las cefamicinas y la mayoría son inhibidas por el ácido clavulánico⁽³⁴⁾.

Las enterobacterias productoras de BLEE son generalmente patógenos nosocomiales y a menudo responsables de los brotes especialmente en las unidades de cuidados intensivos. La mayoría de los pacientes hospitalizados siguen llevando enterobacterias productoras de BLEE por períodos prolongados contribuyendo a su propagación extrahospitalaria. Además, cepas adquiridas en la comunidad que poseen plásmidos productores de BLEE pueden ser inducidas cuando se exponen a antimicrobianos de amplio espectro⁽³⁶⁾.

2.2.3.2. Betalactamasas cromosómicas

La mayoría de las bacterias gram negativas poseen betalactamasas cromosómicas que podrían derivar de las penicillin binding proteins (PBP) con las que comparte alguna homología. Todas las enterobacterias excepto *Salmonella spp*⁽³⁵⁾, como diversas bacterias de otros grupos, puede poseer en su cromosoma un gen que codifica la producción de β - lactamasas; la β -lactamasa cromosómica es de clase A (sensible al ácido clavulánico) se expresa a niveles bajos, por lo que resultan escasamente operativas, debido a que la cantidad producida no es suficiente para inactivar a los betalactámicos o solo afecta a los más lábiles como la ampicilina⁽²⁾.

2.2.4. Tipos de betalactamasas de espectro extendido

2.2.4.1. BLEE tipo TEM

β - lactamasas TEM-1 La primera enzima mediada por un plásmido y encontrada en una enterobacteria, el nombre de TEM es una contracción de Temoniera, el nombre de la paciente de la cual se realizó el aislado⁽³⁷⁾. El tipo TEM-1 es el más frecuente y se encuentra en bacterias gram negativas. Más del 90% de las resistencias a ampicilina en *Escherichia coli* son debidas a la producción de TEM-

1. A pesar de que las betalactamasas de tipo TEM se encuentran principalmente en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. La sustitución aminoacídica responsable del fenotipo BLEE permite el acceso a nuevos sustratos, pero la apertura del sitio activo para la entrada del betalactámico incrementa la susceptibilidad a inhibidores de la betalactamasa⁽²⁰⁾.

2.2.4.2. Betalactamasas tipo SHV

El tipo SHV-1 fue inicialmente descrito en el género *Klebsiella* como β -lactamasa cromosómica⁽³⁵⁾. El tipo SHV-1 es responsable de más del 20% de las resistencias a ampicilina mediadas por plásmidos en esta especie. Se conocen más de 60 variedades de SHV, siendo el tipo predominante de BLEE en Europa y en los Estados Unidos⁽²⁰⁾.

SHV-7 fue la primera enzima de esta clase aislada en *Escherichia coli* en 1995 en una residencia geriátrica en Estados Unidos. Confiere resistencia a cefotaxima, ceftazidima y aztreonam. Las betalactamasas SHV-2, SHV-3, SHV-4, SHV-5 y SHV-7 poseen en la posición 238 una serina en vez de glicina, lo cual es responsable de la acción sobre cefotaxima. La sustitución de lisina por glutámico en la posición 240 en SHV-4, SHV-5 y SHV-7 contribuye a ampliar el espectro de acción a ceftazidima y aztreonam. (Bradford, Urban et al. 1995)⁽³⁵⁾.

2.2.4.3. Betalactamasas tipo CTX - M

Las betalactamasas CTX - M constituyen un grupo de BLEE que hidrolizan más eficazmente cefotaxima que ceftaxidima, a diferencia de las otras BLEE. Se describieron en 1989, cuando Bauernfeind y cols informaron de una cepa de *Escherichia coli* que producía una BLEE que no era TEM ni SHV y que hidrolizaba

cefotaxima, a la que llamaron CTX-M-1⁽³³⁾. Las betalactamasas CTX-M se han diseminado muy rápidamente por todo el mundo entre una gran variedad de enterobacterias. CTX-M-9 fue identificado por Sabaté y cols. En la actualidad las enzimas CTX-M están reemplazando a la TEM y SHV y está aumentando el porcentaje de aislamiento en *E. coli* y en pacientes comunitarios⁽³⁵⁾. Actualmente CTX-M 15 es la enzima BLEE mas identificada en el mundo⁽²⁵⁾.

2.2.4.4. Betalactamasas tipo OXA

Las betalactamasas tipo OXA son conocidas como las menos comunes, pero también como la única variedad que puede hidrolizar la oxacilina y otras penicilinas relacionadas con estafilococos. Se caracterizan por su gran actividad hidrológica contra la oxacilina y cloxacilina y el hecho de que son pobremente inhibidas por el “ácido clavulánico”. Mientras que la mayoría de BLEE se han encontrado en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* y otras enterobacterias, la BLEE tipo OXA ha sido encontrada principalmente en *Pseudomona aeruginosa*. Los distintos tipos de OXA son resistentes principalmente a ceftazidima, pero OXA-17 otorga gran resistencia a cefotaxima y cefepime, mucho mayor que a ceftazidima⁽²¹⁾.

2.2.5. TÉCNICAS PARA DETECCIÓN DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

Existen múltiples técnicas para detectar BLEE en gram negativos, los cuales se basan en la capacidad del ácido clavulánico para incrementar la actividad de una cefalosporina de tercera generación⁽⁵³⁾.

El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) estableció recomendaciones para el tamizaje y confirmación de BLEE en *Escherichia coli* y *Klebsiella sp* y *Proteus mirabilis*⁽⁵⁴⁾ Mediante el método de difusión y su aplicación al estudio de sinergia entre cefalosporina de tercera generación y ácido clavulánico descrito por Jarlier et al⁽⁵⁵⁾.

2.2.5.1. Método de disco difusión

También conocido como Test de Jarlier, se inocula una placa de agar muller hinton con la cepa sospechosa, con una turbidez similar a la suspensión 0,5 de Mc Farland, se coloca un disco Amoxicilina/Ácido clavulánico (20/10 mg), ceftazidima (30 mg) y/o cefotaxima (30 mg) y/o aztreonam (30 mg) y/o ceftriaxona, con los que se realiza un test de disco difusión sin ninguna variante. Los discos de ceftazidima, aztreonam, cefotaxima y ceftriaxona se disponen a 25 - 30 mm del disco de amoxicilina/ácido clavulánico (distancia de centro a centro de los discos).se incuba a 37 °C por 18 – 24 h; posteriormente se realiza la lectura⁽⁵⁶⁾. La presencia de BLEE se manifiesta por el efecto sinérgico del inhibidor y los discos de cefalosporinas. Esta sinergia, es llamada "efecto huevo" o cola de pez (test de Jarlier)^(52, 57).

Método CLSI

Las placas de agar Mueller Hinton son inoculadas con las cepas sospechosas, para ello según las recomendaciones del CLSI, colocándose discos de susceptibilidad antimicrobiana de CAZ (30 µg), ceftazidima/ácido clavulánico (CAZ/CAZ-CLA) (30/10 µg), CTX (30 µg), cefotaxima/ácido clavulánico (CTX/CXT-CLA) (30/10 µg)⁽⁵⁸⁾. Una diferencia mayor o igual a 5 mm de los diámetros de los

halos de inhibición entre los discos de ceftazidima/ácido clavulánico (30/10 µg) y ceftazidima solo o cefotaxima-ácido clavulánico (30/10 µg) y cefotaxima es interpretada como resultado positivo⁽⁵⁹⁾.

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MALDI-TOF) permite obtener en unos minutos la identificación de microorganismos tales como bacterias (incluyendo micobacterias), levaduras y hongos filamentosos⁽⁵⁹⁾, es una metodología confiable, económica y rápida, que muestra resultados promisorios al compararlo con métodos convencionales. Se han publicado reportes que indican que puede ser utilizado con buenos resultados en la identificación a partir de muestra directa, con protocolos publicados para urocultivo y hemocultivo, destacando el aporte que esto significa en el manejo clínico. Sin embargo, la aplicación de los protocolos publicados para hemocultivo, resulta laboriosa e interrumpe el flujo normal de trabajo de un laboratorio⁽⁶⁰⁾.

Métodos genotípicos

Permiten identificar las BLEE Genotípicamente y llevar a cabo la investigación epidemiológica, saber que los brotes son epidemiológicamente complejos, pudiéndose tratar de la proliferación clonal de una cepa productora de una única BLEE, pero también diseminarse diversas BLEE en el mismo brote, por la proliferación clonal de varias cepas con distintas BLEE o por la existencia de diferentes plásmidos entre los miembros de una misma cepa. Adicionalmente, microorganismos no relacionados genotípicamente pueden producir la misma BLEE mediante transferencia plasmídica y la misma BLEE puede ser mediada por plásmidos distintos. La capacidad de propagación de las BLEE es extraordinaria

y, de hecho, se ha comprobado la transmisión interhospitalaria, interurbana e incluso entre países. Los métodos más utilizados son el perfiles plasmídicos, electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), ribotipificación y otros métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)⁽⁶¹⁾.

2.2.6. BIOFILM

En 2002 Donlan efectuó una descripción ampliamente aceptada de un biofilm, estableciendo que es una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un substrato o interfase encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido, y exhiben un fenotipo modificando en relación con la tasa decrecimiento y transcripción génica⁽³⁸⁾.

Las bacterias han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir en un ambiente de condiciones adversas y que les facilitan escapar de la acción de las células de defensa y del sistema del complemento. Evitando así la destrucción por parte de los fagocitos, causan inmunosupresión e inducen la proteólisis de las inmunoglobulinas. El modo de crecimiento en biofilm es una estrategia de supervivencia de los microorganismos frente a las condiciones ambientales adversas⁽³⁹⁾. La capacidad de formación de biofilm no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biofilm⁽⁴⁰⁾.

COMPOSICIÓN DE LOS BIOFILMS
Agua 97 %, células bacterianas 15 a 20 %, elementos de lisis bacteriana.
Exopolisacáridos (EPS): Componente fundamental producido por las propias bacterias.
En menos cantidad: Sustancias poliméricas extracelulares (SPE) compuestas por proteínas ácidos nucleicos y polisacáridos.
Material no bacteriano: cristales de sales minerales partículas de corrosión y/o sedimento o componentes sanguíneos según el medio donde se desarrolla el biofilms.
Los EPS pueden tener carga neutra o carga polianiónica según el exopolisacárido que le permite interactuar con diferentes antimicrobianos sin capacidad de actuar sobre las bacterias.

Figura 3. Composición de los biofilms⁽⁴¹⁾.

2.2.6.1. Composición de los biofilm

Toda comunidad microbiana desarrollada en biofilm es única en su género, aunque algunos atributos se consideran universales.

Los biofilm están implicados en infecciones crónicas lentas, resistentes a los tratamientos, se forman en superficies de tejidos naturales e implantes artificiales infecciones de válvulas cardíacas nativas o protésicas, prótesis articulares, catéteres diversos, ITU, etc. colonizados por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida sp.* y otros oportunistas⁽⁴²⁾.

2.2.6.2. Factores intervinientes en la formación del Biofilm

La formación de biofilm está determinada por:

A. Condiciones de la superficie: Poseen varias características las superficies solidas que son fundamentales para el proceso de adhesión. La colonización de gérmenes aumenta cuando la rugosidad de la superficie incrementa y el

área de superficie es mayor las propiedades fisicoquímicas pueden predominar en la adhesión microbiana, es más rápida en superficies hidrófobas como teflón y otros plásticos que sobre materiales hidrofílicos como el vidrio o metales⁽⁴²⁾.

B. Especies bacterianas: Los microorganismos son capaces de colonizar variedades de superficies en ambientes bióticos o abióticos habitados por formas superiores de vida y espacios adversos. Además, la superficie hidrófoba de la célula⁽⁴³⁾. Por otra parte, se sabe que las células inmóviles no recolonizan las áreas de un sustrato como lo hacen las células móviles, resultando más lenta la formación de un biofilm por las células inmóviles⁽⁴²⁾.

C. Factores medioambientales: Otras características del medio acuoso como son el pH, cantidad de nutrientes, cargas iónicas, temperatura y fluidez pueden jugar un papel importante en la adhesión bacteriana al sustrato⁽⁴⁴⁾. Los organismos en una biopelícula son 1000-1500 veces más resistentes a los antibióticos que en su estado planctónico. Los mecanismos de esta resistencia aumentada difieren de una especie a otra, de antibióticos a antibióticos y de biofilms que crecen en diferentes hábitad. Otro mecanismo importante es el crecimiento de especies bacterianas en una biopelícula, lo que las hace menos susceptibles a los antibióticos bactericidas. La matriz de biofilm puede resistir la difusión de antibióticos⁽³⁷⁾.

2.2.6.3 Formación de los Biofilm

El biofilm se forma cuando la bacteria detecta ciertos parámetros ambientales, disminución o aumento de la disponibilidad de nutrientes y de hierro, cambios en la osmoralidad, el pH, la tensión de oxígeno y la temperatura⁽⁴⁵⁾. Aunque también

se pudieron observar algunas variaciones entre diferentes especies bacterianas⁽⁴⁹⁾. Las etapas del desarrollo de un biofilm son las siguientes:

A. Adhesión a la superficie: los microorganismos tras localizar la superficie donde se van a depositar desarrollan distintas estrategias. En el caso de las bacterias gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*)⁽⁴⁶⁾, comprende la unión reversible de bacterias planctónicas a las superficies⁽⁴⁹⁾. las fimbrias y los flagelos juegan un papel muy importante en esta etapa adhesión a los sustratos. En el caso de bacterias gram positivas no móviles, son las proteínas de superficie (Alt E; Bap; Esp) las que intervienen en los procesos de adhesión⁽⁴⁶⁾.

B. División celular y formación de colonias: una vez que las bacterias han conseguido adherirse al soporte, en el caso de poseer flagelos los pierden y comienzan a dividirse hasta formar microcolonias⁽⁴⁶⁾. Para ello ocurre un cambio importante en la expresión génica y las bacterias comienzan a producir adhesinas como pili tipo 1, fibras curli y antígeno 43 que contribuyen a la unión irreversible a las superficies⁽⁴⁹⁾.

C. Formación de canales: una vez formado el biofilm se produce la diferenciación celular de la zona basal y la apical del mismo. Las células inferiores mueren por la falta de oxígeno y nutrientes, que permite la creación de canales donde se produce la recircularización del medio de cultivo permitiendo la nutrición del biofilm en todas sus capas celulares⁽⁴⁵⁾. Comprende la formación y producción de la matriz de polisacáridos extracelulares. En el caso de *E. coli*, la matriz está compuesta de celulosa, poliglucosamina y ácido

colónico. El biofilm comienza a crecer y adquiere su estructura tridimensional conocida como macrocolonia⁽⁴⁹⁾.

D. Maduración y salida de células para formar nuevo biofilm: una vez que el biofilm ha alcanzado un espesor determinado⁽⁴⁵⁾, las bacterias cambian a un estado planctónico y se separan del biofilm⁽⁴⁹⁾, si son flageladas comienzan a moverse⁽⁴⁵⁾, esto podría conducir a una nueva formación de biopelícula en otra superficie y varios factores podrían desencadenar el desprendimiento de las bacterias⁽⁴⁹⁾

Además, la demostración en estudios experimentales de la capacidad que tiene *Escherichia coli* de invadir las células epiteliales vesicales y formar “comunidades bacterianas intracelulares” en el interior de biofilm, puede constituir un reservorio para *Escherichia coli* productora de las ITU recurrentes⁽⁴⁷⁾.

2.2.6.4. Papel de los biofilm en infecciones crónicas

Las infecciones crónicas progresan de manera lenta comparada con las infecciones agudas y sus síntomas por lo general en algunos casos asintomáticos. Numerosos estudios in vitro e in vivo revelan que la causa de la mayoría de las infecciones persistentes son agregado bacteriano o biofilm. Infecciones bacterianas crónicas relacionadas con formación de biofilm incluyen: osteomielitis, heridas crónicas, rinosinusitis, otitis media crónica, infecciones de tracto urinario⁽⁴⁸⁾.

2.2.6.5. Métodos de medición de formación de biofilm

- 1. Método de placa de cultivo de tejidos:** Descrito por Christensen et al. Se considera el estándar de oro para la detección de biofilm. Los organismos aislados de placas de agar se inoculan en 10 ml de medio de caldo de soya tripticasa con 1% de glucosa, se incuba a 37° C por 24 hrs. Posteriormente el cultivo se diluye 1:100 con medio fresco. Los controles también se incuban y se agregan a los pozos. Los pozos se incuban a 37°C por 24 hrs. El biofilm formado por las bacterias se adhiere a los pozos se fija con acetato sódico al 2% y tinción cristal violeta (0.1%). Post densitometría óptica se mide adherencia de biofilm con una longitud de onda 570 nm⁽⁴⁸⁾.
- 2. Método Agar Rojo Congo:** Descrito por Freeman et al. Método cualitativo para detección de producción de biofilm usando medio Agar Rojo Congo, el cual se prepara con infusión corazón cerebro 37g/l, sucrosa 50g/l agar No 1 10g/l e indicador rojo congo 8 g/l. Se incuba el organismo a 37°C por 24 hrs de forma aeróbica. La producción de colonias negras rugosas por cepas productoras de baba se utilizó para diferenciarlas de cepas de *S. aureus* que no producen baba (colonias rojas lisas). El locus de adhesión intercelular (Ica) está formado por los genes Ica ADBC⁽⁴⁸⁾.
- 3. Método de tubo:** Descrito por Christensen et al. Método cualitativo en la detección de biofilm. Se incuba el microorganismo estudiado en 10 ml de medio de caldo de soya tripticasa con 1% de glucosa en tubos. Se incuba a 37°C por 24 hrs. Se tiñen los tubos con cristal violeta (0.1%), se considera formación de biofilm positivo cuando se visualiza una película en la pared en el fondo del tubo. La cantidad de biofilm formada se mide como 1- débil/ninguna, 2-moderada y 3- alta/fuerte⁽⁴⁸⁾.

Otros métodos para la medición de biofilm: ensayo bioluminiscente, sensor piezoeléctrico, examinación fluorescente microscópica. Algunos estudios reportaron una relación entre la formación de biofilm reportada por la prueba en placas de microtitulación o de 96 pozos y la realizada por microscopía epifluorescente, sugiriendo que el primero puede ser usado como un método simple en la evaluación de formación de biofilm⁽⁴⁸⁾.

Según Plinio, las cepas de *Escherichia coli* son responsables de más de 80% de todas ITU, el crecimiento como bacterias asociadas a biofilm permite también una mayor resistencia a la respuesta inmune y dificulta la acción de antimicrobianos contra el patógeno. Actualmente se asocia la capacidad de formación de biopelículas a la cronificación de las infecciones bacterianas que son de difícil erradicación por terapia antimicrobiana convencional⁽²⁰⁾.

2.3. Hipótesis general

Ha: Existe asociación significativa entre la producción de betalactamasas de espectro extendido y la formación del biofilm en *Escherichia coli* aislados de urocultivo, Hospital Nacional Hipólito Unanue durante enero - junio 2018.

H₀: No Existe asociación significativa entre la producción de betalactamasas de espectro extendido y la formación del biofilm en *Escherichia coli* aislados de urocultivo, Hospital Nacional Hipólito Unanue durante enero - junio 2018.

2.4. Variables e indicadores

Operacionalización de variables (ANEXO 1)

Variable I : Formación de biofilm.

Variable II : *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido.

CAPÍTULO III

DISEÑO METODOLÓGICO

III. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Tipo de investigación.

Estudio cuantitativo, analítico estadístico, de asociación, debido a que se pretende medir la asociación entre las dos variables del estudio.

3.1.1. Metodología

El estudio es observacional, ya que el investigador no posee la facultad de manipular las variables, mide, analiza, pero no interviene.

De carácter retrospectivo, porque se registra información sobre datos que ocurrieron en el pasado.

De corte transversal debido a que las variables se midieron una sola vez y en un solo momento.

3.2. Ámbito de investigación

El Hospital Nacional Hipólito Unanue, Minsa es una institución que presta servicios de salud, nivel III-1 y es centro de referencia en Lima Este (Santa Anita, Ate, El Agustino, San Juan de Lurigancho, Chosica) y referentes de distintas provincias, brindando una atención integral básica en los servicios de salud para la población de zonas urbanas, marginal y rural.

3.3. Población y muestra.

3.3.1. Población

La población estuvo constituida por las cepas de *Escherichia coli* aisladas de urocultivos de pacientes hospitalizados, emergencia y de servicios de

consulta externa que acudieron al Hospital Nacional Hipólito Unanue, durante el periodo comprendido entre enero - junio 2018.

3.3.2. Muestreo

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, para obtener 190 cepas de *Escherichia coli* aislada de urocultivos.

3.3.3. Muestra

Se realizó el cálculo de la muestra a partir de una población de 1029 cepas de *Escherichia coli*, aislada de urocultivos de pacientes atendidos en el Hospital Nacional Hipólito Unanue durante enero a junio 2018, con una prevalencia de referencia de 83% ⁽¹⁶⁾, un margen de error de 5% y un índice de confianza de 95%, utilizando la siguiente formula se calculó una muestra mínima de 180 unidades muestrales para el estudio.

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

N = Total de la población.

Z α = 1.96 (si el índice de confianza es 95%).

p = Porcentaje de la población con el atributo esperado.

q = Porcentaje de la población que no tiene el atributo esperado 1 – p.

d = precisión, Límite aceptable de error muestral.

De esta manera la muestra fue constituida por 190 cepas de *Escherichia coli*, aislada de urocultivos en el Hospital Nacional Hipólito Unanue durante enero a junio 2018.

3.3.4. Unidad de análisis

Constituida por una cepa de *Escherichia coli*, aislada en urocultivo de paciente atendido en el Hospital Nacional Hipólito Unanue de enero a junio 2018.

3.3.5. Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Cepas identificadas como *Escherichia coli* aislada de Urocultivo en el periodo de estudio.
- Primer aislamiento de *Escherichia coli* aislado de urocultivo.
- Cepa de *Escherichia coli* aislada en cultivo monomicrobiano.

Criterios de exclusión

- Cepas de *Escherichia coli* aisladas en muestras distintas a urocultivo.
- Cepas repetidas de *Escherichia coli*.
- Cultivos contaminados con dos o más agentes bacterianos.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.

Se recolectaron cepas de *Escherichia coli* de urocultivos, identificadas según el reporte en la base de datos del servicio de Microbiología del Hospital Nacional Hipólito Unanue. Para ello se utilizó una ficha de recolección de datos simple (ver ANEXO N°3) y para la determinación de betalactamasas de espectro extendido se usó el Método de Jarlier, finalmente para la determinación de biofilm se realizó mediante el método en Placa de Cultivo de Tejido (PCT) (ver ANEXO N°4).

3.5. Plan de procesamiento y análisis de datos

3.5.1. Plan de procesamiento

Selección y conservación de muestra

Se recolectaron las cepas de *Escherichia coli*, aislados de urocultivo en el Hospital Nacional Hipólito Unanue durante enero a junio del 2018. Se seleccionaron 93 cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido y 97 cepas no productoras betalactamasas de espectro extendido. Las cepas aisladas se conservaron en crioviales con caldo Trypticase de Soya con glicerol 1% en congelación a - 20°C para ser procesadas después de la recolección de muestras (ver ANEXO N°4).

Detección de betalactamasas de espectro extendido

El procesamiento de las muestras para determinar BLEE se basó en el Método de Jarlier, que consiste en realizar el plaqueo de la cepa estudiada según la técnica de disco difusión y colocar un disco de amoxicilina/Acido Clavulánico (20/10 mg), Ceftazidima (30 mg) y/o Cefotaxima (30 mg) y/o Aztreonam (30 mg) y/o Ceftriaxona. Los discos de Ceftazidima, Aztreonam, Cefotaxima y Ceftriaxona se disponen a 25 - 30 mm del disco de Amoxicilina/Ácido Clavulánico (distancia de centro a centro de los discos), se incubó 24 horas a 35°C. La presencia de BLEE se manifestó por el efecto sinérgico del inhibidor y los discos de cefalosporinas. Esta sinergia, es llamada "efecto huevo" o cola de pez⁽⁵²⁾.

Cuantificación de la formación de biofilm

Para la cuantificación de la formación de biofilm por el método Placa Cultivo de Tejido, las cepas se cultivaron durante la noche en caldo tripticase soya

glucosado al 1%, 37°C en condiciones estáticas. Se inocularon alícuotas de 20 µl de cultivos de una noche en 180 µl de caldo tripticasa soya glucosado al 1% en 96 pocillos de fondo plano, placas de microtitulación de poliestireno, y se incubaron durante 48 horas a 37°C sin agitación. El biofilm formado por las bacterias se adhiere a los posos se fija con acetato sódico al 2% y tinción cristal violeta 0.1%. Se removió el exceso de colorante con agua desionizada y se dejó secar en la a 37°C ó 42°C. Previo a la lectura se solubilizo con alcohol 70° agregando 200 ul a los 96 pocillos y se procedió a realizar la lectura en el lector de ELISA. Post densitometría óptica se mide adherencia de biofilm con una longitud de onda $\lambda = 450 - 630$ nm. Las cepas se clasificaron de la siguiente manera: $DO \leq DOc$ = no formador de biopelícula; $DOc < DO \leq (2 \times DOc)$ = formador débil de biopelícula; $(2 \times DOc) < DO \leq (4 \times DOc)$ = formador de biopelícula moderado; y $(4 \times DOc) < DO =$ fuerte formador de biopelícula. La interpretación de formación de biofilm se realizó de acuerdo a los criterios de Stepanovic⁽⁵¹⁾.(Ver ANEXO N°5)

3.5.2. Análisis de datos

Con los registros de las muestras se realizó una base de datos en el programa WHONET versión 5.6, las cuales cuentan con una codificación numérica que se usaron en el presente estudio. Los registros del procesamiento de las muestras y el cálculo de sus resultados, se llenaron en las fichas de las muestras.

Para el análisis descriptivo univariado se utilizaron medidas de tendencia central (promedio) para valores numéricos y frecuencias absolutas (n) y relativas (%) para los valores categóricos. Los resultados son presentados en tablas de frecuencia y/o tablas de contingencia. Asimismo, se crearon gráficos estadísticos como el diagrama de barras o circular.

De todos los pacientes que se realizaron urocultivos durante los meses de enero a junio (N = 6548) del 2018, se estableció la frecuencia de urocultivos positivos, las betalactamasas de espectro extendido positivos y betalactamasas de espectro extendido negativo. Se seleccionó 190 cepas mediante el muestreo no probabilístico por conveniencia (97 fueron productor de BLEE y 93 no productor de BLEE).

Para determinar la asociación entre las variables betalactamasas de espectro extendido y la formación de biofilm se empleó el test de Chi cuadrado de independencia, así mismo se determinó la asociación entre la resistencia bacteriana y los diferentes grados de intensidad de formación de biofilm (débil, moderado, fuerte). Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico SPSS versión 23 considerando estadísticamente significativo los valores de $p < 0,05$.

3.6. Aspectos éticos.

Los derechos de los participantes de la investigación estuvieron plenamente garantizados, de quienes se les realizó cultivos de muestra como parte del procedimiento clínico habitual, siendo los riesgos de su participación nulos ya que para la investigación se utilizaron cepas aisladas de muestras clínicas, para ello se utilizó una codificación que permitió el anonimato durante el procesamiento.

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.

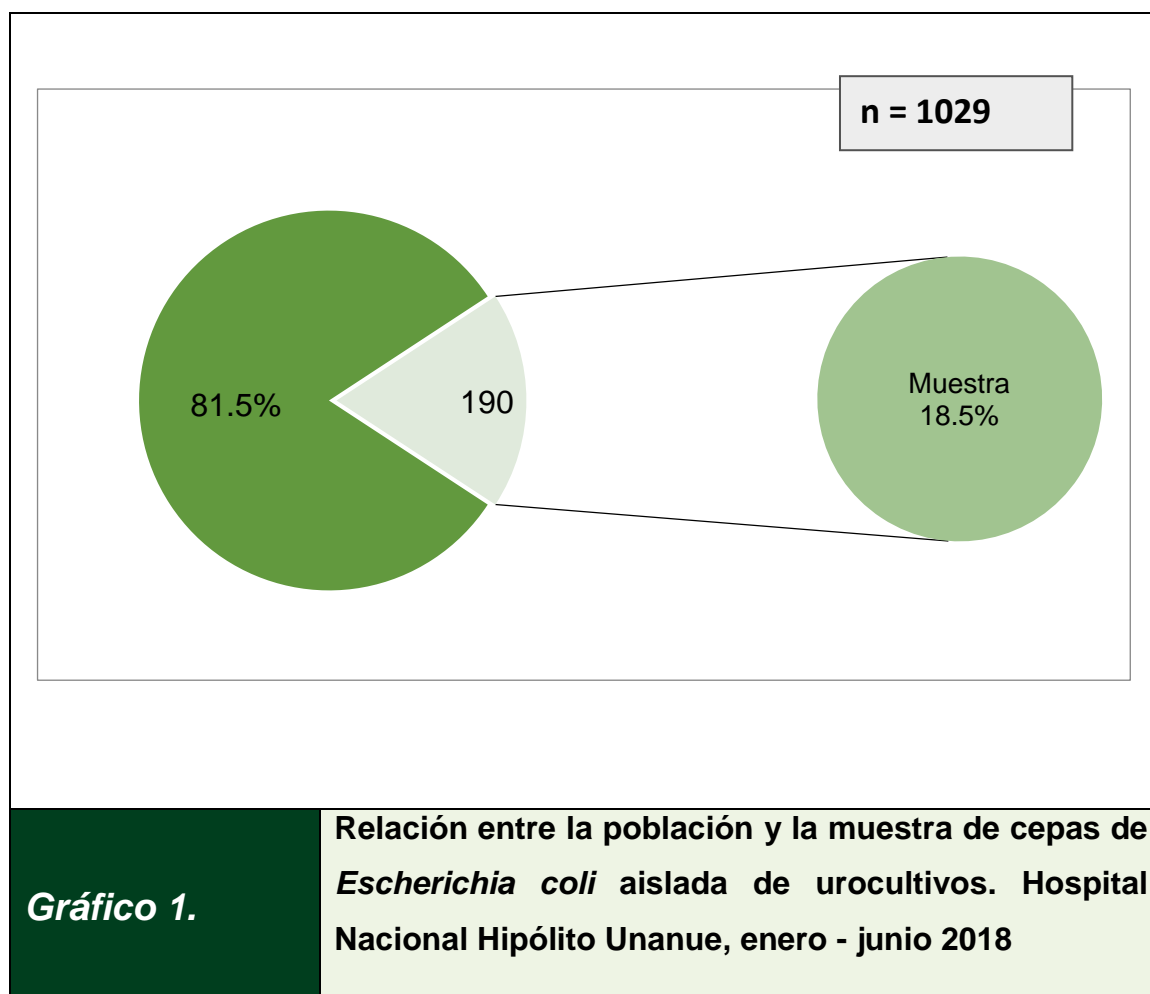
CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

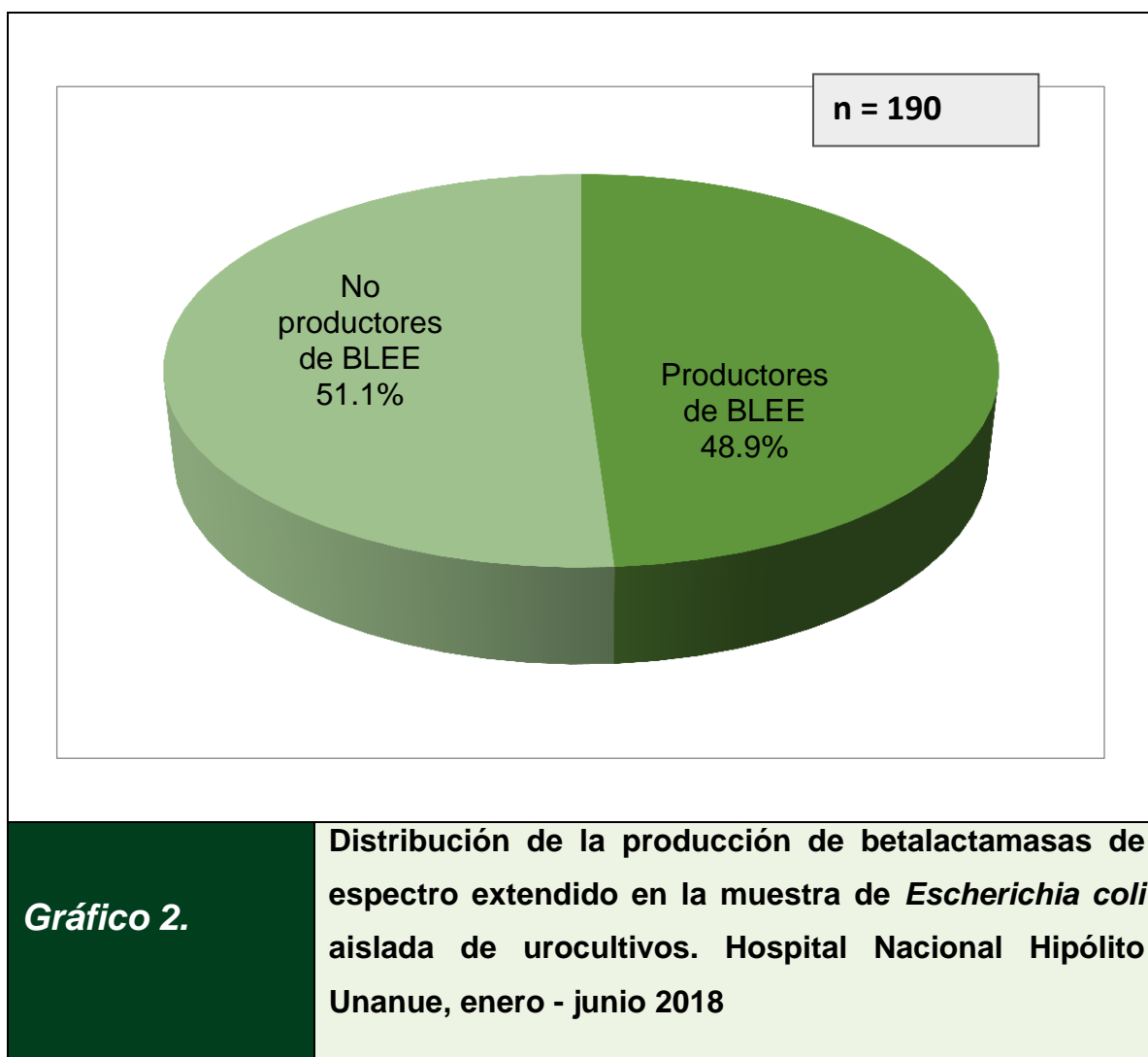
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

Durante el periodo enero a junio 2018 se aislaron 1029 cepas de *Escherichia coli* de urocultivos de pacientes con sospecha de infección urinaria, procedentes de servicios de hospitalización, emergencia y consulta externa del Hospital Nacional Hipólito Unanue. A partir de las cuales se establece el objetivo de nuestra investigación, determinar la asociación entre la formación de biofilm y la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), se seleccionaron mediante muestreo no probabilístico por conveniencia 190 aislamientos bacterianos de *Escherichia coli* aislados de urocultivos no repetidos (18,5% del total). (Grafico 1).



La muestra de 190 aislamientos bacterianos de *Escherichia coli* aislados de urocultivos, fueron distribuidas en dos grupos según la producción de betalactamasas de espectro extendido, 93 cepas eran productores de betalactamasas de espectro extendido y 97 cepas eran no productores de betalactamasas de espectro extendido. (Grafico 2)



Para evaluar la formación de biofilm y su cuantificación en las cepas de *Escherichia coli* seleccionadas se utilizó el método en placa de cultivo de tejido (PCT) y se utilizaron los criterios de Stepanovic (Anexo 2), siendo el valor de corte de la densidad óptica (DOc) definido como el valor de la media de la absorbancia del blanco más tres desviaciones estándar. El blanco consistió en el pocillo con medio caldo tripticasa soya glucosado al 1% sin inóculo del microorganismo. El valor de absorbancia media resultó de 0,009 y la desviación estándar de 0,003, por lo tanto, se estableció como valor de corte de la densidad óptica (DOc) una absorbancia de 0,018. 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 0,018, formadoras débiles de biofilm si la absorbancia del pocillo era mayor de 0,018 y menor o igual a 2 veces el valor de corte ($\leq 0,036$), formadoras moderadas de biofilm si la absorbancia del pocillo resultó mayor a 0,036 y menor o igual a 4 veces el valor de corte ($\leq 0,072$) y fuerte formadora de biofilm cuando la absorbancia supero el valor de 0,072.

A partir de las muestras de 190 cepas de *Escherichia coli* de urocultivos, mediante el método en placa de cultivo de tejido se observó 139 cepas (73,2%) de *Escherichia coli* con la capacidad de formación de biofilm (Grafico 3).

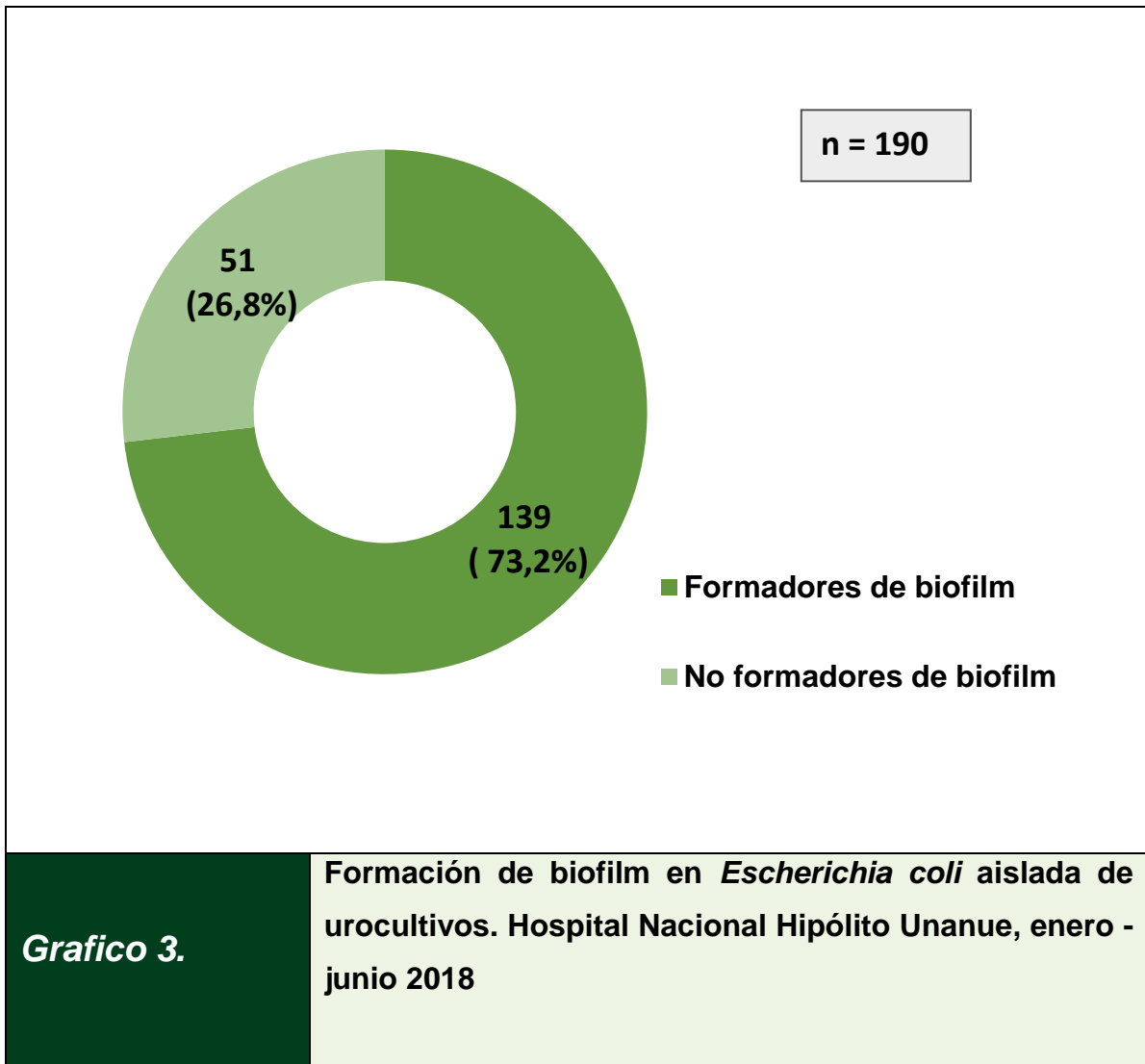


Grafico 3.

Formación de biofilm en *Escherichia coli* aislada de urocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero - junio 2018

En la tabulación cruzada entre las variables producción de betalactamasas de espectro extendido y la formación de biofilm en *Escherichia coli* aislada de urocultivos, se observa que solo 93 cepas (48,9%) presentan las características de producir enzimas β -lactamasas de espectro extendido y biofilm, mientras que 51 cepas no presentaban ninguna de las dos características. Así mismo ninguna cepa con ausencia de la capacidad de formar biofilm presento betalactamasas de espectro extendido. (Tabla 1)

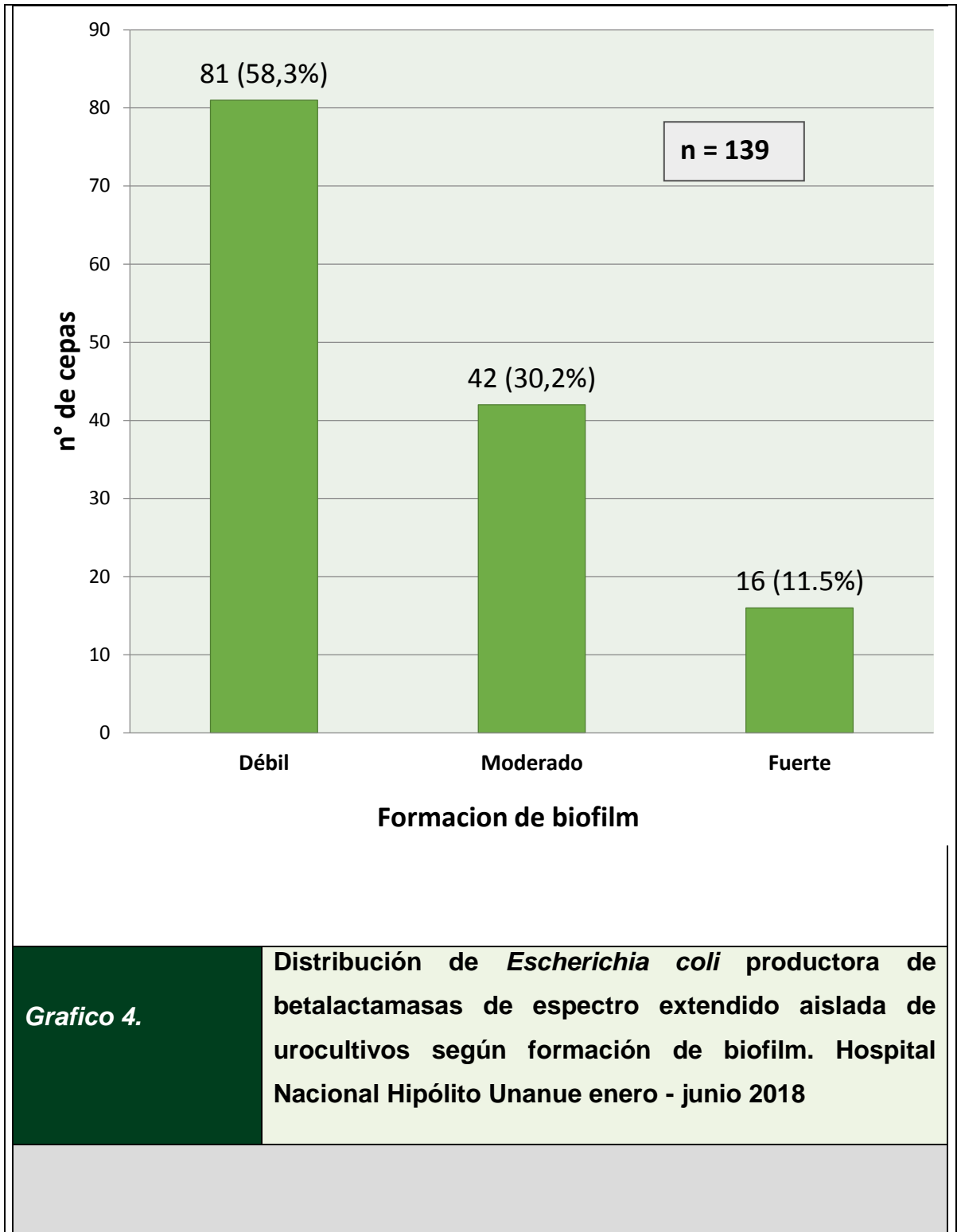
		Betalactamasas de espectro extendido			
		Presente	Ausente	Total	
BIOFILM	Presente	Recuento	93	46	51
		% dentro de BIOFILM	66,9%	33,1%	100%
Ausente	Recuento	0	51	139	
		% dentro de BIOFILM	0%	100%	100%
Total	Recuento	93	97	190	
		% dentro de BIOFILM	48,9%	51,1%	100%

Asimismo, cuando se estratificó las cepas con capacidad de formación de biofilm por su intensidad y su producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), se observa que todas las cepas con formación fuerte de biofilm presentaron BLEE (16/93) y en 42 con intensidad moderada, 40 presentaron BLEE y solo 2 no producían BLEE. Lo que nos indicaría una asociación directa positiva entre la resistencia bacteriana por producción de BLEE y la intensidad de formación de biofilm. (Tabla 2)

		BLEE			
		Presente	Ausente	Total	
Intensidad de formación de biofilm	DEBIL	Recuento % dentro de intensidad de formación de biofilm	37 45,7%	44 54,3%	81 100%
	MODERADC	Recuento % dentro de intensidad de formación de biofilm	40 95,2%	2 4,8%	42 100%
	FUERTE	Recuento % dentro de intensidad de formación de biofilm	16 100%	0 0%	16 100%
Total		Recuento % dentro de intensidad de formación de biofilm	93 33,1%	46 66,9%	139 100%

Los resultados indican que de las 139 cepas de *E. coli* con la capacidad de formación de biofilm 81 cepas (58,3%) tenían la característica de formarlo débilmente, 42 cepas (30,2%) con capacidad moderada y 16 cepas (11,5%) con formación fuerte. (Tabla 3, Grafico 4)

Formacion de Biofilm en cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de urocultivos, Hospital Nacional Hipolito Unanue, enero - junio 2018.		
Formación de biofilm	N°	(%)
Débil	81	58.3
Moderado	42	30.2
Fuerte	16	11.5
Total	139	100

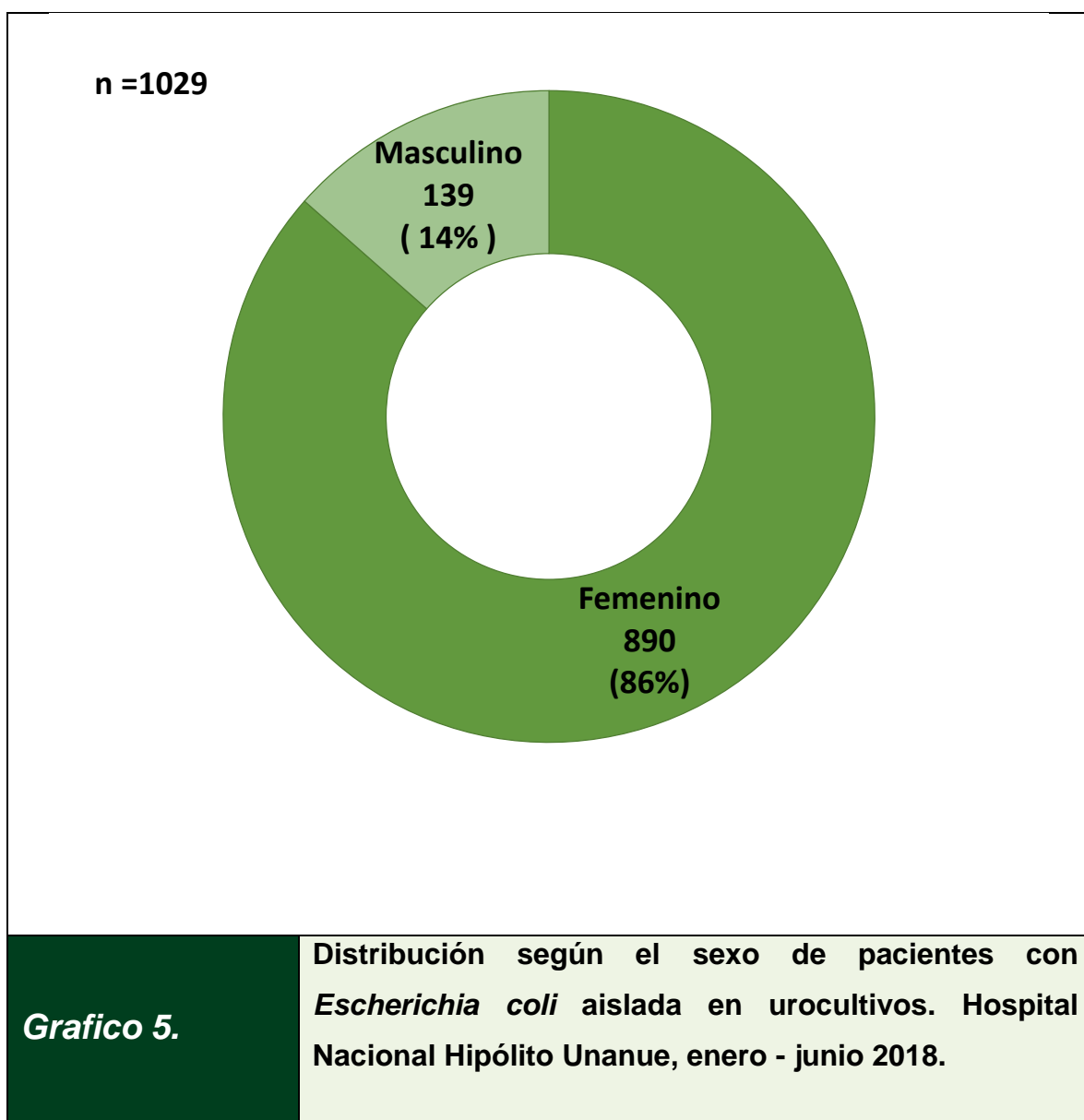


Para determinar la asociación entre las variables formación de biofilm y producción de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* aislada de urocultivos, por la naturaleza de las variables cualitativas se utilizó el estadístico Chi cuadrado.

En la tabla 4 se muestra los resultados obtenidos con el software estadístico. El Chi cuadrado es de 66,83 con un grado de libertad y el valor de p menor de 0.05 nos indica que existe una asociación significativa entre las variables la formación de biofilm y producción de betalactamasas de espectro extendido. Permitiendo demostrar que existe asociación significativa entre la producción de betalactamasas de espectro extendido y la formación del biofilm en *Escherichia coli* de urocultivo, Hospital Nacional Hipólito Unanue, durante enero - junio 2018.

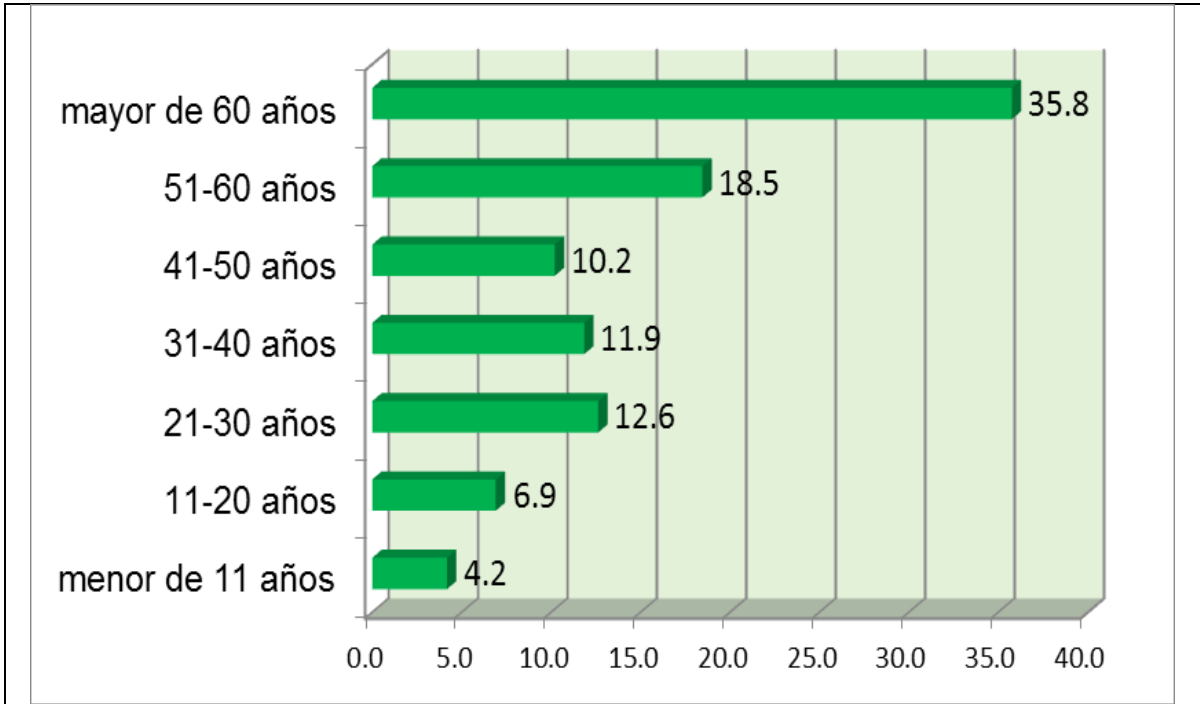
Prueba de chi cuadrado para establecer la asociación entre la producción de betalactamasas de espectro extendido y la formación de biofilm. Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero - junio 2018.					
Tabla 4.					
Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)	Significación exacta (1 cara)
Chi-cuadrado de Pearson	66,837 ^a	1	0,000*		
Corrección de continuidad ^b	64,187	1	,000		
Razón de verosimilitud	86,826	1	,000		
Prueba exacta de Fisher				,000	,000
Asociación lineal por lineal	66,486	1	,000		
N de casos válidos	190				
*P < 0,05					

Entre los factores demográficos observados en los pacientes con aislamientos de *Escherichia coli* en urocultivos, se determinó la distribución según el sexo, edad y procedencia. Se observa que de un total de 1029 pacientes con aislamientos de *Escherichia coli* de urocultivos en el Hospital Nacional Hipólito Unanue, se encontró una mayor frecuencia con 86% (890/1029) que correspondieron a pacientes del sexo femenino mientras que solo 14% (139/1029) correspondieron al sexo masculino. Presentando una relación hombre/mujer de 1:6,4 (Grafico 5)



La edad promedio en los pacientes con aislamiento de *Escherichia coli* en urocultivos fue de 50,2 con una desviación estándar de 21,5. Presentando una frecuencia de distribución por grupos de edades, encontrando con una menor frecuencia en el rango de menores de 11 años con 4,2 % (43/1029); y en el rango de 11 a 20 años 6,9% (71/1029), con una moderada frecuencia de 12,6% (130/1029) al rango de 21 – 30 años, 11,9% (122/1029) al rango de 31 – 40 años, 10,2% (105/1029) al rango de 41 – 50 años. Encontrándose una mayor frecuencia con 18,5% (190/1029) al rango de 51 – 60 años y 35,8% (368/1029) en mayores de 60 años, observa una tendencia de aumento en la frecuencia con respecto a la edad (Tabla 5, Grafico 6,).

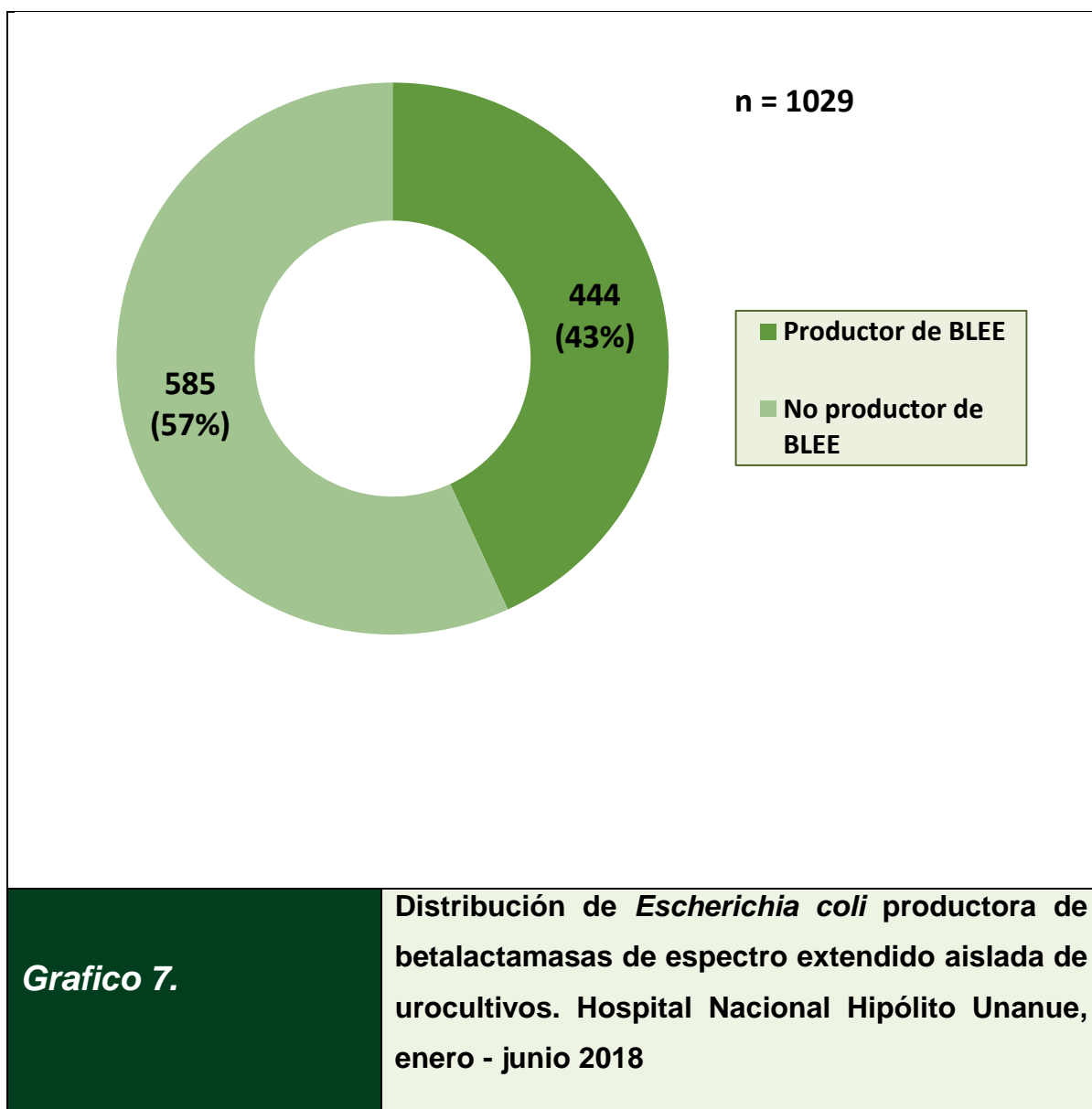
Tabla 5. Distribución según grupos de edad de pacientes con aislamientos de <i>Escherichia coli</i> en urocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero - junio 2018.		
Grupos de edad	N°	%
Menor de 11 años	43	4.2
11-20 años	71	6.9
21-30 años	130	12.6
31-40 años	122	11.9
41-50 años	105	10.2
51-60 años	190	18.5
mayor de 60 años	368	35.8
TOTAL	1029	100



Porcentaje (%)

Gráfico 6. Distribución según grupos de edad de pacientes con aislamientos de *Escherichia coli* en urocultivos. Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero - junio 2018.

En los 1029 aislamientos de *Escherichia coli* aislados de urocultivo durante el periodo enero - junio 2018, se detectaron por el método de doble difusión de Jarlier betalactamasas de espectro extendido en 444 cepas lo que corresponde a una frecuencia de 43%, y en 585 (57%) no se detectaron betalactamasas de espectro extendido. (Grafico 7)



Según la procedencia de los pacientes que presentaron urocultivos con aislamiento de *Escherichia coli*, la mayoría procedían de los servicios de consulta externa 57% (n= 585), seguido por el servicio de emergencia 30% (n= 309) y 13% (135 casos) procedían de los pacientes hospitalizados. (Grafico 8)

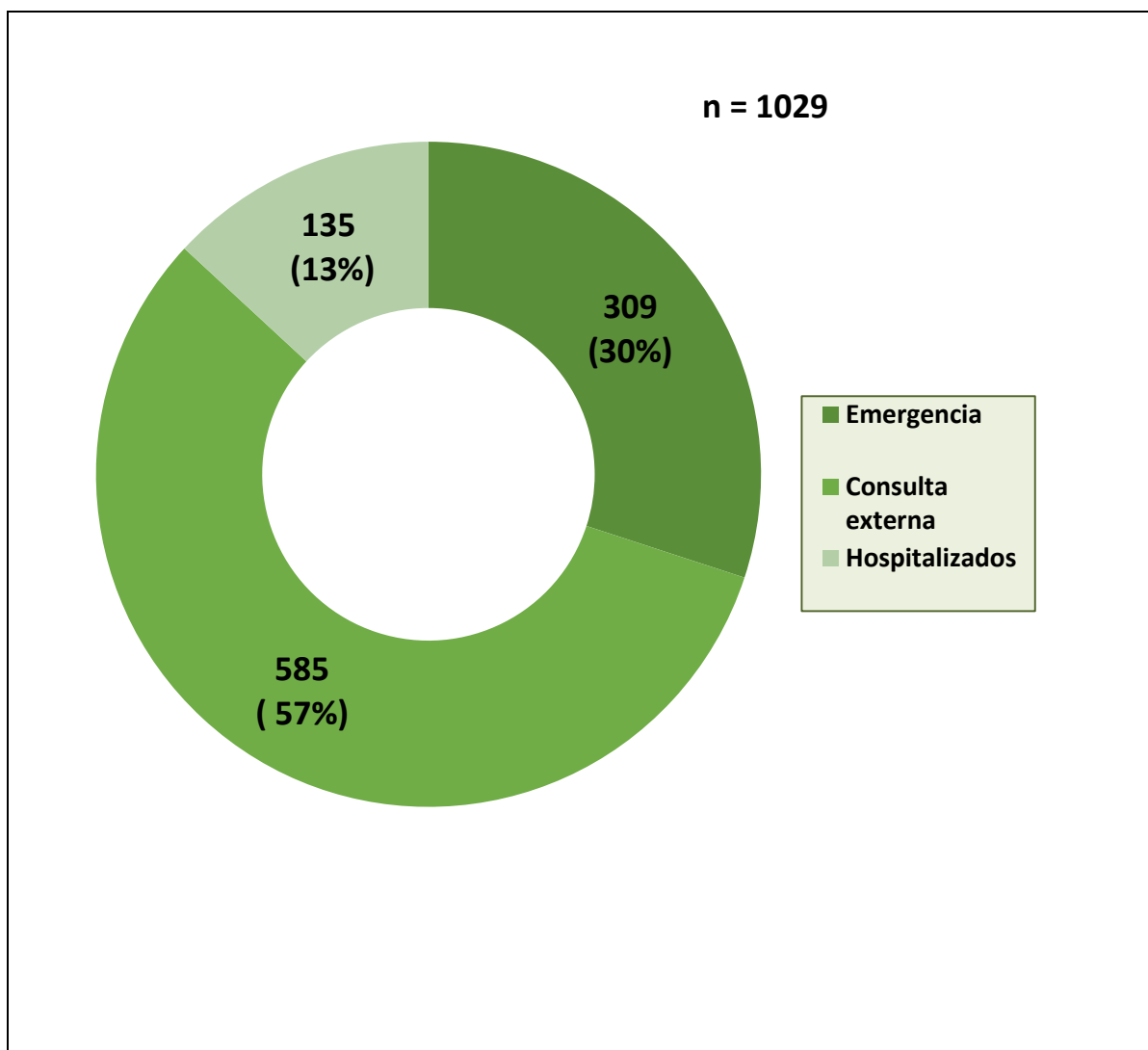


Gráfico 8. Distribución de pacientes con aislamientos de *Escherichia coli* en urocultivos según procedencia, Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero -junio 2018.

4.2. Discusión

Los factores de virulencia bacteriano favorecen el desarrollo de las infecciones en el ser humano, en nuestra investigación analizamos la formación de biofilm y su asociación con la producción de un mecanismo de resistencia a los antimicrobianos como es la producción de betalactamasas de espectro extendido.

Se encontró una alta frecuencia de betalactamasas de espectro extendido con 48.9% en cepas de *Escherichia coli* aislada de pacientes con urocultivo en el Hospital Nacional Hipólito Unanue durante el periodo de estudio, resultados no concordantes a los reportados por Dávila W. en su estudio en el 2013 en Lima encontró 9.65% fueron BLEE positivo y 90.35% fueron BLEE negativos⁽⁴⁾. Villavicencio P, en su estudio en el 2015 en Ecuador, encontró 14.29% eran productores de BLEE y no productora de BLEE 85.71%⁽⁶²⁾. Siendo las posibles causas el uso indiscriminado de los antibióticos de manera empírica, dosis, hora, antibiótico incorrecto⁽⁶³⁾, no solo matan a las bacterias sensibles y seleccionan a las resistentes, también influyen directamente los mecanismos de variación genética (mutación, recombinación, transposición, intercambio de genes). Las bacterias intercambian genes a través de sus plásmidos incrementando e induciendo la resistencia o des reprimiendo la expresión de genes necesarios para la transferencia⁽⁴⁷⁾.

Se encontró en nuestra investigación que en las 190 cepas de *Escherichia coli* seleccionadas, el 73.2% tenían la capacidad de producir biofilm, mientras que el 26.8% no tenían dicha capacidad. Prasad H, Neopane P, et al⁽⁶⁴⁾ en su estudio encontró como productores de biofilm 73.3%, no productores de biofilm 26.7%.

Del mismo modo, Pramodhini S, Niveditha S, et al⁽⁶⁵⁾ con 63% de cepas productoras de biofilm, respaldando nuestro estudio. Observando una asociación significativa entre las variables betalactamasa de espectro extendido y formación de biofilm, que podría atribuirse a una forma de subsistir de la bacteria desarrollando de esta forma protección a sí misma, sin responder a la terapia antibiótica convencional.

Al determinar la asociación entre las variables producción de betalactamasas de espectro extendido y la formación de biofilm, se observa una asociación estadísticamente significativa entre ambas variables ($p < 0,05$). De las 190 cepas aisladas encontramos que 139 tenían la capacidad de forma biofilm correspondiente al 73,2 %, resultados similares fue reportado por Prasad H, Neopane P, et al⁽⁶⁴⁾ que informan que de 80 cepas aisladas, 44 correspondiente al 63% fueron formadoras de biofilm.

Lo interesante fue encontrar en la muestra de 190 cepas de *Escherichia coli* seleccionados que el 48,9% (93 cepas) fueron productoras de betalactamasa de espectro extendido y además formadoras de biofilm (100%), lo que sugiere que la asociación de ambas variables cumplen un papel muy importante en los mecanismos de resistencia bacteriana ocasionando infecciones persistentes que responden mal a la terapia antibiótica convencional, otros estudios respaldan nuestro hallazgos como el de Pramodhini S, Niveditha S, et al⁽⁶⁵⁾ que de 26 cepas aislada con la característica de betalactamasas de espectro extendido, 24 (92,3%) también fueron formadoras de biofilm.

Cuando agrupamos la variable biofilm en base a la intensidad de su formación encontramos que en las 139 cepas con la capacidad de formación de biofilm,

58,2% presentaron una intensidad débil, 30,2% presentaron una intensidad moderada, mientras 11,6% tenían intensidad fuerte de formar biofilm. Lo que no es concordante con Neupane S. et al.⁽²¹⁾ en Nepal el año 2016, que reporta que a partir de 208 cepas aisladas, 108 (51,92%) fueron presentaron formación de biofilm, de los cuales 24 cepas fueron productoras débiles correspondientes al 11,54%, mientras que 42 cepas (20,192%) fueron formadoras moderadas y 42 cepas (20,192%) tenían la capacidad de formar el biofilm con una intensidad fuerte.

Cuando relacionamos las variable intensidad de formación de biofilm con la capacidad de las cepas de producir enzimas betalactamasas de espectro extendido (BLEE), se observó que las 16 cepas con capacidad para formar biofilm con intensidad fuerte, todas (100%) fueron productores de betalactamasas de espectro extendido, y en 42 cepas con capacidad de formación de biofilm moderada, 40 cepas (95,2%) también presentaron producción de BLEE y solo 2 no presentaron. De las 81 cepas con formación de biofilm con intensidad débil solo el 45,7% fueron productores de BLEE, observándose que a mayor intensidad de formación de biofilm mayor capacidad de producción de betalactamasas de espectro extendido, lo que sugiere una asociación directa entre la intensidad de formación de biofilm y la capacidad de producción de enzimas betalactamasas de espectro extendido.

Se evidencia en la producción de biofilm de los aislamientos de *Escherichia coli* como fuerte 11.5%, moderado 30.2% y débil 58.3%, en comparación con estudios realizados por Neupane S. en 2016 en Nepal, con cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido fueron productor fuerte de biofilm 29%,

productor moderado de biofilm 31.9% y productor débil de biofilm 39%⁽²¹⁾. Según Plínio F. el 2010 en Madrid con 15 cepas de *Escherichia coli* estudiadas 46,7% fueron productoras de biofilm fuerte, mientras 53,3% fueron clasificadas como formadoras débiles de biofilm⁽²⁰⁾. De acuerdo a nuestro estudio se observa que la producción de biofilm por *Escherichia coli* se encontró con una mayor frecuencia en los formadores de biofilm débil (58,3%), esto podría ser debido a que los biofilm degradan la actividad de los antimicrobianos, mecanismos que contribuyen a detener la acumulación de los medicamentos hasta una concentración efectiva de la bacteria ubicado en la base de las biofilm.

En nuestro estudio la distribución según la procedencia de pacientes con aislamiento de *Escherichia coli* de urocultivos presento una prevalencia de 43% (444/1029) de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido, los mayores casos correspondieron a consulta externa 57%, seguidos por emergencia 30% y 13% pacientes de hospitalización. Dichos resultados fueron similares al estudio realizado por Macero R. y Galindo T. en 2017 Cuenca - Ecuador, que presento una mayor frecuencia en consulta externa con 37.8%, en el servicio de emergencia 34.1% y en el servicio de hospitalización 26.8%⁽⁷²⁾. Según Díaz J. et al. en el 2015 Ica - Perú en el Hospital Regional de Ica presento una frecuencia de 12% en el servicio de emergencia datos que coinciden con nuestro estudio⁽⁷³⁾. De acuerdo a nuestro estudio se evidencia mayor frecuencia en pacientes procedentes de consulta externa debido a que las infecciones urinarias son una de las patologías más demandadas y el manejo terapéutico con antimicrobianos suele realizarse de manera ambulatoria, siendo el manejo de las infecciones urinarias complicadas direccionadas con la hospitalización.

En nuestro estudio, los urocultivos procesados fueron de 6548, de los cuales 5519 resultaron negativos y 1029 positivos para aislamientos de *Escherichia coli*, representando el 84% y 16 %. Según Vega K.⁽⁶⁷⁾ en su estudio encontró similitud en cuanto a la cantidad que se aísla, sin embargo, los números de casos no coinciden con nuestro estudio evidenciándonos así que por diversos factores asociados podemos, experimentar las infecciones del tracto urinario representando así un problema médico frecuente y se las considera de gran importancia debido a las complicaciones que pueden ocasionar en diferentes grupos etarios.

En nuestro estudio la distribución de pacientes con aislamientos de *Escherichia coli* en urocultivos, según el sexo el 86% (890) correspondieron a urocultivos de pacientes del sexo femenino, mientras que solo el 14% (139) correspondieron al sexo masculino, explicable por razones anatómicas. Esta frecuencia es similar al estudio de Cruz I. en el año 2008 en Tacna - Perú donde se encontró que el sexo femenino constituyó el 89,1% de casos sobre el sexo masculino 10,9%⁽⁶⁶⁾. Según Vega K. en el año 2016 encontró un predominio del sexo femenino que constituye el 80,1% de casos (245) sobre el sexo masculino 19.9% (61)⁽⁶⁷⁾. Pero según León P. y Vasquez G. en su estudio en el 2013 en Cuenca, nos indica que presenta un predominio de género femenino con 87.59% sobre el sexo masculino con un 12,41%⁽⁶⁸⁾. La elevada prevalencia de infecciones urinarias en el sexo femenino se explica por factores como el embarazo que trae consigo cambios fisiológicos y anatómicos importantes, la actividad sexual, la variación del pH, el influjo hormonal y las condiciones anatómicas de las mujeres que favorece la

colonización de la uretra por enterobacterias que habitan en el tracto gastrointestinal⁽³⁶⁾.

Las infecciones del tracto urinario representan un problema médico frecuente y se las considera de gran importancia debido a las complicaciones que pueden ocasionar en diferentes grupos etarios. En nuestro estudio los pacientes con aislamientos de *Escherichia coli* en urocultivos, en su distribución por grupos de edad se observó una tendencia al aumento de la frecuencia con respecto a la edad de 51 - 60 años 18.5% y en mayores de 60 años con 35.8%, haciendo un global de 54.3%. Mientras que se observa en menor frecuencia en otros grupos de edad. Resultados no concordantes al realizado por Macero R. y Galindo T. en el año 2017, que encontró un 20.7% en pacientes de 51 - 60 años y en mayores de 60 años un 17.1%⁽⁷²⁾. Según Bedoya A. en el año 2017 observó que 5% se encontraban entre los 15 a 17 años que corresponde a la etapa de vida adolescente, 54% tenían entre 18 a 29 años que corresponde a la etapa de vida adultos jóvenes y 41% estaban entre los 30 a 49 años que corresponde a la etapa de vida adulta⁽⁷⁰⁾. Según Fonseca F. en el año 2017, las cepas de *E. coli* fueron más frecuentes en pacientes 1-4 años en 50%⁽⁷¹⁾. Los factores de riesgo de infección urinaria sintomática en el anciano son la edad, el sexo, la instrumentación urinaria, los problemas por obstrucción anatómica o funcional y diabetes⁽⁴⁷⁾.

Se evidencio que la mayor frecuencia de casos correspondió a los meses de enero (18%) y marzo (17%), el mes de febrero y mayo presentaron los porcentajes más bajos 13% y 14 % respectivamente, mientras que los meses de

abril y junio presentaron una frecuencia de 16%. (Grafico 9) Los estudios sobre la incidencia y la tasa de patógenos que intervienen en la etiología de las infecciones urinarias en las estaciones son escasos según Yolbas I, Tekin R, et al⁽⁷⁴⁾ y Jabun S, Khanum H, et al⁽⁷⁵⁾ también mencionan que las estaciones juegan un rol importante en los meses de enero y marzo ya que existe un alza térmica debido al verano, lo cual ocasiona que los gérmenes se multipliquen. Las ropas sintéticas, la humedad, el sudor atraen a los microorganismos en el sexo femenino y en el mes de febrero la tasa disminuye probablemente porque es el mes más corto del año disminuyendo las solicitudes en el servicio de microbiología, en abril y mayo son meses de primavera manteniéndose así una tendencia estable. Enero fue el mes que presento el mayor frecuencia de *E. coli*, observándose una ligera tendencia de casos en los primeros meses del año. Yolbas I, Tekin R, et al⁽⁷⁴⁾ y Jabun S, Khanum H, et al⁽⁷⁵⁾ respaldan nuestro estudio la estacionalidad juega un rol importante en los meses de enero, debido al verano lo cual ocasiona que los gérmenes se multipliquen. Y en el mes de febrero la tasa disminuye podemos pensar que sucede por ser el mes más corto del año disminuyendo las solicitudes en el área de microbiología, abril y mayo son meses de primavera manteniéndose así una tendencia.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Existe una asociación significativa entre la formación de biofilm y la producción de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* aislado de urocultivos en el Hospital Nacional Hipólito Unanue, 2018. ($p \leq 0,05$)
- La frecuencia de *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido aislado de urocultivos en el Hospital Nacional Hipólito Unanue fue de 43%, durante enero – junio del 2018.
- La formación de biofilm mediante el método en placa de cultivo de tejido se presento en el 73,2% de cepas de *Escherichia coli* aislado de urocultivos. Con capacidad de formación débil en 58,3%, formación moderada 30,2% y con formación fuerte 11,5% durante enero - junio 2018.
- Los aislamientos de *Escherichia coli* en urocultivos fueron predominantes en pacientes de origen ambulatorio (87%). La edad media de los pacientes fue de $50,2 \pm 21,5$ y una tendencia de aumento en la frecuencia con respecto a la edad. La distribución según el género, con mayor predominio del sexo femenino, con una relación hombre/mujer de 1: 6,4.

5.2. Recomendaciones

- Se debería implementar el método de tubo para determinar la presencia de biofilm de forma rutinaria, ya que es un método económico que ayudaría a determinar los mecanismos de resistencia bacteriana.
- Se debería evitar los tratamientos de antibióticos empírico, la automedicación y el incumplimiento del tratamiento los mismos que favorecen el mecanismo de resistencia bacteriana y la producción del biofilm.
- De acuerdo a nuestro estudio se observa un mayor predominio de infecciones de tracto urinario en mujeres, por lo que se deberían fomentar y/o realizar investigaciones en este grupo de pacientes por presentar un mayor riesgo y ser un problema de salud pública.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Callupe G. Etiología y sensibilidad antibiótica de urocultivos en población pediátrica de un hospital general peruano. CIMEL. 2014; Vol 19(1): 25 - 30.
2. León L. Multirresistencia antimicrobiana de cepas *Escherichia coli* productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) aislados en urocultivo del hospital regional “Manuel Nuñez Butrón” Puno - 2012 [Tesis] Puno: Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Ciencias Biológicas; 2014.
3. Ibarra P. Prevalencia de *Escherichia coli* productora de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en urocultivos en pacientes de consulta externa en el Hospital San Francisco de Quito en el periodo de octubre 2016 - Abril 2017 [Proyecto de Investigación] Quito: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Médicas; 2017.
4. Dávila W. Prevalencia de infecciones del tracto urinario por bacterias BLEE en las salas San Pedro y San Andrés del Hospital Dos de Mayo durante el periodo de Octubre del 2014 a Setiembre del 2015 [Tesis] Lima: Universidad Ricardo Palma, Facultad de Medicina Humana; 2015.
5. Lifonzo S, Tamariz P., et al. Sensibilidad a fosfomicina en *Escherichia coli* productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido. Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública. 2018; Vol 35 (1): 68 - 71.
6. Calle A, Colqui K., et al. Factores asociados a la presentación de infecciones urinarias por *Escherichia coli* productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido. Rev Med Hered. 2017; Vol 28: 142 - 149.
7. Miranda M. *Escherichia coli* portador de Betalactamasas de Espectro Extendido. Resistencia. Sanid. mil. 2013; Vol 69 (4): 244 – 248.
8. Duarte A. Infecciones por *Escherichia coli* y su perfil de resistencia en niños atendidos en el Hospital Infantil Manuel de Jesús Rivera “La Mascota” 1ero enero 2011 - 31 Diciembre 2015 [Informe final de investigación] Managua:

- Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Facultad de Medicina; 2016.
9. Seral C, Pardos M., et al. Betalactamasas de Espectro Extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. Rev Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; Vol 28 (1): 12 - 18.
 10. Nieto J, Aguilar F. Formas filamentosas de *Escherichia coli* uropatogena como parte del reporte bacteriológico de rutina. Rev Exp Med. 2017; Vol 3 (4): 175 – 177.
 11. Troncoso C, Pavez M., et al. Implicancias estructurales y fisiológicas de la célula bacteriana en los mecanismos de resistencia antibiótica. Int. J. Morphol. 2017; Vol. 35(4):1214 - 1223.
 12. Eberly A, Floyd K., et al. Biofilm Formation by Uropathogenic *Escherichia coli* Is Favored under Oxygen Conditions That Mimic the Bladder Environment. Article. Int. J. Mol. Sci. [Published 30 September]. 2017; Vol (18): 2077.
 13. Moori N, Javadmakoei S. Survey on Biofilm Production and Presence of Attachment Factors in Human Uropathogenic Strains of *Escherichia coli*. Research Article. Jundishapur J Microbiol. [Published online]. 2017; Vol 10 (6): 13108
 14. Avilés C, Betancour P., et al. Factores asociados a infecciones urinarias producidas por enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido: una cohorte prospectiva. Rev Chil Infectol. 2016; Vol 33 (6): 628 - 634.
 15. Chilón J. Factores asociados a infección de tracto urinario producida por enterobacterias productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido en pacientes hospitalizados en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, Enero - Marzo del 2016 [Tesis] Cajamarca: Universidad Nacional de Cajamarca, Facultad de Medicina Humana; 2017.

16. Avcioğlu N, Gülcan Ş., et al. Investigation of Biofilm Formation in Clinically Acquired *Escherichia coli* Strains. [Research Article]. Hacettepe J. Biol. & Chem. 2015; Vol 43 (1), 43 - 48.
17. Al-Kareem S, Tarik D., et al. Biofilm Formation on Intrauterine Device and Associated Infections. The Iraqi postgraduate Medical Journal. 2013; Vol 12 (4): 562 – 567.
18. Niveditha S, Pramodhini S., et al. The Isolation and the Biofilm Formation of Uropathogens in the Patients with Catheter Associated Urinary Tract Infections (UTIs). *J Clin Diagn Res.* [Article]. 2012; Vol 6 (9): 1478 - 1482.
19. Hernández R, Báez M., et al. Susceptibilidad antimicrobiana y formación de biopelícula en aislados de *Escherichia coli* procedentes de gallinas ponedoras. *Rev. Salud Anim.* [Artículo]. 2017; Vol 39 (3): 2224 – 4697.
20. Plínio F. Formación de biopelículas por *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. [Tesis] Madrid: Universidad Complutense, Facultad de Farmacia; 2010.
21. Neupane S, Dutt N., et al. Correlation between biofilm formation and resistance toward different commonly used antibiotics along with extended spectrum beta lactamase production in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from the patients suspected of urinary tract infections visiting Shree Birendra Hospital, Chhauni, Kathmandu, Nepal. [Research Article]. *Antimicrobial Resistance and Infection Control.* 2016; Vol. 5(5): 1 - 5.
22. Velez M. Influencia del Hipoclorito de Sodio en biofilms formados por *Escherichia coli*. [Tesina de licenciatura] Buenos Aires: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias; 2016.
23. Coveñas C, Dextre G., et al. Efecto de lactoferrina bovina en la formación de biofilms en cepas clínicas de *E. coli* enteroagregativa. *Rev Perú Med Exp Salud Pública.* 2014; Vol 31 (3): 454 - 60.

24. Blanco V, Maya J., et al. Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por *Escherichia coli* productor de Betalactamasas de Espectro Extendido en Colombia. Rev. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2016; Vol 34 (9): 559 - 65.
25. Gutiérrez A. Factores de riesgo asociados a infección urinaria por *Escherichia coli* productora de Betalactamasas de Espectro Extendido en pacientes hospitalizados de la clínica Maison de Santé - Sede Este: Enero - Noviembre 2015 [tesis de licenciatura] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad humana; 2016.
26. Pineda M. Frecuencia de Betalactamasas de Espectro Extendido y carbapenemasas en *Escherichia coli* y *Klebsiella sp.* aisladas de urocultivos en Hospitales de la Ciudad de Trujillo, La Libertad, 2012 [Tesis] Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Ciencias Biológicas; 2013.
27. Bueno G. Factores asociados a la infección por *Escherichia coli* y *Klebsiella sp.* productoras de betalactamasas de espectro extendido en pacientes hospitalizados del Hospital Nacional Daniel Alcides Carrión - Callao Setiembre: 2008 Diciembre 2009 [Tesis] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Humana; 2010.
28. Hernández S. Incidencia de *Escherichia coli* O157 y *Salmonella sp.* en carne de bovino comercializada en Texcoco. [Tesis de maestría] Chapingo: Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de enseñanza, investigación y servicio de zootecnia; 2013.
29. Aguilar D. *E. coli* BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras. Rev Invest Med Sur Mex. 2015; Vol 22 (2): 57 - 63.
30. Galli L. Estudio de los factores de adherencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina shiga aisladas de bovinos. [Tesis doctoral] La Plata: Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias; 2012.

31. Morote E. Prevalencia de *Escherichia Coli* BLEE en pacientes mujeres del Hospital Nacional PNP - "LNS" [Tesis de licenciatura] Lima: Universidad Ricardo Palma, Facultad de Medicina Humana; 2015.
32. Criollo A, Gutiérrez E., et al. Infección de vías urinarias, determinación del agente etiológico y sensibilidad a antimicrobianos en mujeres de 18 a 45 años de edad de la Ciudad de Cuenca 2014 [tesis de licenciatura] Cuenca: Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Médicas; 2015.
33. Navarro M. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de Beta - Lactamasas de Espectro Extendido: epidemiología clínica y molecular [Tesis doctoral] Sevilla: Universidad de Sevilla, Facultad de Medicina; 2009.
34. Morales I. Prevalencia de cepas portadoras de marcadores de resistencia (BLEE) aisladas en muestras clínicas provenientes de pacientes ambulatorios [Tesis] Zaragoza: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2014.
35. Hernández E. "*Escherichia coli*" productores de BLEE aislados de urocultivo: implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria [Tesis doctoral] Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina; 2010.
36. Orrego C, Henao C, et al. Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana. Acta Med Colomb. 2014; Vol. 39(4): 352-358.
37. Knothe H, Shah P., et al. Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection. 1983; Vol 11 (6): 315 – 317
38. Nazar J. Biofilms bacterianos. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza cuello. 2007; Vol 67: 61 - 72. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/orl/v67n1/art11.pdf>
39. Colorado C, Hernández R. Biopelícula extrarradicular: reporte de un caso clínico. Rev. Nac Odontol. 2015; Vol 11 (20): 55 – 64.

40. Lasa I, Del Pozo J., et al. Biofilms bacterianos e infección. An. Sist. Sanit. Navar. 2005; Vol 28 (2): 163 - 175.
41. Mendoza D. Efecto del tipo de envase y tiempo de incubación, sobre la formación de biofilms bajo condiciones in vitro de bacterias de interés alimentario (*Salmonella spp*, *Escherichia coli* ATCC. 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) [Tesis] Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego, Facultad de Ciencias Agrarias; 2013.
42. Barcat J. Biofilms. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina; 2005; Vol 65 (4): 369 - 372.
43. Escobar A. Extractos de plantas como inhibidores de la formación de biopelícula de *Escherichia coli* O157:H7 [Tesis de maestría] Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas; 2010.
44. Zambrano M, Suárez L. Biofilms bacterianos: sus implicaciones en salud y enfermedad [Artículo de revisión]. Univ. Odontol. 2006; Vol 25 (57):19 - 25.
45. Herrera M. El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia [Artículo de revisión] Nova publicación científica. 2004; Vol 2 (2):71 – 80.
46. Marquina D. Santos A. Procesos biológicos regulados por quorum sensing. Departamento de Microbiología III. 2010; Vol 3 (5): 56 - 74.
47. Alós J. Epidemiología y etiología de la infección urinaria comunitaria. Sensibilidad antimicrobiana de los principales patógenos y significado clínico de la resistencia. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005; Vol 23(Supl.4): 3 - 8.
48. Garciadiego P. Alta producción de biofilm en cepas de *Acinetobacter baumannii* multi - drogo resistente como factor predictor de mortalidad y persistencia en cultivos. [Tesis] Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina; 2013.
49. González M, Robino L., et al. Effect of different antibiotics on biofilm produced by uropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with

- urinary tract infection [Research article] *Pathogens and Disease*. 2017; Vol 75 (4): 1 – 9.
50. Fuentes D, Minaya G., et al. Modelo de reglamento para comités institucionales de ética en investigación en el Perú. Ministerio de Salud. INS; 2013.
51. Stepanovic S, Vukovi D., et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *APMIS*. 2007; Vol. 115: 891 - 9.
52. Padilla M. Detección de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* mediante método de jarlier. *Archivos Bolivianos de Medicina*. 2011. Vol. 16(84): 107.
53. Santos R, Quiteño C. Detección in vitro de betalactamasas de espectro extendido en aislados clínicos de *Escherichia coli* provenientes del Hospital Nacional Zacamil del Salvador. Facultad de Medicina Departamento de Microbiología e Inmunología; 2015.
54. Paredes R. Prevalencia de enterobacteriáceas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en la clínica Good Hope durante el periodo marzo - agosto del 2012. [tesis] Universidad Nacional san Marcos, Facultad de ciencias Biológicas; 2013.
55. Zemelman R, Valenzuela L., et al. Detección de β -lactamasas de espectro extendido en el laboratorio de microbiología. *Rev Chil Infect*. 2002; Vol 19: 92 - 95.
56. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
57. Colquechagua F, Sevilla C., et al. Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales en el Instituto Nacional de Salud del Niño, Perú. *Rev. RPMESP*; 2015. Vol 32(1).

58. Lezameta L, Gonzáles E., et al. Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2010; Vol. 27(3): 345 - 51.
59. March G, Bratos M. Antibiograma rápido en Microbiología Clínica. *Rev Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016; Vol. 34(1): 61 – 68.
60. Hervé B. Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico: automatización y algunas aplicaciones en identificación microbiana y estudio de susceptibilidad. *Rev med clin*. 2015; Vol. 26(6): 753 - 763.
61. Álvarez D. Identificación de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias. *Rev Haban Cienc Méd*. 2010; Vol.9(4).
62. Villavicencio P. Escherichia coli productora de betalactamasas de espectro extendido aislada en urocultivos de pacientes de consulta externa del hospital general Isidro Ayora. [Tesis] Universidad Nacional de Loja. Facultad de ciencias de la Salud Humana; 2015.
63. Aguilar D. *E. coli* BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras. *Rev. Invest Med Sur*. 2015; Vol. 22 (2): 57-63.
64. Prasad H, Neopane P, et al. Biofilm formation and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients visiting a tertiary care center of Nepal. *REV. Asian Pac J Trop Dis*. 2017; Vol. 7(6): 347-351.
65. Pramodhini S, Niveditha S, et al. Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. *Rev. Australas Med J*. 2012; Vol. 5(7):344–348.
66. Cruz I. Etiología y resistencia bacteriana de infecciones urinarias en pacientes mayores de 60 años. [Tesis] Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Facultad de Ciencias Médicas; 2008.
67. Vega K. Sensibilidad antibiótica de los uropatogenos de los pacientes ambulatorios atendidos en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza en el año 2015. [Tesis] Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Humana; 2016.

- 68.** León P, Vásquez G. Prevalencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en muestras de orina de pacientes ambulatorios de los centros de salud 1, 2 y 3 de la ciudad de Cuenca. [Tesis] Universidad de Cuenca, Facultad de ciencias químicas; 2013.
- 69.** Sandoval J. Factores de riesgo asociados a infección del tracto urinario por bacilos gram negativos beta lactamasa de espectro extendido adquiridos en la comunidad atendidos en el hospital nacional dos de mayo. [Tesis] Universidad Ricardo Palma, Facultad de Medicina Humana; 2017.
- 70.** Bedoya A. Perfil microbiológico y sensibilidad antimicrobiana en infección urinaria en mujeres en edad fértil del Hospital Guillermo Díaz de la Vega de Abancay Abril 2015 a Abril 2016. [Tesis] Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Medicina Humana; 2017.
- 71.** Fonseca F. Perfil de sensibilidad en enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido aislados de urocultivo de pacientes pediátricos con infecciones urinarias Hospital Nacional Hipólito Unanue 2015. [Tesis] Universidad Privada Norbert Wiener, Facultad de Ciencias de la Salud; 2017.
- 72.** Macero R, Galindo T. Frecuencia de *Escherichia coli* betalactamasa de espectro extendido (BLEE), en pacientes con infección de vías urinarias. Hospital José Carrasco Arteaga. Rev. Fac. Cienc. Méd. Univ. Cuenca. 2017; Vol. 35 (1): 74 - 78.
- 73.** Díaz J, Amar W., et al. Prevalencia de *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y otras resistencias en urocultivos en un hospital general de Ica, Perú. Rev méd panacea. 2015; Vol. 5(1): 20 - 24.
- 74.** Yolbas I, Tekin R, et al. Community-acquired urinary tract infections in children: pathogens, antibiotic susceptibility and seasonal changes. Rev. Eur Med Pharmaco. 2013; vol. 17: 971-976.

75. Jabun S, Khanum H, e tal. Occurrence of *Escherichia coli* infection among the women of Dhaka city. Rev. ARPN. 2010; Vol. 5(6).

ANEXOS

ANEXO N° 01

Operacionalización de variables.

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES
Formación de biofilm	Biofilm una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un substrato o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido, y exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica ⁽³⁸⁾ .	<p>Método de Placa de Cultivo de tejido (PCT)</p> <p>Las densidades ópticas (DO) se leyeron a $\lambda = 450 - 630$ nm. según criterios de Stepanovic⁽⁵¹⁾.</p>	<p>$DO \leq 0,018$</p> <p>$0,018 < DO \leq 0,036$</p> <p>$0,036 \leq DO_c < 0,072$</p> <p>$DO_c > 0,072$</p>	<p>- Negativo</p> <p>- Débil</p> <p>- Moderado</p> <p>- Fuerte</p>
<i>Escherichia coli</i> productor de betalactamasas de espectro extendido.	<i>Escherichia coli</i> es un microorganismo con capacidad de producir enzimas capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de amplio espectro y monobactámicos que derivan de enzimas tipo TEM y SHV principalmente. Se localizan en plasmidos y son transferibles de cepa a cepa entre especies bacterianas ⁽³⁰⁾ .	<p>Método de Jarlier (Comité de la Sociedad Francesa de Microbiología)</p> <p>La presencia de BLEE se manifestó por el efecto sinérgico del inhibidor y los discos de cefalosporinas. Esta sinergia, es llamada "efecto huevo" o cola de pez⁽⁵²⁾.</p>	Efecto sinérgico	<p>- Productor</p> <p>- No productor</p>

ANEXO N°02

Matriz de consistencia.

PROBLEMA	OBJETIVO	VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	POBLACIÓN	DIMENSIONES	INDICADORES
¿Cuál es la asociación que existe entre formación de biofilm y la producción de Betalactamasas de Espectro Extendido en <i>Escherichia coli</i> aislados de urocultivo, Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero a junio 2018?	<p>General:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Determinar la asociación entre la formación del biofilm y producción de Betalactamasas de Espectro Extendido en <i>Escherichia coli</i> aislados de urocultivo en el Hospital Nacional Hipólito Unanue durante enero - junio 2018. 	Formación de biofilm	Biofilm una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un substrato o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido, y exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica ⁽³⁸⁾ .	Cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de urocultivos de pacientes hospitalizados y de servicios de consulta externa HHU, durante el periodo comprendido entre enero - junio 2018.	$DO \leq 0,018$ $0,018 < DO \leq 0,036$ $0,036 \leq DO_c < 0,072$ $DO_c > 0,072$	<ul style="list-style-type: none"> - Negativo - Débil - Moderado - Fuerte
	<p>Específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Determinar la frecuencia de Betalactamasas de Espectro Extendido en cepas de <i>Escherichia coli</i> en el Hospital Nacional Hipólito Unanue durante enero - junio 2018. - Evaluar la formación de biofilm en cepas de <i>Escherichia coli</i> en el Hospital Nacional 	<i>Escherichia coli</i> productor de betalactamasas de espectro extendido.	<i>Escherichia coli</i> es un microorganismo con capacidad de producir enzimas capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de amplio espectro y monobactámicos que derivan de enzimas tipo TEM y SHV principalmente. Se localizan en plasmidos y son transferibles de cepa a cepa		<p>Muestra:</p> 190 cepas de <i>Escherichia coli</i> , distribuidas en dos grupos.	Efecto sinérgico

	<p>Hipólito Unanue durante enero - junio 2018.</p> <p>– Determinar los factores demográficos de los pacientes con aislamiento de <i>Escherichia coli</i> en urocultivo en el Hospital Nacional Hipólito Unanue durante enero - junio 2018.</p>		entre especies bacterianas ⁽³⁰⁾ .			
--	--	--	--	--	--	--

ANEXO N° 03: Ficha de recopilación de datos estructurada.

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE BIOFILM EN <i>Escherichia coli</i> AISLADOS DE UROCULTIVO DE PACIENTES HOSPITALIZADOS Y/O CONSULTA EXTERNA			
Código de muestra:			
Tipo de muestra:			
Edad:			
Sexo:			
Servicio de procedencia:			
Enterobacteria	<i>Escherichia coli</i> BLEE	Producción de biofilm	Negativo
			Débil
			Moderado
			Fuerte
	<i>Escherichia coli</i> NO BLEE	Producción de biofilm	Negativo
			Débil
			Moderado
			Fuerte

ANEXO N° 04: Método Placa de Cultivo de Tejido (PCT)

La formación de biopelículas de los aislamientos *Escheriachia coli* se analiza en placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos.

- ✓ Inocular las cepas clínicas de *Escherichia coli* en caldo tripticasa soya glucosado al 1% previa dilución de 1:200, incubar a 37 ° C por 24 horas.
- ✓ Se inocularon alícuotas de 20 µl de cultivos de la noche anterior en 180 µl de caldo tripticasa soya glucosado al 1% en 96 pocillos de fondo plano, placas de microtitulación de poliestireno, se utilizó como control negativo el caldo tripticasa de soya estéril glucosado al 1% y se incubaron durante 48 horas a 37°C en condiciones estáticas.
- ✓ Se eliminó el contenido de cada pocillo, luego se lavó con 200 ul de Phosphate Buffered Saline (pH 7.2) tres veces.
- ✓ Se fijó con solución de acetato de sodio al 2 % por espacio de 30 minutos y se coloreo con cristal violeta al 0.1 % por un tiempo de 30 minutos.
- ✓ Se removió el exceso de colorante con agua desionizada y se dejó secar en la estufa por 30 minutos a 37°C ó 42°C.
- ✓ Previo a la lectura se solubilizo con alcohol 70° agregando 200 ul a los 96 pocillos y se procedió a realizar la lectura en el lector de ELISA a una longitud de onda de 450 - 630 nm.
- ✓ La interpretación de la producción de biopelículas se realiza de acuerdo a los criterios de Stepanović⁽⁵¹⁾ (Ver ANEXO N°3).

ANEXO N° 05: Interpretación de la producción de Biofilm por el método de Placa cultivo de tejido (PCT).

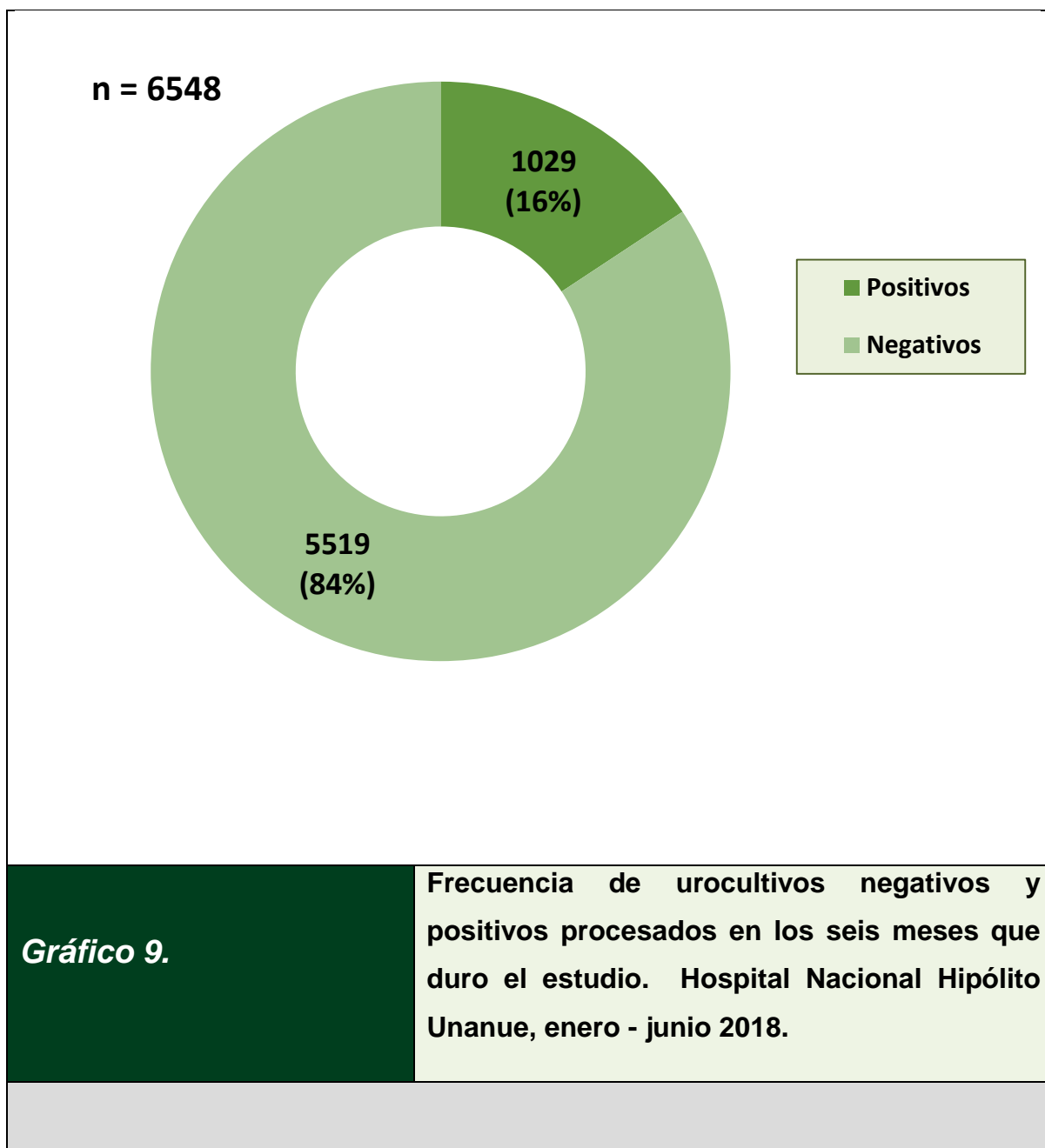
Valor promedio de la Densidad Optica	Producción de Biofilm
$DO \leq DO_c$	No productoras de biofilm
$DO_c < DO \leq 2x DO_c$	Débiles productoras de biofilm
$2xDO_c < DO \leq 4xDO_c$	Moderado productoras de biofilm
$4xDO_c < DO$	Fuerte productoras de biofilm

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

ANEXO N° 06: Criterios de interpretación Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)⁽⁵⁶⁾.

Antimicrobiano	Criterios de interpretación					
	Difusión en disco (mm)			Concentración inhibitoria mínima ug/ml		
	S	I	R	S	I	R
Cefotaxima	≥26	23-25	≤22	≤1	2	≥4
Ceftriaxona	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4
Ceftazidima	≥21	18-20	≤17	≤4	8	≥16
ceftizoxima	≥25	22-24	≤21	≤1	2	≥4
Aztreonam	≥21	18-20	≤17	≤4	8	≥16

En los seis meses que duro el estudio el número de urocultivos procesados en el hospital Hipólito Unanue fue de 6548, de los cuales 5519 resultaron negativos y 1029 positivos para aislamientos de *Escherichia coli*, representando el 84% y 16 % respectivamente.



El mes que presento el mayor número de casos positivos para *Escherichia coli* fue el mes de enero, observándose una ligera tendencia de mayor número de casos en los primeros meses del año.

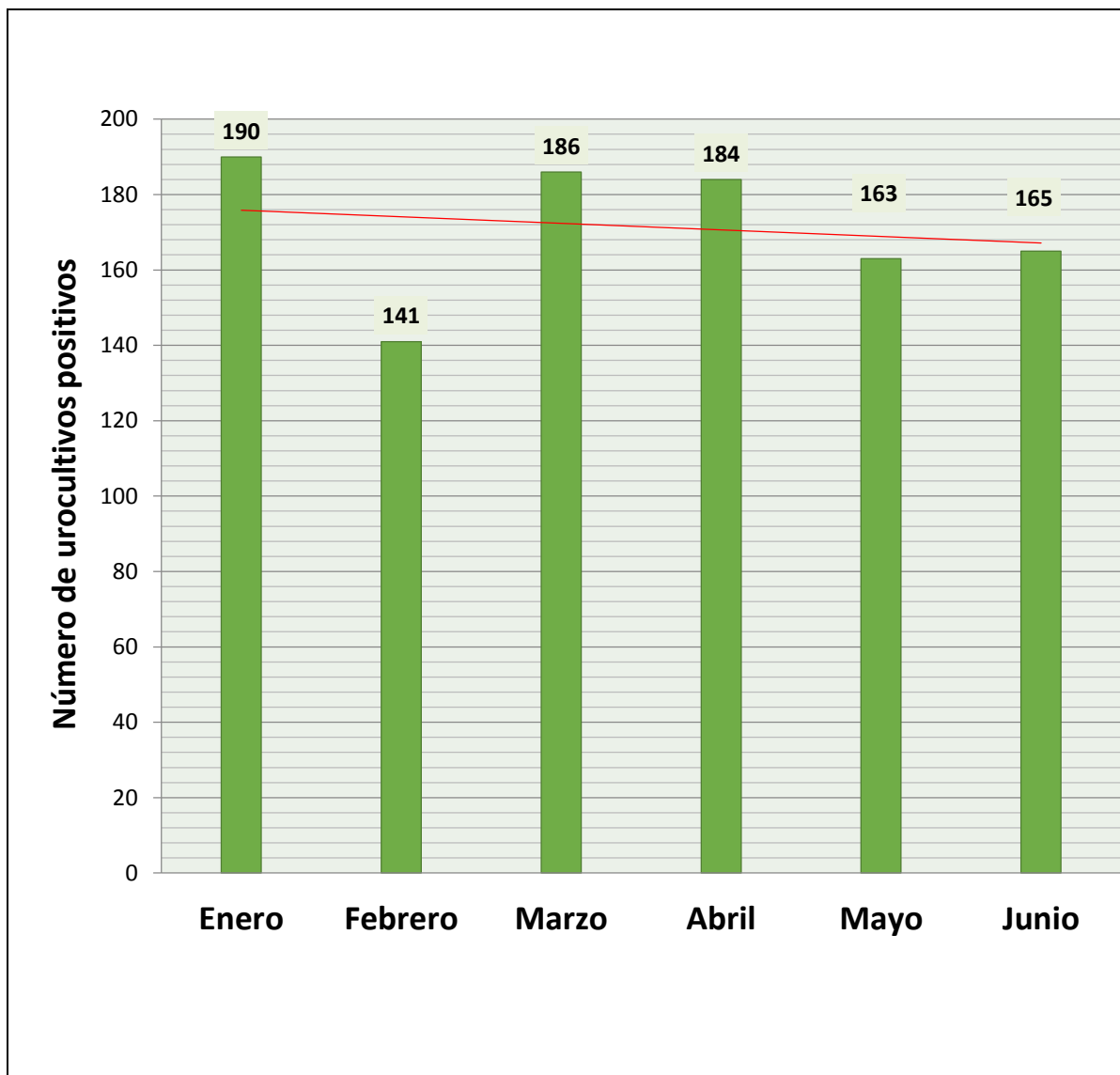


Gráfico 10.

Distribución de aislamientos de *Escherichia coli* en urocultivos por meses que duro el estudio. Hospital Nacional Hipólito Unanue, enero -junio 2018.

CARTA: APROBACIÓN DE PROYECTO DE TESIS



PERÚ

Ministerio
de Salud

Hospital Nacional
"Hipólito Unanue"

Comité Institucional de
Ética en Investigación

"Año del Diálogo y Reconciliación Nacional "

CARTA N° 161 – 2018 - CIEI-HNHU

A : JUANA CASABLANCA ALVARADO
LUZ MELINA HURTADO QUISPE

ASUNTO : **Aprobación de Proyecto de Tesis**

Referencia : Expediente N° 26581

FECHA : El Agustino, 19 de octubre del 2018

Es grato dirigirme a usted, para saludarle y dar respuesta al documento de referencia donde solicita revisión y aprobación del Proyecto de tesis titulado: **"Asociación entre formación de biofilm y la producción betalactamasas de espectro extendido en Escherichia coli aislada de Urocultivo en el Hospital Nacional Hipólito Unanue de enero – junio 2018"**. Para optar el título Profesional de Licenciada en tecnología Médica en Laboratorio Clínico y Anatomía Patología - UPNW.

El Comité, en sesión ordinaria del miércoles 17 de octubre del presente año, según consta en el Libro de actas N° 6, acordó por unanimidad Aprobar el Proyecto de tesis antes mencionado.

Atentamente

MINISTERIO DE SALUD
HOSPITAL NACIONAL HIPÓLITO UNANUE
DRA. ANGÉLICA RICCI CURIVILCA
PRESIDENTA DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

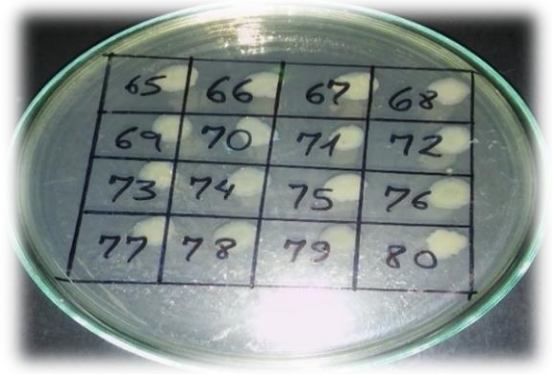
ARY
archivo

Avenida César Vallejo N° 1390 distrito El Agustino - Lima - Perú
Correo electrónico : ciei@hnhu.gob.pe - angelicaricci05@yahoo.es Teléfono: 2919092 , 3627777 anexo 2196

ANEXO N°7



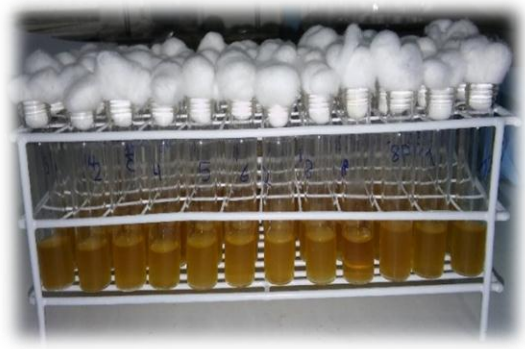
Efecto sinérgico de la producción de BLEE.



Cepas de *E. coli* cultivadas en agar mueller hinton.



Inoculación de cepas clínicas de *Escherichia coli*.



Tubos con cepas *E. coli* en caldo tripticasa soya glucosado 1%.



Placa de microtitulación de poliestireno con cepas de *E. coli* y controles.



Placa de microtitulación de poliestireno coloreado con cristal violeta 0.1%.