



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“Identificación de Bacterias productoras de Biofilm, en catéteres venosos centrales en pacientes internos del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, aislados por medio de la técnica de Maki”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**P R E S E N T A:**

**GABRIELA BAEZ LOZANO**

**ASESOR: M. en C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ**

**COASESORES : Q.F.B. REYNA FLORES CIMA.**

**Q.B.P. SUSANA ARACELI ARROYO CRUZ.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Identificación de Bacterias productoras de Biofilm, en catéteres venosos centrales en pacientes internos del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, aislados por medio de la técnica de Maki.**

Que presenta la pasante: **Gabriela Baez Lozano**

Con número de cuenta: **410003275** para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de Junio de 2017.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
<b>VOCAL</b>	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Luis Alberto Parra Oaxaca	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Q.F.B: Verónica Ruiz Solorio	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga\*

Este trabajo se lo dedicado a las personas más importantes de mi vida, mi familia: Julia Lozano, José Luis Hernandez y Jesús Medina gracias por todo su amor, paciencia, confianza, apoyo y todos los kilómetros recorridos durante esta vida, esto es de ustedes.

¡¡¡Por fin lo logramos!!!

**“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”**

Albert Einsitein

## AGRADECIMIENTOS

A mi mamá **Julia Lozano** eres mi gran ejemplo a seguir, una gran mujer, mi inspiración, mi fortaleza y la mejor mamá que puede haber tenido, siempre te has dedicado a cumplir mis sueños y llenar mi vida de anhelos, éxitos, esperanza y cosas maravillosas. Me has enseñado que siempre puedo lograr todo lo que me propongo y llegar a donde yo desee y que, aunque cometa todos los errores, la persona que siempre estará ahí para apoyarme serás ¡tú! Por todo eso y muchas más gracias ¡Te Amo Mamá!

A **José Luis Hernandez** tomaste la tarea más complicada del mundo, el estar con mi mamá y conmigo a pesar de todos los retos que nos ha puesto la vida, no te has dado por vencido y sigues luchando para tener la familia que elegimos. Me has enseñado que nunca me debo de dar por vencida. ¡Muchas Gracias!

A mi esposo **Jesús Medina** por mostrarme que la vida me tiene preparada grandes sorpresas que jamás imaginaria, por compartir tú vida conmigo e iniciar a escribir nuestra loca historia, por brindarme tú amor, tú paciencia, por seguir y materializar todas mis locuras, por impulsarme a alcanzar mis sueños y llegar al éxito, por que a pesar de todas las complicaciones y retos que hemos tenido seguimos cultivando nuestro amor. ¡Te amo!

A la **M. en C. Ana Laura Vázquez** por su apoyo incondicional en todo este tiempo, por creer en mí y confiar. Muchas gracias por todo el conocimiento que me ha transmitido y toda su asesoría para poder concretar este proyecto que me ayuda concluir y cerrar un ciclo más en mi vida para dar paso a nuevas oportunidades. ¡Muchas gracias!

A la **Q.F.B. Reyna Flores y Q.B.P. Susana A. Arroyo** por acogerme en su laboratorio para permitirme realizar la parte experimental de mi tesis bajo su dirección, por su amabilidad, su paciencia, su confianza, su apoyo y todas y cada una de las experiencias y enseñanzas profesionales y personales que me aportaron. ¡Muchas gracias!

Al laboratorio de microbiología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI por brindar los recursos y la infraestructura necesaria para la realización de la parte experimental de este trabajo de tesis.

A mi amada **UNAM** en especial a la **FESC** por ser mi segundo hogar, mi casa de estudios, por brindarme una gran gama de conocimientos teóricos y prácticos para mi desarrollo personal y profesional, por darme la oportunidad de cumplir un sueño y encontrar todos los alicientes para seguir soñando.

A todos y cada uno de los maestros y maestras que me dieron clase durante toda mi estancia universitaria, que compartieron sus conocimientos, vivencias y experiencias conmigo, gracias por sembrar en mi algunas veces las dudas para que yo me acercase más al conocimiento y llevarme por el camino para amar mi profesión.

A mis dos grandes amigos, colegas y compañeros **Carlos Jhovani Pérez** y **Diego Lezama**, que formaron parte de mi equipo de trabajo, con quiénes compartí desvelos, conocimientos, alegrías, sueños, excelentes momentos y que al pasar el tiempo formaron no solo de mi equipo, sino de mi vida, muchas gracias, ¡los quiero mucho!

A la **vida** por darme la oportunidad de recorrer este camino que tan lleno de sorpresas, alegrías y cosas maravillosas, por darme experiencias únicas e inolvidables....

A **Dios** porque hoy cedo mi mente, mis deseos, mi trabajo, mi vida agradeciendo todas las oportunidades y bendiciones y pido que me ilumine con sabiduría y humildad.

# ÍNDICE

RESÚMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
1.-GENERALIDADES.....	3
1.1 Historia del reconocimiento del biofilm .....	3
1.2 Definición de biofilm .....	3
1.3. Composición y arquitectura .....	4
1.4. Etapas del ciclo de vida.....	5
1.5. “Quórum Sensing” .....	7
1.6 Pared bacteriana. ....	7
1.6.1 Bacterias Gram positivas. ....	7
1.6.2 Bacterias Gram negativas. ....	9
1.7 Resistencia bacteriana en presencia de Biofilm.....	11
1.8 Antibióticos .....	12
1.8.1 Grupo $\beta$ -lactámico .....	13
1.8.2 Grupo Aminoglucósidos.....	14
1.8.3 Grupo Glucopéptidos. ....	14
1.8.4 Grupo Lincosamidas. ....	14
1.8.5 Grupo Macrólidos.....	15
1.8.6 Grupo Nitroimidazol .....	15
1.8.7 Grupo Nitrofuranos .....	15
1.8.8 Grupo Quinolonas .....	15
1.8.9 Grupo Tetraciclinas.....	15
1.9 Mecanismos de Resistencia Bacteriana.....	16
1.9 Biofilms e infecciones .....	16
1.9.1 Bacteremia resistente.....	19
1.9.2 Endocarditis de válvulas nativas .....	19
1.9.3 Trombosis séptica.....	19
1.10 Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con catéteres.....	20
1.10.1 Cultivos microbianos. ....	20

1.10.2 Identificación microbiana mediante el sistema Vitek 2 de Biomerieux. ....	21
1.10.3 Identificación de la Sensibilidad a antibióticos mediante el sistema Vitek 2 de Biomerieux. ....	22
2.-JUSTIFICACIÓN.....	24
3.-OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivos Generales. ....	24
3.2 Objetivos particulares.....	24
4.- METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN .....	25
4.1 Población de estudio. ....	25
4.2 Materiales, equipos y reactivos.....	25
4.3.-Aislamiento e identificación de la muestra. ....	25
4.3.1 Aislamiento de la muestra: Prueba de Maki.....	25
4.3.2 Identificación y sensibilidad.....	25
4.4 Producción de biofilm. (ver diagrama de metodología) .....	26
5.-RESULTADOS.....	27
5.1 Prueba de Maki. ....	27
5.2 Identificación y sensibilidad.....	27
5.3Producción de Biofilm. ....	32
6.- DISCUSIÓN.....	37
7.- CONCLUSIONES .....	39
8.-BIBLIOGRAFIA.....	40
ANEXO A.....	44
MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS .....	44
DIAGRAMA DE LA METODOLOGÍA. ....	45
COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO .....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

- <b>FIGURA 1.</b> FORMACIÓN Y ESTRUCTURA DE UN BIOFILM. ....	5
- <b>FIGURA 2.</b> ESTRUCTURA DEL PÉPTIDOGLUCANO EN BACTERIAS GRAM POSITIVAS. ....	8
- <b>FIGURA 3.</b> COMPOSICIÓN DE LA PARED BACTERIANA GRAM POSITIVA Y GRAM NEGATIVA .	8
- <b>FIGURA 4.</b> ESTRUCTURA DE UNA PARED BACTERIANA GRAM NEGATIVA. ....	10
- <b>FIGURA 5.</b> DIENTES CON CARIES . ....	17
- <b>FIGURA 6.</b> PACIENTE CON CATETER VENOSO CENTRAL. ....	17
- <b>FIGURA 7.</b> EQUIPO VITEK 2. ....	21
- <b>FIGURA 8.</b> TARJETA DE IDENTIFICACIÓN MICROBIANA PARA EQUIPO VITEK 2. ....	22
- <b>FIGURA 9.</b> -MUESTRA DE CATETER VENOSO CENTRAL PARA LA PRUEBA DE MAKI. ....	25
- <b>FIGURA 10.</b> -MUESTRA DE BIOFILM EN BHI CON CRISTAL VIOLETA. ....	36
- <b>FIGURA 11.</b> -MUESTRA DE BIOFILM EN CST CON CRISTAL VIOLETA. ....	36
- <b>FIGURA 12.</b> MUESTRA DE BIOFILM EN BHI CON SAFRANINA. ....	36
- <b>FIGURA 13.</b> MUESTRA DE BIOFILM EN CST CON SAFRANINA. ....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

- <b>TABLA 1.</b> CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS SEGÚN SU ORIGEN. ....	12
- <b>TABLA 2.</b> CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS SEGÚN SU ESTRUCTURA QUÍMICA. ....	12
- <b>TABLA 3.</b> CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS SEGÚN SU MECANISMO DE ACCIÓN. ....	13
- <b>TABLA 4.</b> ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÁMICOS. ....	14
- <b>TABLA 5.</b> MICROORGANISMOS QUE INTERVIENEN EN LA MAYORÍA DE ENFERMEDADES NOSOCOMIALES. ....	17
- <b>TABLA 6.</b> LISTA PARCIAL DE INFECCIONES HUMANAS EN LAS QUE SE INVOLUCRAN BIOFILMS BACTERIANOS. ....	18
- <b>TABLA 7.</b> RESULTADOS PARA BACTERIAS QUE PRESENTARÓN UNA NULA FORMACIÓN DE BIOFILM REPRESENTADO EN CRUCES. ....	33

## ÍNDICE DE GRÁFICAS.

<b>GRÁFICA 1.</b> TOTAL DE MUESTRAS DE PUNTAS DE CATÉTER OBTENIDAS DURANTE EL ESTUDIO.....	27
<b>GRÁFICA 2.</b> Total DE MUESTRAS POSITIVAS OBTENIDAS EN LOS CATÉTERES.....	28
<b>GRÁFICA 3.</b> PORCENTAJE DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS OBTENIDAS EN LAS MUESTRAS POSITIVAS .....	28
<b>GRÁFICA 4.</b> RESISTENCIA Y SENSIBILIDAD QUE PRESENTÓ <i>S.epidermidis</i> ANTE LOS 16 ANTIBIÓTICOS A LOS QUE SE SOMETIÓ.....	29
<b>GRÁFICA 5.</b> RESISTENCIA Y SENSIBILIDAD QUE PRESENTÓ <i>S.aureus</i> ANTE LOS 16 ANTIBIÓTICOS A LOS QUE SE SOMETIÓ.....	29
<b>GRÁFICA 6.</b> RESISTENCIA Y SENSIBILIDAD QUE PRESENTÓ <i>S.haemoliticus</i> ANTE LOS 16 ANTIBIÓTICOS A LOS QUE SE SOMETIÓ.....	30
<b>GRÁFICA 7.</b> RESISTENCIA Y SENSIBILIDAD QUE PRESENTÓ <i>Klebsiella pneumoniae</i> ANTE LOS 16 ANTIBIÓTICOS A LOS QUE SE SOMETIÓ.....	30
<i>Gráfica 8. Resistencia y sensibilidad que presentó Acinetobacter baumannii complex</i> ANTE LOS 16 ANTIBIÓTICOS A LOS QUE SE SOMETIÓ.....	31
<b>GRÁFICA 9.</b> RESISTENCIA Y SENSIBILIDAD QUE PRESENTÓ <i>Serratia marcescens</i> ANTE LOS 16 ANTIBIÓTICOS A LOS <i>que</i> SE SOMETIÓ.....	31
<b>GRÁFICA 10.</b> RESISTENCIA Y SENSIBILIDAD QUE PRESENTÓ <i>Escherichia coli</i> ANTE LOS 16 ANTIBIÓTICOS A LOS QUE SE SOMETIÓ.....	32
<b>GRÁFICA 11.</b> BACTERIAS QUE PRESENTARÓN UNA FORMACIÓN DE BIOFILM.....	32
<b>GRÁFICA 12.</b> FORMACIÓN DE BIOFILM PARA <i>Staphylococcus aureus</i> A 24,48 Y 72 HRS .....	34
<b>GRÁFICA 13.</b> FORMACIÓN DE BIOFILM PARA <i>Staphylococcus epidermidis</i> A 24, 48 Y 72 HRS.....	35

## ABREVIATURAS.

<b>ADN</b> Acido desoxiribonucleico	<b>LEV</b> Levofloxacina
<b>AGR</b> Gen regulador accesorio	<b>LIN</b> Linezolda
<b>AK</b> Amikacina	<b>mL</b> mililitros
<b>AM</b> Ampicilina	<b>mm</b> milímetros
<b>AMS</b> Amicilina/Sulbactam	<b>MOX</b> Moxifloxacina
<b>AZT</b> Aztreonam	<b>MRP</b> Meropenem
<b>BEP</b> Benzilpenicilina	<b>NCCLS</b> Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico actualmente el CLSI (Clinical Laboratory Estándar Institute)
<b>BHI</b> Infusion de cerebro corazón (Brain heart infusión)	<b>NTF</b> Nitrofurantoina
<b>BRC</b> Bacteremia relacionada con el catéter	<b>°C</b> Grados centígrados.
<b>CC</b> Clindamicina	<b>OX</b> Oxacilina
<b>CDC</b> Centro para el control y prevención de enfermedades	<b>PIA</b> Polisacarido de Adherencia Intracelular.
<b>CIP</b> Ciprofloxacina	<b>PPT</b> Piperaciclina/Tazobactam
<b>CoA</b> Coencima A	<b>PSMs</b> Modulinas solubles en fenol.
<b>CRO</b> Ceftriaxona	<b>QND</b> Quinupristina/Dalfopristina
<b>CST</b> Caldo Soya Tripticasa	<b>RA</b> Rifampicina
<b>CZ</b> Cefazolina	<b>SPE</b> Sustancias Polimericas Extracelulares.
<b>DIU</b> Dispositivo Intreuterino	<b>STX</b> Trimetropina/sulfametazol
<b>E</b> Eritromicina	<b>TE</b> Tetraciclina
<b>EPS</b> Exopolisacaridos	<b>TG</b> Tigeciclina
<b>FEP</b> Cefepime	<b>TIC</b> Tigeciclina
<b>FRC</b> Fungemia relacionada con catéter	<b>TOB</b> Tobramicina
<b>GE</b> Gentamicina	<b>UFC</b> Unidades Formadoras de Colonias.
<b>LB</b> libras	<b>VA</b> Vancomicina
<b>IMP</b> Imipenem	<b>VPP</b> valor predictivo positivo.

# RESÚMEN

El termino Biofilm se refiere a comunidades que se encuentran envueltas por una matriz extracelular y que tienen la capacidad para poder adherirse a superficies inertes o vivientes, lo que le confiere un modo de protección que permite la supervivencia de las bacterias a ambientes hostiles.

Estos estudios se incluyeron a 75 pacientes del Hospital Centro Médico Nacional SXXI, de los diversos servicios que ofrece el hospital. Se obtuvo la muestra distal de la punta del catéter venoso central, al cual se le realizó la prueba de Maki para aislar las bacterias contenidas en los catéteres, en esta prueba se obtuvieron 31 catéteres positivos, lo que representa el 41% del total y 44 catéteres negativos 59%.

Posteriormente a las bacterias obtenidas de las muestras positivas se les realizó la identificación y sensibilidad a antimicrobianos en el equipo VILTEK 2 de Biomerieux, en donde se obtuvo que, del total de 32 bacterias aisladas, el 81% pertenece a las bacterias Gram positivas y el 19% a las bacterias Gram negativas.

Para fomentar la producción de biofilm, se utilizaron los medios Caldo infusión cerebro-corazón (BHI) y Caldo Soya Trypticasa (CST), los cuales se incubaron con las bacterias aisladas a 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs. Posteriormente se realizó la tinción con los colorantes safranina y cristal violeta en cada una de las diferentes condiciones.

Obteniéndose que las bacterias *Staphylococcys aureus* y *Staphylococcus epidermidis* fueron las mejores productoras de Biofilm, el mejor medio de cultivo para el desarrollo de estas bacterias fue BHI y las 48 horas fue considerado el mejor tiempo de incubación para el desarrollo del Biofilm por parte de las bacterias, así mismo el Cristal Violeta se consideró como el mejor colorante para teñir al biofilm.

Se relaciona la formación de Biofilm con la resistencia a antibióticos, ya que las bacterias que presentaron una formación de Biofilm, también presentaron resistencia a los antibióticos del grupo  $\beta$ -lactámicos principalmente.

# INTRODUCCIÓN

Las infecciones que se adquieren dentro de un hospital como consecuencia del tipo de atención médica que reciben los pacientes, representan un problema de extraordinaria gravedad. Los informes que se publican en todo el mundo muestran que entre 5 y 10% de los enfermos que se hospitalizan, adquieren por lo menos un episodio de infección durante su estancia en el hospital, lo que implica más días en cama y el aumento en el gasto económico tanto para el hospital como para el paciente.

Una infección intrahospitalaria o también llamada nosocomial, es una enfermedad que no muestra evidencias de la presencia del agente infeccioso, de sus toxinas o de estar siendo incubada en el momento del ingreso a un hospital, por lo que se adquiere como consecuencia de la estadía en éste, debido a la hospitalización o al ser sometido a un procedimiento médico (NOM-026-SSA2-1998).

Sin embargo, a pesar de los avances modernos en las técnicas de esterilización y de los materiales desechables, la tasa de infecciones nosocomiales ha ido en aumento en un 36% en los últimos 20 años (Tortora, 2010)

Es por ello que resulta imprescindible la detección e identificación de este tipo de bacterias en los hospitales de alta especialidad, que están enfocados en la salud y el bienestar del paciente.

Las infecciones nosocomiales son resultado de la interacción de 3 factores principalmente:

- Los microorganismos presentes en el ambiente hospitalario.
- El estado comprometido (o debilitado) del hospedero.
- La cadena de transmisión en el hospital.

Aunque se realicen todos los esfuerzos posibles para eliminar o controlar la proliferación de microorganismos en el hospital; el ambiente hospitalario es un reservorio importante de diversos patógenos. Esto se debe en parte a que ciertos miembros de la microbiota normal del cuerpo humano son oportunistas y representan un peligro particularmente grande para los pacientes hospitalizados.

De hecho, la mayoría de los microorganismos que causan infecciones nosocomiales no causan enfermedad en personas sanas, sino que solo son patógenos para los individuos cuyas defensas han sido debilitados por una enfermedad o un tratamiento; es decir son oportunistas (Tortora, 2010).

Otro factor muy importante a considerar en las infecciones nosocomiales es la mala manipulación de los catéteres y la falta de aseo, hay mucha más improbabilidad de que se llegue a desarrollar una contaminación en estos catéteres y que posteriormente se genera una infección diseminándose a otras partes del organismo.

## 1. - GENERALIDADES

### **1.1 Historia del reconocimiento del biofilm**

En las décadas de 1940 y 1950 se reporta que la mayor parte de las infecciones nosocomiales eran causadas por microorganismos Gram positivos. En una época el patógeno *Staphylococcus aureus* fue el causante principal de infecciones nosocomiales.

En la década de 1970 los patógenos nosocomiales más comunes eran bacilos Gram negativos como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Posteriormente, durante la década de 1980, surgieron como patógenos nosocomiales las bacterias resistentes a los antibióticos, *Staphylococcus aureus*, los estafilococos coagulasa negativa y algunas especies de enterococos.

En la década de 1990 estas bacterias Gram positivas (*Staphylococcus* y enterococos) fueron la causa del 34% de las infecciones nosocomiales y cuatro patógenos Gram negativos fueron la causa del 32%. En la década de 2000 la resistencia a los antibióticos en las infecciones nosocomiales es una preocupación importante (Tortora, 2010).

### **1.2 Definición de biofilm**

Hay una gran variedad de definiciones de Biofilm, sin embargo una descripción ampliamente aceptada de un biofilm es la siguiente: "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" (Donlan, 2002).

El biofilm es un polisacárido extracelular que promueve la adhesión célula-célula, es un factor de virulencia y ayuda a la formación de comunidades bacterianas, que confiere la capacidad para adherirse a superficies inertes o vivientes (Moreno, 2007).

Varios son los microorganismos que tienen la capacidad de forma biofilm, entre ellos se destacan: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, *Enterococcus sp.*, *Streptococcus mutans* y *Haemophilus influenzae* (Diamond, 2007).

### ***1.3. Composición y arquitectura***

Los biofilms están estructurados principalmente por grandes colonias de bacterias sésiles incrustadas en una matriz polimérica extracelular o glicocálix. Las células bacterianas, que componen el 15%-20% del volumen, no se dividen al interior de los biofilms, lo cual podría atribuirse al hecho de adoptar un fenotipo alterado, diferente al de las mismas bacterias en estado de libre flotación (Nazar, 2007).

La matriz es muy hidratada debido a que incorpora grandes cantidades de agua dentro de su estructura, llegando este elemento a representar hasta el 97% de ésta (Donlan, 2002). Además de agua y gérmenes, la matriz está formada por exopolisacáridos (EPS), los que constituyen su componente fundamental, producidos por los propios microorganismos integrantes. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, ácido teicoico y productos de lisis de las bacterias (Nazar, 2007).

El conjunto de polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas se conocen bajo el nombre de sustancias poliméricas extracelulares (SPE). En la matriz también pueden hallarse materiales no bacterianos, tales como cristales de sales minerales, partículas de corrosión y/o de sedimento, o componentes sanguíneos, según sea el medio ambiente en el cual se desarrolla el biofilm. Además, los EPS pueden estar asociados con iones metálicos y cationes bivalentes. Pueden tener carga neutra o carga polianiónica, según el tipo de exopolisacárido, lo que les permitiría interactuar con distintos antimicrobianos, de forma tal que estos pueden quedar atrapados en la matriz sin capacidad para actuar sobre las bacterias (Diamond, 2007).

La arquitectura, de la matriz del biofilm, no es sólida, sino que en su interior hay microcolonias rodeadas de calanes que permiten el acceso a nutrimentos, eliminación de desechos y la comunicación con otras microcolonias (Donlan, 2002). Dentro del biofilm, hay diferentes microambientes, los cuales tienen diversas concentraciones de nutrimentos, oxígeno, pH: estas variaciones en el ambiente indican que las células ubicadas en diferentes regiones tengan diversos patrones de expresión de genes (Betancourt, 2004).

La formación de biofilm depende de muchos factores; se ha observado que condiciones de anaerobiosis, aumento en la concentración de glucosa o cloruro de sodio y presencia de bajas concentraciones de antibióticos en el ambiente, induce la formación de biofilm (Diamond, 2007).

### 1.4. Etapas del ciclo de vida

La biología de los microorganismos productores de biofilms se centra en su ciclo vital e interacciones con el medio ambiente. El ciclo vital es un proceso dinámico que puede ser dividido en 3 partes: adhesión, crecimiento o acumulación y separación o desprendimiento (Costerton, 1995).

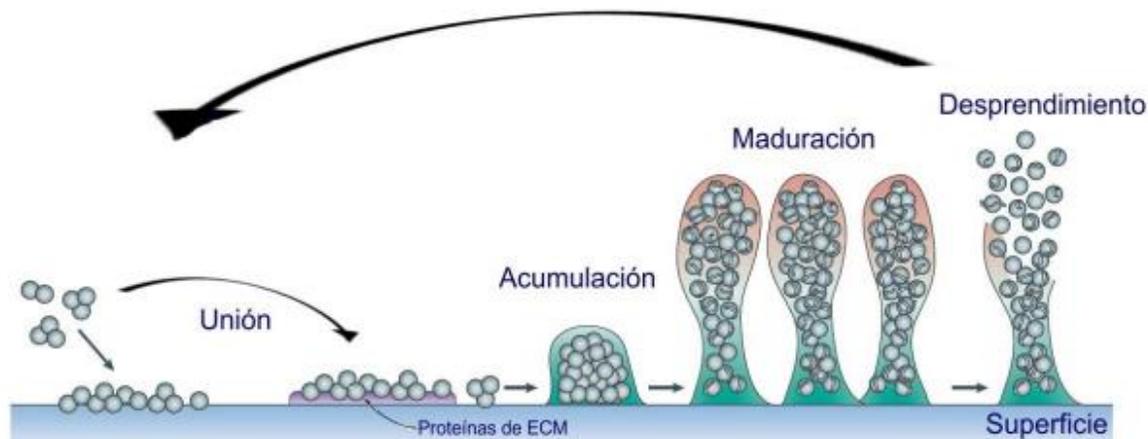


Figura 1.- Formación y estructura de un biofilm. Imagen modificada: Michel Otto 2009.

En la fase de adhesión, cuando un dispositivo médico es insertado, las proteínas de la sangre (fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, entre otros) recubre sus superficies; cuando la bacteria entra al organismo y expresa las condiciones de la superficie bacteriana que reconocen las moléculas de adhesión de la matriz extracelular, se unen de una manera reversible a estas proteínas (Costerton, 1999).

Después de que la bacteria se ha adherido a la superficie, gracias a las adhesinas de superficie, estas se multiplican y forman microcolonias; sin embargo, la unión entre ellas y la superficie es laxa y poco organizada, por lo que requiere de adherencia intracelular. Las adhesinas están formadas por proteínas de membrana codificadas por genes específicos del cromosoma bacteriano, que ha sido identificado como parte de los primeros pasos de formación del biofilm. La arquitectura no enlazada puede proporcionar los contactos y las interacciones de largo alcance entre las paredes de las bacterias (Costerton, 1999).

Muchas proteínas superficiales se han identificado como causales de la capacidad de adherencia a las superficies plásticas. Se ha descrito que las adhesinas semejantes a las fimbrias SSP-1 y SSP-2 contribuyen a la adhesión del plástico (Costerton, 1999).

Algunos de los factores fisicoquímicos que se involucran en este paso y que se pueden modificar son la hidrofobicidad de la superficie, proteínas de adhesión y polisacáridos capsulares. Después de

la adhesión, las bacterias se comienzan a multiplicar y en esta fase, la unión entre bacterias está poco organizada (Diamond, 2007).

Durante la segunda fase, se inicia la producción del polisacárido de adherencia intracelular, una vez que las bacterias están adheridas a una superficie, estas se multiplican y forman microcolonias con estructuras que incrementan paulatinamente su organización en forma de mosaicos, llegando a alcanzar la organización de adherencia celular (Diamond, 2007).

Así mismo se adquiere la estructura tridimensional, con canales para el suministro de nutrimentos a las células en todas las capas del biofilm. El mecanismo de esta formación no es muy claro, por lo que se ha sugerido que el Quórum Sensing, controla péptidos surfactantes en la estructura de los biofilms, las Modulinas solubles en fenol (PSMs), que conducen a la separación de grupos de células formando los canales (Linares, 1998).

Se produce un polisacárido de adherencia intracelular (PIA) es un polímero de glucosamina con una estructura bioquímica de B1, 6-N-acetil-glucosamina, la producción del PIA se debe a la acción de una compleja cadena de enzimas, aun no identificadas por completo (Costerton, 1999).

Una vez formado el biofilm, puede ocurrir un desprendimiento, el cual es útil para que la bacteria se disemine a otros sitios de infección, puede producirse por el desprendimiento de células individuales o por grupos de grandes células. El desprendimiento controlado mantiene un cierto espesor del biofilm, este mecanismo es controlado por el sistema de "Quórum Sensing" (Svetla, 2004).

El sistema "Quórum sensing" está regulado por un gen, el gen regulador accesorio (*agr*), el cual se encarga de disminuir la expresión de varias proteínas celulares e incrementa la expresión de varios factores de virulencia en la transición desde la fase de crecimiento tardío exponencial a la fase estacionaria. También se ha visto implicado en la invasión y la apoptosis de las células epiteliales (Linares, 1998).

Los mecanismos que intervienen en este proceso pueden ser varios factores: fuerzas mecánicas, como el flujo sanguíneo, cese de la producción de adhesinas y enzimas que destruyen la matriz o surfactantes como péptidos PSMs. Las células que se han desprendido como consecuencia del crecimiento pueden volver rápidamente al fenotipo platónico, es decir, células vegetativas en estado libre (Svetla, 2004).

### **1.5. “Quórum Sensing”**

Un avance importante en la comprensión de los biofilms ocurrió en 1994, con el descubrimiento de proteínas responsables del mecanismo de *Quórum sensing* o de autoinducción, por los investigadores Fuqua, Winans y Greenberg. (Lazdunski, 2004).

El *Quórum sensing* es un mecanismo de comunicación bacteriana (comunicación célula-célula entre bacterias), que les permite a las células que comprenden una comunicación bacteriana coordinar la expresión de sus genes en una manera dependiente de densidad celular, comportándose como eucariotas, así mismo la coordinación de genes responsables de factores de defensa y virulencia (Diggle, 2007).

Todo esto es mediado por pequeñas moléculas señalizadoras y difusibles, denominadas autoinductores, las cuales son sintetizadas intracelularmente durante el crecimiento de la bacteria y posteriormente liberadas en el medio circulante (Diggle, 2007).

La unión de los microorganismos a una superficie y posterior formación de un biofilm necesita que las bacterias se cercioren que han efectuado contacto. Para lograrlo requieren de señales químicas coordinadas que les permitan comunicarse entre ellas, el desarrollo de interacciones célula a célula se facilita por la estrecha proximidad existente entre las bacterias biofilm. Esta interrelación, vía mensajeros de pequeñas moléculas, denominada *quórum sensing*, beneficia a la bacteria al permitirle sentir la presencia de microorganismos vecinos, determinar la densidad de la población existente y responder a eventuales condiciones cambiantes (Diamond, 2007).

### **1.6 Pared bacteriana.**

También llamada pared celular, es una estructura compleja que se sitúa por fuera de la membrana citoplasmática y tanto su organización molecular como su composición difieren considerablemente según se trate de la actividad que la bacteria presenta a la coloración de la tinción de Gram. Este componente hace que el mundo bacteriano se clasifique en dos grupos: bacterias Gram positivas y Gram negativas.

#### **1.6.1 Bacterias Gram positivas.**

La pared bacteriana Gram positiva constituye una capa de material bien estructurado cuyo grosor puede variar de 30 a 80 nanómetros, dependiendo de la especie y de las condiciones de crecimiento. Su estructura básica está constituida por un polímero denominado péptidoglucano (Figura 2) compuesto de unidades de naturaleza glucocídica y peptídica y correspondiendo del 40 al 80% del peso seco de la pared celular (Figura 3).



### 1.6.2 Bacterias Gram negativas.

Es mucho más compleja que la Gram positiva. La capa del péptidoglucano que corresponde del 5 al 10% de esta pared, presenta la estructura básica. Y está localizada en el espacio periplásmico, área limitada externamente por la membrana externa, e internamente por la membrana citoplasmática, denominadas genéricamente hidrolasas y proteínas de unión, que participan en mecanismos nutritivos de las células (García, 1999).

La membrana externa, otro componente estructural de esta pared, en muchos aspectos es semejante, a la membrana citoplasmática, pero con relación a ella posee componentes impares, el lipopolisacárido. Estratégicamente esta estructura posee moléculas denominadas porinas que constituyen verdaderos conductos a través de los cuales se garantiza la difusión de compuestos nutritivos simples, tales como azúcares, aminoácidos y algunos iones. Envuelto el cuerpo bacteriano, la membrana externa confiere, junto con el péptidoglucano, al cual está unida por moléculas de polipoproteínas, integradas a la célula bacteriana (Jimenez, 1982).

El componente lipoprotéico, característico de la pared celular Gram negativa, se encuentra embebido en la membrana externa y covalente único al péptidoglucano; su principal función es estabilizar la membrana externa (Pumarola, 1998).

Localizado exclusivamente en la capa externa de la membrana se encuentra el lipopolisacárido (LPS) está compuesto por tres segmentos covalentemente unidos: Lípido A, Centro y Antígeno O (Pumarola, 1998).

El lípido A está embebido en la membrana extracelular interna, comprende un lípido compuesto por unidades disacáridas, ácidos grasos saturados y grupos fosfatos. El lípido A es la endotoxina de las bacterias Gram negativas, siendo liberadas por la lisis de la célula también durante el crecimiento y multiplicación, expresando por consiguiente su potencial tóxico e induciendo complejas relaciones orgánicas (Lorenzo, 2008).

El centro y el antígeno O son de naturaleza polisacárida. El primero está compuesto por pequeñas cadenas de azúcar, cuya estructura es más o menos común entre las bacterias Gram negativas, mientras que el segundo comprende largas cadenas sacáridas siendo específicas de la especie bacteriana considerada (García, 1999) (Figura 4).

Muchas bacterias Gram negativas contienen como parte estructural de sus células una toxina denominada Endotoxina o antígeno "O".

Las endotoxinas son complejos fosfolípidos-polisacáridos-proteínicos estables en calor. Son liberados de las células cuya integridad ha sido rota, aunque por si misma son resistentes a las enzimas proteolíticas. Las endotoxinas son característicamente menos tóxicas y tienen una acción fisiológica diferente a las de las exotoxinas (Jimenez, 1982).

La actividad biológica de la endotoxina se debe a la fracción del lipopolisacárido que puede separarse de la proteína y el fosfolípido del complejo. La estructura del factor del complejo es diferente para cada endotoxina y es el determinante antigénico "O" (Jimenez, 1982).

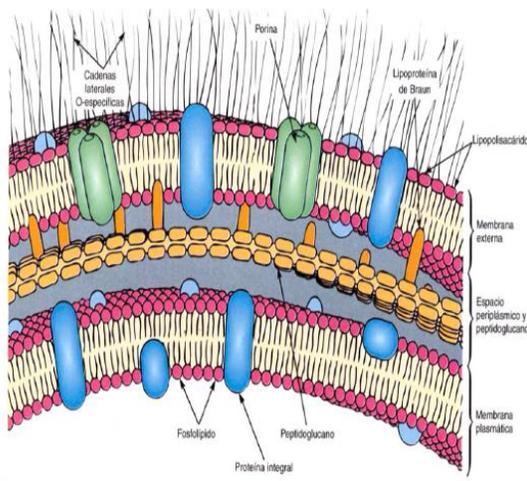
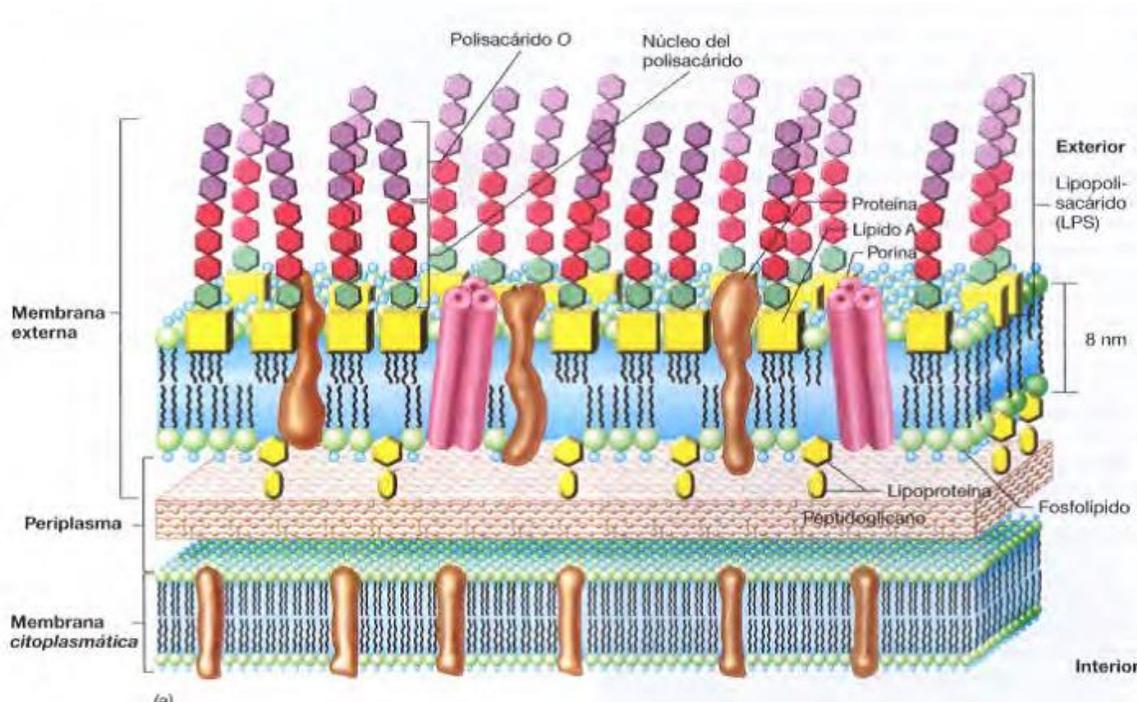


Figura 3.27 Envoltura de una bacteria gramnegativa.

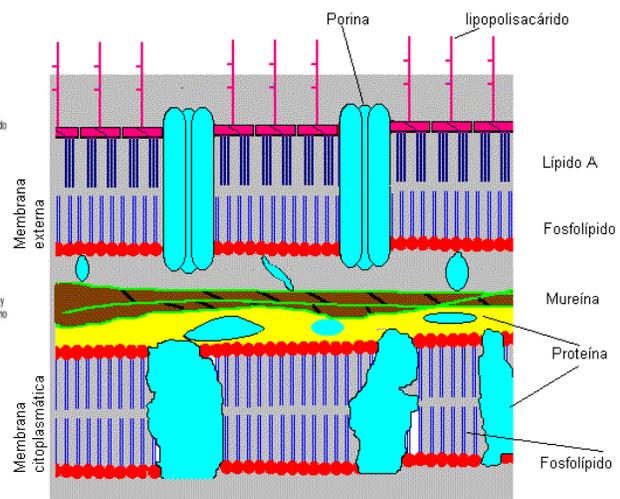


Figura 4.-Estructura de una pared bacteriana Gram negativa. (wikispace, 2017)

### ***1.7 Resistencia bacteriana en presencia de Biofilm***

La característica que mejor distingue las infecciones crónicas relacionadas con biofilms de las infecciones agudas es su respuesta a tratamientos antibióticos. Mientras que las infecciones agudas pueden ser eliminadas tras un breve tratamiento antibiótico, las infecciones por biofilms normalmente no consiguen ser completamente eliminadas, producen episodios recurrentes y la mayoría de las veces deben resolverse sustituyendo el implante (Kauman, 1985).

Las bacterias que no forman biofilm o que se encuentran fuera de este, son sensibles a los antibióticos y a los mecanismos de defensa del hospedero, mientras que las bacterias que se encuentran dentro del biofilm, forman una capa impermeable que retarda la difusión de los antibióticos, disminuyendo su sensibilidad y por lo cual se ven solo afectadas las bacterias que se encuentran en la parte más superficial (Costerton, 1999).

Otra de las características de estas bacterias es que, sacrifican su capacidad de crecimiento y se encuentran en un estado metabólico reducido, por lo que impiden la acción de antibióticos que actúan a nivel de síntesis de proteínas o de la pared celular (Betancourt, 2004).

Así mismo este tipo de bacterias presentan una organización estructural que las hace resistentes a los mecanismos de defensa del hospedador. Los biofilms revestidos con SPE y conteniendo múltiples de microcolonias bacterianas en su interior, se convierten en estructuras demasiado grandes como para ser fagocitadas, reduciendo la accesibilidad del sistema inmune a las bacterias. Por añadidura, el biofilm provee de una barrera física que aumenta la resistencia de patógenos a las defensas del hospedador, como opsonización, lisis por complemento, y fagocitosis (Diamond, 2007).

Algunos de los mecanismos responsables de la resistencia se incluyen: la barrera de difusión física y química a penetración de los antimicrobianos que constituyen la matriz de exopolisacáridos; el crecimiento ralentizado de las bacterias del biofilm debido a la limitación de nutrientes; la existencia de microambientes que antagonicen con la acción del antibiótico; y la activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria y la aparición de un fenotipo específico del biofilm que activamente combata los efectos negativos de las sustancias antimicrobianas (Kauman, 1985).

En rigor, los biofilms provocan respuestas inmunes celular y humoral, demostradas por la identificación de citocinas liberadas por leucocitos expuestos a biofilm. Sin embargo, debido a su aislamiento del entorno por la matriz y su reducido estado metabólico, esta respuesta sistémica es muy pequeña (Betancourt, 2004).

## 1.8 Antibióticos

El origen de la palabra antibiótico proviene del griego *anti*, que significa contra y *bios* que se refiere a la vida. La palabra fue propuesta por Selman A. Waksman en 1942 y se utilizó para definir a aquellas sustancias químicas producidas por microorganismos que, a bajas concentraciones, inhiben el desarrollo o destruyen la vida de otros microorganismos; principalmente son compuestos de peso molecular intermedio o bajo (Estrella, 2005).

En la actualidad, en el término antibiótico también se incluye a aquellas moléculas que no son de origen natural o que fueron modificadas químicamente. Estas moléculas pueden clasificarse de acuerdo con varios criterios como se muestra en la Tabla 1 y Tabla 2 a continuación.

Origen	Características	Ejemplos
<b>Naturales</b>	Son sintetizados por varias especies microbianas.	Penicilina G, Eritromicina, Bacitracina, Estreptomina, Griseofulvina.
<b>Semisintéticos</b>	Moléculas que se producen de forma natural y que posteriormente pasan por un proceso de modificación química.	Ampicilina, Amoxicilina, Cefoxitina, Rifampicina.
<b>Sintéticos</b>	Moléculas que han sido sintetizadas en su totalidad en un laboratorio.	Sulfonamidas, Quinolonas.

Tabla 1.- Clasificación de los antibióticos según su origen (IntraMed, 2017).

Nombre	Ejemplos
<b><math>\beta</math>-lactámicos</b>	Ampicilina, Aztreonam, Cefalotina, Cefazolina, Cefepime, Cefoxitina, Imipenem, Meticilina, Meropenem, Penicilina.
<b>Aminoglucósidos</b>	Amikacina, Estreptomina, Gentamicina, Tobramicina.
<b>Streptograminas</b>	Quinupristina-Dalfopristina.
<b>Glucopéptidos</b>	Teicoplanina, Vancomicina.
<b>Lincomisina</b>	Clindamicina, Lincomicina
<b>Macrólíticos</b>	Azitromicina, Claritromicina, Eritromicina
<b>Nitroimidazol</b>	Metronidazol, Tinidazol
<b>Nitrofuranos</b>	Nitrofurantoína, Nitrofurazona, Furazolidona.
<b>Quinolonas</b>	Ácido nalidixico, Norfloxacin, Ciprofloxacina, Levofloxacina.
<b>Rifamicina</b>	Rifampicina
<b>Sulfonamidas</b>	Sulfadiazina, Sulfametaxol, Sulfadoxina
<b>Tetraciclinas</b>	Doxiciclina, Metaciclina, Tetraciclina.

Tabla 2.- Clasificación de los antibióticos según su estructura química (IntraMed, 2017)

Los antibióticos forman un grupo diverso de sustancias con diferentes comportamientos farmacocinéticos y farmacodinámicos. Su mecanismo consiste en ejercer una acción específica sobre alguna estructura o función bacteriana (Tabla 3) (Pumarola, 1998).

Mecanismos	Descripción	Grupos de antibióticos.
<b>Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana</b>	Se inhibe la síntesis del peptidoglucano, por bloqueo del sitio catalítico de alguna enzima, o por la formación de complejos con determinados sustratos.	$\beta$ -lactámicos, Glucopéptidos.
<b>Inhibición de la síntesis proteínica</b>	Se inhibe la traducción del material genético, bloqueando la síntesis de proteínas de la bacteria.	Aminoglucósido, Tetraciclina, Macrólidos, Lincosamina.
<b>Inhibición de la síntesis de ácido nucleico</b>	Se inhibe la actividad de enzimas dianas específicas, involucradas en la síntesis de ácidos nucleicos.	Quinolona, Rifamicina.
<b>Formación de compuestos que dañan el ADN bacteriano</b>	Se forman compuestos inestables que dañan el ADN bacteriano	Nitrofurano
<b>Acción sobre vías metabólicas</b>	Se inhibe competitivamente la utilización de un metabolito exógeno o endógeno.	Sulfonamidas

Tabla 3.- Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción (Martínez, 2017)

### 1.8.1 Grupo $\beta$ -lactámico

Esta familia de antibióticos es efectiva contra las bacterias Gram positivas, algunas Gram negativas y espiroquetas. No es efectivo contra *Mycoplasma*, debido a que no posee pared celular, ni contra bacterias intracelulares patógenas como *Chlamydia* y *Rickettsia* (Belloso, 2009).

La penicilina es el primer representante de los  $\beta$ -lactámicos, este grupo fue nombrado de este modo debido a que su estructura química se caracteriza por poseer un anillo  $\beta$ -lactámico; esta familia de antibióticos es la más numerosa y muy utilizada en la terapéutica actual, presenta escasa toxicidad y posee un amplio margen terapéutico, excepto en casos de alergia (Martínez, 2017).

Su mecanismo de acción consiste en inhibir la última etapa de síntesis de la pared bacteriana y además induce un efecto autolítico. Estos antibióticos se unen de manera irreversible a las proteínas de unión a penicilinas (PBP), las cuales tienen función de realizar la traspeptidación de los puentes peptídicos que tienen entre sí a los disacáridos conformados por N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico, provocando la interrupción de la síntesis de la pared celular. Esto ocasiona el debilitamiento de la pared de la bacteria y facilita la ruptura debido a la presión osmótica intracelular (Castellano, 2010).

Los antibióticos de este grupo se clasifican de la siguiente manera, como se muestra a continuación en la tabla 4.

Penicilinas		Cefalosporinas	
Penicilina G	Penicilina V	Cefalotina	Cedazolina
Oxacilina	Meticilina	Cefuroxima	Cefoxitina
Ampicilina	Amoxicilina	Cefotaxima	Ceftriaxona
Ticarcilina	Piperacilina	Ceftazidima	Cefeoime
Carbapenémicos		Monobactámicos	
Imipenem	Meropenem	Aztreonam	
Ertapenem			
Inhibidores de las $\beta$ -lactamasas			
Ácido clavulánico, Tazobactam, Sulbactam			

Tabla 4. Antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Martínez, 2017)

### 1.8.2 Grupo Aminoglucósidos.

Los aminoglucósidos son una familia de antibióticos bactericidas, muy activos especialmente frente a enterobacterias, bacterias Gram negativas y aeróbicas y actúan sinérgicamente en contra de los organismos Gram positivos. Actúan sobre la subunidad 30s de los ribosomas creando porosidades en la membrana externa de la pared celular bacteriana. (Badoo, 2008).

Poseen una acción bactericida rápida que se relaciona con la concentración que alcanzan. Actúan independientemente de la fase vital en que se encuentre la bacteria. Su actividad no se altera por la magnitud del inóculo bacteriano. Raramente los gérmenes adquieren resistencia durante el tratamiento. Se caracterizan por su estrecho margen terapéutico, lo que obliga a administrarlos bajo esquemas posológicos lo más exactos posible. Son nefro y ototóxicos (Castellano, 2010).

### 1.8.3 Grupo Glucopéptidos.

Son un grupo de péptidos que contienen azúcares ligadas a aminoácido, actúan inhibiendo la síntesis de peptidoglucano en un paso metabólico diferente y anterior a los agentes betalactámicos, por lo que altera la permeabilidad de membrana e inhibe la síntesis del RNA (García, 1999).

### 1.8.4 Grupo Lincosamidas.

Este grupo de antibióticos se une a la porción 23s de la subunidad 50s del ribosoma bacteriano, lo que inhibe la replicación temprana de la cadena peptídica a través de la reacción de la traspeptidasa. Pueden actuar como bacteriostáticos o bactericidas dependiendo de la concentración del fármaco que se tenga en el sitio de acción, así como de la susceptibilidad del microorganismo infectante (García, 1999).

### **1.8.5 Grupo Macrólidos**

Está conformado por un anillo lacónico macrocíclico unido por un enlace glucosídico a desoxiazúcares aminados. Son agentes bacteriológicos que inhiben la síntesis proteínica al unirse reversiblemente a la subunidad 50s del ribosoma bacteriano e impiden la translocación. Este grupo de antibióticos también puede utilizarse como bactericida, ya que, dependiendo de la dosis administrada, el tipo de microorganismo y el tiempo de exposición puede generar este efecto (Martínez, 2017).

### **1.8.6 Grupo Nitroimidazol**

Es un grupo de quimioterápicos de origen sintético que tienen efecto antibacteriano y antiparasitario por la degradación de ADN, se necesita que la reducción del grupo nitro hará que se produzca el efecto sobre el microorganismo, son de amplio espectro, se metabolizan en el hígado (Belloso, 2009).

### **1.8.7 Grupo Nitrofuranos**

Este tipo de antibióticos, se enlazan directamente las proteínas, son polvos cristalinos poco solubles en el agua, son termoestables, pero fotosensibles. Actúan directamente sobre las bacterias inhibiendo el metabolismo de los carbohidratos logrando evitar la formación de acetil-CoA a partir del piruvato y esto altera las vías de obtención de energía. Otra forma de acción es mediante sus metabolitos intermedios que originan la rotura de la cadena del DNA bacteriano. Actúan principalmente en las bacterias Gram negativas, pero también en lagunas Gram positivas, protozoarios, y hongos (Intramed, 2017).

### **1.8.8 Grupo Quinolonas**

Este grupo de antibióticos actúa inhibiendo directamente la síntesis de DNA, afectando a las enzimas girasas y helicasas que se encuentran encargadas de esta acción, se introduce a la bacteria por medio de porinas y una vez adentro actúa directamente en la enzima ADN-girasa (Lorenzo, 2008).

### **1.8.9 Grupo Tetraciclinas**

Es un grupo de antibióticos que abarca un amplio espectro en su actividad microbiana, están formados por un anillo de naftaleno de cuatro átomos, suelen extraerse de algunas bacterias, pero también son sintetizados químicamente. Actúan principalmente como bacteriostáticos a dosis habituales, pero también actúan como bactericidas a altas dosis, que generalmente son dosis tóxicas. Sus principales mecanismos de acción son: desacoplan la fosforilación oxidativa de las bacterias, provocan una inhibición de la síntesis proteica en la unidad 30s del ribosoma bacteriano y afectan a la membrana celular, permitiendo la salida de los componentes intracelulares (García, 1999).

### ***1.9 Mecanismos de Resistencia Bacteriana.***

Debido a la interacción que se ha dado entre las bacterias y los antibióticos ha traído como consecuencia el desarrollo de mecanismos que evitan o disminuye la acción del efecto de los antibióticos al microorganismo.

Sin embargo, también ha habido factores que favorecen el desarrollo de la resistencia a los antibióticos, como lo son el uso indiscriminado e inadecuado de los antibióticos y el uso prolongado de estos en la terapéutica.

Algunos de los mecanismos principales de resistencia generados por las bacterias son los siguientes (Crespo, 2005):

\* Inactivación enzimática del antimicrobiano: Puede llevarse a cabo por la hidrólisis o por la modificación de la estructura.

\* Modificación del sitio blanco del antibiótico: Se produce una reacción de la sensibilidad de la diana frente al antimicrobiano.

Estos dos primeros mecanismos se pueden dar debido a la mutación del ADN o por la adquisición de elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones, secuencias de inserción).

\* Sistema de expulsión: mecanismo por el cual se saca del interior de la bacteria al antimicrobiano.

### ***1.9 Biofilms e infecciones***

Las enfermedades infecciosas durante el siglo antepasado eran causadas por bacterias dotadas de mecanismos patogénicos específicos: difteria, tuberculosis, cólera, coqueluche, etc. Los antibióticos y vacunas desarrollados para estos patógenos lograron una notable eficacia en su control. En la actualidad estas bacterias han sido desplazadas del primer plano por microorganismos ubicuos, capaces de producir infecciones de tipo crónico, que responden pobremente a los tratamientos antibióticos y no pueden prevenirse mediante inmunización. Diversas publicaciones recientes señalan que, por lo menos, el 65% de todos los procesos infecciosos bacterianos humanos podrían involucrar biofilms (Tabla 5) (Costerton J. , 1995).

Microorganismo	Porcentaje del total de infecciones	Porcentaje de resistencia a los antibióticos	Infecciones causales
<i>Estafilococcus coagulasa negativas</i>	25%	89%	Sepsis (causa más frecuente)
<i>Staphylococcus aureus</i>	16%	60%	Neumonía (causa más frecuente)
<i>Enterococcus</i>	10%	29%	Infecciones de heridas quirúrgicas (causa más frecuente)
<i>Escherichia coli. Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter y Klebsiella pneumoniae</i>	23%	5 - 32 %	Neumonía e infecciones quirúrgicas.
<i>Clostridium difficile</i>	13%	-	Casi la mitad de todas las diarreas nosocomiales.
Hongos ( <i>Candida albicans</i> )	6%	-	Infecciones urinarias y sepsis
Otras bacterias Gram Negativas ( <i>Acinetobacter, Citrobacter, Haemophilus</i> )	7%	-	Infecciones urinarias e infecciones de heridas quirúrgicas.

Fuente: Datos de los CDC, National Nosocomial Infections Surveillance.

Tabla 5: Microorganismos que intervienen en la mayoría de las enfermedades nosocomiales

Las bacterias que producen biofilm pueden causar una gran cantidad de patologías en el ser humano, por ejemplo: caries dental, enfermedades periodontales, otitis media, infecciones del tracto biliar y endocarditis (Figura 5 y 6) (Tabla 6). Estas enfermedades son de curso crónico, persistente y de difícil eliminación (Costerton, 1999)



Figura 5. Dientes con caries (Dientitos, 2017)



Figura 6. Paciente con catéter venoso central (Vallasedo, 2017)

Infección o enfermedad	Especie bacteriana formadora de biofilm
Caries dental	Cocos Gram positivos acidogénicos (ej. Streptococcus)
Periodonditis	Bacterias anaeróbicas orales Gram negativas
Otitis media	Cocos Gram positivos (ej. Staphylococcus )
Infecciones del músculo-esqueleto	Cocos Gram positivos acidogénicos (ej. Streptococcus)
Fascitis necrotizante	Streptococos Grupo A
Osteomielitis	Varias especies bacterianas y fúngicas, generalmente mezcladas
Prostatitis bacteriana	<i>Escherichia coli</i> y otras bacterias Gram negativas
Endocarditis de la válvula nativa	<i>Streptococcus</i> del grupo "viridans"
Neumonía por fibrosis quística	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>
Meloidosis	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Infecciones Nosocomiales:	
Neumonía (cuidados intensivos)	Bacilos Gram negativos
Saturas	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>
Orificios de salida	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Vías arteriovenosas	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Bucles esclerales	Cocos Gram positivos
Lentes de contacto	<i>P.aeruginosa</i> y Cocos Gram positivos
Cistitis por catéteres urinarios	<i>E. coli</i> y otros bacilos Gram negativos
Peritonitis por diálisis peritoneal	Una variedad de bacterias y hongos
DIU	<i>Actinomyces israeli</i> y muchos otros microorganismos
Tubos endotraqueales	Una variedad de bacterias y hongos
catéteres hickman	<i>S. epidermidis</i> y <i>Candida albicans</i>
Catéteres centrales venosos	<i>S. epidermidis</i> y otros
Válvulas mecánicas del corazón	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Injertos vasculares	Cocos Gram positivos
Bloqueos del conducto biliar	Una variedad de bacterias entéricas y hongos
Dispositivos ortopédicos	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Prótesis del pene	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>

Tabla 6.- Lista parcial de infecciones humanas en las que se involucran biofilms bacterianos. (Costerton, 1999).

Se han relacionado algunas infecciones con los implantes médicos y otras infecciones crónicas como la otitis media, neumonía en pacientes con fibrosis quística, infecciones urinarias crónicas, infecciones de próstata y osteomielitis. El análisis directo de los implantes y tejido o el implante produciendo biofilms. Dentro del biofilms las bacterias están protegidas de la acción de los anticuerpos, del ataque de las células fagocíticas y de los tratamientos antimicrobianos.

Debido a la capacidad de *S.aureus* y *S. epidermidis* para producir biofilm, estas bacterias son capaces de adherirse a dispositivos plásticos (prótesis ortopédicas, válvulas cardíacas, marcapasos, lentes de contacto, injertos plásticos y dispositivos intravenosos). De hecho, se considera factor de virulencia importante para el desarrollo de infecciones relacionadas a dispositivos médicos y representa un serio problema debido a su difícil tratamiento (Betancourt, 2004).

### **1.9.1 Bacteremia resistente.**

La bacteremia resistente secundaria a un catéter colonizado implica el retiro del dispositivo. El hecho de obtener hemocultivos periféricos positivos tras 72 horas implica serias secuelas de la infección relacionada a catéter y deberá descartarse complicaciones como endocarditis, trombos sépticos o focos metastáticos de infección. En caso de confirmarse una de estas complicaciones el tratamiento se prolongará como mínimo 4 semanas y con ello costos y estancia hospitalaria (Lasa, 2005).

### **1.9.2 Endocarditis de válvulas nativas**

Un catéter intravascular colonizado es la fuente más comúnmente identificada de endocarditis nosocomial, reportándose como la causa en uno o dos tercios. La endocarditis infecciosa es una grave infección localizada en el endocardio especialmente en su superficie valvular, que es generalmente ocasionada por bacterias y con menos frecuencia por hongos, cuyo hecho clínico tienen como origen la presencia de una vegetación, constituida por depósitos de fibrina, plaquetas y microorganismos circulares, la cual puede producir manifestaciones embolicas y causar disfunción cardiaca (Lasa, 2005).

Hasta la era antibiótica su mortalidad fue prácticamente 100%. En el momento actual su mortalidad es importante, oscilando entre 20% a un 30%, siendo factores de mal diagnóstico, la edad avanzada, la presencia de infección sobre material protésico, entre muchos otros factores (Strinder, 1985)

### **1.9.3 Trombosis séptica.**

La trombosis séptica es una complicación seria de una cauterización intravascular, puede afectar tanto venas femorales, como arterias. Puede complicarse con émbolos sépticos pulmonares. Esta complicación suele manifestarse después del retiro del catéter dado que el paciente continúa febril y con cultivos positivos. En el caso de que la complicación sea en una nueva periferia los datos clínicos que la sugieren son dolor localizado, eritema, edema, cordón palpable o drenaje purulento. En caso de ser una arteria la afectada se puede presentar con un pseudoaneurisma o lesiones embolicas en la extremidad afectada. Los pacientes con afección de las grandes venas pueden tener edema ipsilateral del cuello, tórax o extremidades superiores. El tratamiento además del retiro del catéter implica la utilización de antibióticos, la necesidad de drenaje quirúrgico o escisión y uso de agentes trombolíticos (Martinez, 2017).

### ***1.10 Diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con catéteres.***

Para realizar el diagnóstico microbiológico del patógeno que se encuentra en los catéteres, primero, se debe realizar la obtención del microorganismo; posterior a eso la identificación y obtener la sensibilidad y resistencia que presenta ante una serie de antibióticos, para realizar todo este procedimiento hay una amplia metodología, sin embargo, los métodos más relevantes se muestran a continuación.

#### **1.10.1 Cultivos microbianos.**

- Cultivo cualitativo de la punta del catéter.

Es una técnica sencilla, utilizada en muchos laboratorios con anterioridad a 1977. Consiste en cortar asépticamente el extremo distal del catéter e introducirlo en un tubo con medio de cultivo líquido. A pesar de su gran sencillez y sensibilidad, tiene el inconveniente de ser un método que no cuantifica el número de unidades formadoras de colonias (UFC) y por tanto no permite diferenciar una colonización significativa de la posible contaminación accidental del catéter en el momento de su retirada, ya que un único microorganismo viable puede dar lugar a un cultivo positivo tras 18 horas de incubación a 35°C. En el momento actual no se recomienda el uso del cultivo cualitativo (Bouza, 2004).

- Cultivo semicuantitativo de la punta del catéter

Fue descrita por primera vez por Maki y cols. en 1977. Este método cultiva la superficie externa de la punta del catéter. La técnica consiste en rodar tres o cuatro veces sobre la superficie de una placa de agar sangre, con la ayuda de asa bacteriológica, el segmento intravascular del catéter (3-4 cm del extremo distal). Cuando en el cultivo crece  $\geq 15$  UFC por placa, se considera que el catéter está colonizado. El criterio de positividad ( $\geq 15$  UFC) fue elegido porque la mayoría de los pacientes con recuentos inferiores no presentaban datos sugestivos de infección, mientras que todos los casos que cursaban con bacteriemia tuvieron recuentos superiores a 15 UFC y con frecuencia las colonias fueron incontables. La especificidad de esta técnica fue del 76%.

Este método, por su sencillez ha sido aceptado por la mayoría de los laboratorios de microbiología y es la técnica de referencia. Sin embargo, tiene algunas limitaciones, ya que la mayoría de los catéteres utilizados en estos estudios fueron catéteres periféricos y por otra parte es imposible calcular la sensibilidad de la técnica ya que las definiciones de infecciones relacionadas con catéter, de bacteriemia relacionada con catéter (BRC) y de fungemia relacionada con catéter (FRC) exigen

un cultivo positivo de la punta del catéter. Diversos estudios con catéter venoso central han demostrado la existencia de casos de sepsis asociados a recuentos inferiores a 15 UFC o incluso negativos por esta técnica, particularmente si la sepsis es de origen endoluminal. La disminución del criterio de positividad de 15 a 5 UFC puede mejorar la sensibilidad de la prueba, pero disminuye su especificidad. Un cultivo de catéter positivo por la técnica de Maki tiene escaso valor predictivo positivo (VPP) de BRC. Dicho valor sólo puede ser aumentado si se seleccionan catéteres de pacientes con sospecha clínica de BRC. Aunque la simplicidad técnica de esta prueba diagnóstica ha generalizado su uso, no hay que olvidar que existe alrededor de un 15% de bacteriemias de origen endoluminal, especialmente en catéteres de larga duración, que podrían no ser diagnosticadas si sólo se realiza el cultivo semicuantitativo (Bouza, 2004)

### **1.10.2 Identificación microbiana mediante el sistema Vitek 2 de Biomerieux.**

El sistema VITEK 2 de BioMeriux, es un sistema automatizado de identificación bacteriana y estudio de sensibilidad antimicrobiana, que proporciona la identificación automática de las muestras ingresadas dentro de las 8 horas de la inoculación. Está integrado por una unidad de llenado-selladora, un lector-inoculador, un módulo de control computarizado, una terminal de datos y una impresora de múltiples copias, utiliza una base de datos de conocimiento altamente desarrollado, que contiene alrededor de 20,000 fenotipos (Fagundo, 2007).

La identificación de las bacterias se basa en la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas con determinados paneles de reacciones bioquímicas. La sensibilidad antimicrobiana se lleva a cabo en forma similar a través de tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad establecidos por NCCLS. Este sistema se ha empleado para el estudio de cepas clínicamente significativas, aisladas de muestras clínicas u otras fuentes como alimentos y agua (Jorda, 2005).

VITEK 2 es un sistema que utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos, las que son inoculadas con la suspensión de un cultivo puro microbiano y el perfil de desarrollo es interpretado de forma automática.



**Figura 7- Equipo VITEK 2**

Las tarjetas reactivas tienen 64 pozos que contienen, cada uno, un sustrato de prueba individual. Con estos sustratos se miden varias actividades metabólicas como acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimáticas y desarrollo en presencia de sustancias inhibitoras, con lo cual detecta la proliferación bacteriana y los cambios metabólicos llevados a cabo en las microceldas de las tarjetas. Las tarjetas están selladas en ambos lados por una película clara que evita el contacto entre las diferentes mezclas sustrato-microorganismo y a la vez permite la transmisión del nivel de oxígeno apropiada. Cada tarjeta tiene un tubo de transferencia pre-insertado para la inoculación. Estas tarjetas tienen códigos de barras que contienen información sobre el tipo de producto, número de lote, fecha de caducidad y un identificador único que puede ser ligado a la muestra ya sea antes o después de cargar la tarjeta al sistema (Figura 8) (Fagundo, 2007).



Figura 8. Tarjeta de identificación microbiana para equipo VITEK2.

### 1.10.3 Identificación de la Sensibilidad a antibióticos mediante el sistema Vitek 2 de Biomerieux.

El sistema de detección de sensibilidad a antibióticos por medio de tarjetas se lleva a cabo de manera similar como sucede en las tarjetas de identificación microbiana, las tarjetas contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte establecidos por el NCCLS. (Biomerieux, 2017)

Estas tarjetas se utilizan para la detección de resistencia para cocos Gram positivos, bacilos Gram negativos y levaduras, es un sistema rápido fiable y preciso, las pruebas se corren en 4 horas, contienen un código de barras para tener una trazabilidad adecuada.

Las tarjetas para sensibilidad a Gram negativos, realiza la dilución para los siguientes antibióticos: Benzilpenicilina (BEP), Ciprofloxacina (CIP), Clindamicina (CC), Eritromicina (E), Gentamicina (GE), Levofloxacina (LEV), Linezolid (LIN), Moxifloxacina (MOX), Nitrofurantoina (NTF), Oxacilina (OX), Quinupristina/Dalfopristina (QND), Rifampicina (RA), Tetraciclina (TE), Tigeciclina (TIC), Trimetropina/Sulfametoxazol (STX) y Vancomicina (VA).

Mientras que para las bacterias Gram negativas se utilizan los siguientes antibióticos: Amikacina (AK), Ampicilina (AM), Amicilina/Sulbactam (AMS), Aztreonam (AZT), Cefazolina (CZ), Cefepime (FEP), Ceftriaxona (CRO), Ciprofloxacina (CIP), Gentamicina (GE), Imipenem (IMP), Meropenem (MRP), Moxifloxacina (MOX), Nitrofurantoina (NTF), Piperaciclina/Tazobactam (PPT), Tigeciclina (TG), Tobramicina (TOB), Trimetropina/fulfametazol (STX).

**Base de datos:** Las bases de datos de los productos de identificación están construidas con un gran número de cepas de microorganismos perfectamente caracterizados y probados bajo varias condiciones de cultivo. Estas cepas provienen de una variedad de fuentes clínicas e industriales, así como de colecciones de cultivo públicas y universitarias.

## **2.- JUSTIFICACIÓN.**

Actualmente en los hospitales se atienden a pacientes graves a los cuales se les llega a colocar catéteres venosos centrales ya sea para administración de líquidos, nutrientes, medicamentos o productos sanguíneos. Lo que aumenta el riesgo de una posible infección relacionada a este tipo de catéteres venosos centrales, lo que a su vez genera que se dé un mayor tiempo de hospitalización del paciente, aumento en los costos de atención médica y el riesgo de complicaciones. Hay algunas bacterias que se consideran comunes en los catéteres y por eso se les resta importancia cuando se llegan a aislar en una muestra de catéter venoso central, pero en realidad existe una posibilidad de que este tipo de bacterias sean productoras de biopelícula. Por lo que ayudar a conocer si este tipo de bacterias encontradas en catéteres venosos centrales se relacionan a complicaciones permitirá que los médicos puedan dar tratamientos terapéuticos más adecuados al tipo de microorganismo que se está tratando.

## **3.- OBJETIVOS.**

### ***3.1 Objetivos Generales.***

Aislar e identificar las bacterias productoras de biofilm que se obtengan de los catéteres venosos centrales de pacientes internos del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI mediante la utilización de la técnica de Maki.

### ***3.2 Objetivos particulares.***

Haciendo uso de la técnica de Maki obtener:

- Resembrar e incubar las bacterias obtenidas de los catéteres en medio Agar sangre.
- Identificar cuál de los dos medios (Caldo Soya Trypticase o Infusión Cerebro Corazón) es el óptimo para el crecimiento de bacterias productoras de biofilm.
- Determinar cuál es el tiempo óptimo (24, 48 o 72 hrs.) en el que se produce una mayor formación de biofilm.
- Determinar el colorante (Cristal violeta o Safranina) que permite una mejor tinción de la formación de biofilm.
- Identificar a los microorganismos causantes de biofilm y su patrón de resistencia y sensibilidad a antibióticos.

## 4.- METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

### **4.1 Población de estudio.**

Se incluyeron un total de 75 pacientes que fueron ingresados y hospitalizados en los diversos servicios médicos que se brindan en el Hospital Centro Médico Nacional SXXI. Las muestras se obtuvieron en el área de microbiología del laboratorio del Hospital de especialidades del Centro Médico Nacional SXXI.

### **4.2 Materiales, equipos y reactivos.**

La lista del equipo, material y reactivos utilizados se detalla en el anexo A.

### **4.3.-Aislamiento e identificación de la muestra.**

#### **4.3.1 Aislamiento de la muestra: Prueba de Maki.**

De cada uno de los catéteres venosos centrales que ingresaron al laboratorio de microbiología se obtuvo una muestra con una longitud de 3 a 4 cm del extremo distal que se rodó de tres a cuatro veces sobre la superficie de una placa de Agar Gelosa Sangre con la ayuda de un asa bacteriológica, esta placa se incubó en una estufa a  $35 \pm 2$  °C y se realizó la lectura de la placa a las 24 y 48 horas para determinar el crecimiento bacteriano. Se tomó como criterio de colonización significativa la presencia de igual o mayor a 15 UFC por cada placa, en caso de haberse encontrado el desarrollo de más de una colonia diferente, se aisló cada colonia.



**Figura 9. Muestra de catéter venoso central para la prueba de Maki.**

#### **4.3.2 Identificación y sensibilidad.**

De una muestra positiva se transfirió con asa estéril una cantidad suficiente de inóculo bacteriano a un tubo de ensaye de polietileno claro de 12x75mm con 3mL de solución salina estéril. Posteriormente se ajustó la turbiedad a 0.50-0.63 de la escala de McFarland con ayuda del densitómetro DensiChek™. Se colocó el tubo de ensaye con la suspensión bacteriana dentro de la gradilla especial (cassette) y la tarjeta de identificación se colocó en la ranura cercana, insertando el tubo de transferencia dentro del tubo de la suspensión correspondiente a la muestra, después del tubo con muestra se colocó un tubo vacío y a dentro de este se puso el tubo de transferencia de la tarjeta de sensibilidad. El cassette con las muestras se colocó en el equipo Vitek 2 de Bioterieux para ser procesado y obtener los resultados.

Una vez dentro del equipo, las muestras se someten a los siguientes procesos de forma automática:

**Inoculación:** Las muestras son transportadas a una cámara en la que se aplica vacío y enseguida se reintroduce nuevamente el aire, esta acción hace que la suspensión bacteriana pase a través del tubo de transferencia hacia los microcanales y se llenan todos los pozos.

**Sellado e inoculación de las tarjetas:** Las tarjetas inoculadas pasan por un mecanismo que corta los tubos de transferencia y las sella, previo a la carga dentro del carrusel incubador. Todos los tipos de tarjetas se incuban en línea  $35 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ .

**Lectura de las reacciones:** Cada tarjeta es removida del carrusel-incubador cada 15 min y transportada al sistema óptico de transmitancia el cual usa diferentes longitudes de onda del espectro visible para interpretar las reacciones de turbiedad o color de los productos metabólicos, y es devuelta a su sitio en el carrusel hasta el siguiente tiempo de lectura. Los datos son registrados a intervalos de 15 min durante el periodo total de incubación.

Los cálculos se realizan con los datos “crudos” y se comparan en los umbrales para determinar las reacciones para cada prueba. Los resultados aparecen como “+”. “-“o cuando son reacciones débiles se indican cómo “?”.

#### ***4.4 Producción de biofilm. (ver diagrama de metodología)***

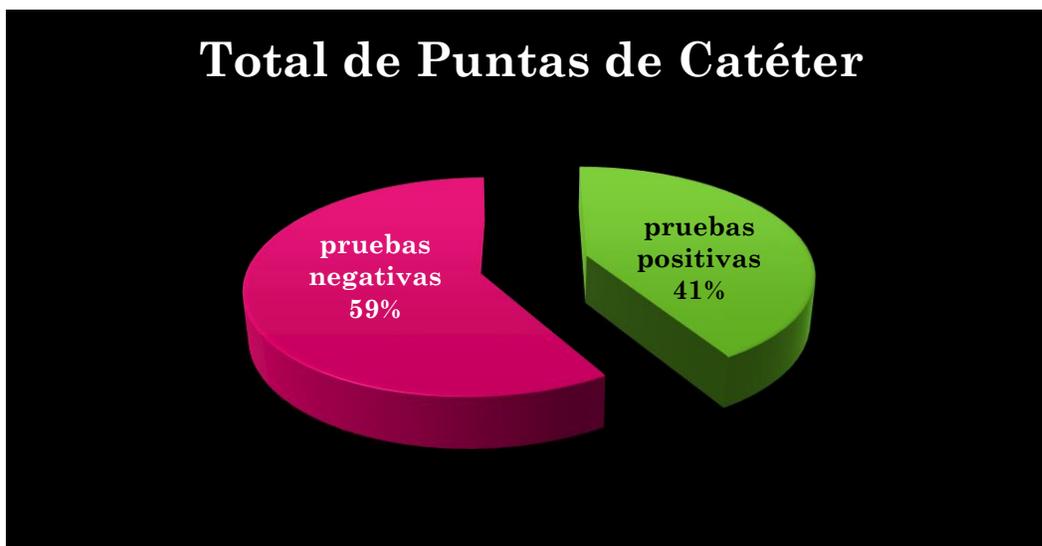
Para cada muestra bacteriana identificada se utilizaron dos series de 6 tubos cada uno, para cada serie se rotulan dos tubos con la leyenda 24 hrs, dos con 48 hrs y 2 con 72 hrs. A una serie de tubos se le adicionaron 3mL de caldo infusión cerebro-corazón (BHI) y a la otra serie de tubos se le adicionaron 3mL de Caldo Soya Trypticase (CST), se preparó una suspensión bacteriana, ajustada de 0.5 a 0.6 unidades en la escala de McFarlan empleando el densitómetro DensiChek <sup>TM</sup>, se inocularon cada serie de tubos con 0.1 mL de muestra. Se incubaron todos los tubos con las muestras en la estufa a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se fueron sacando los tubos de las dos series en las horas que están rotuladas (24, 48 o 72 hrs). Se eliminó el caldo del cultivo de los tubos (en un contenedor para ser esterilizado a  $121^{\circ}\text{C}/15$  lb durante 15 min.) y se adicionaron 2 mL de Safranina al 1% a un tubo de BHI y uno de CTS, posteriormente se colocaron 2mL de Cristal violeta al 1% a otros tubos de BHI y CTS. Se rotaron los tubos cuidadosamente durante tres minutos a temperatura ambiente para asegurar una tinción uniforme del material adherido a las paredes, se escurrió el colorante de los tubos y se lavaron con solución salina o Buffer de fosfatos estériles tres veces. Se colocaron los tubos boca abajo sobre una superficie absorbente hasta que se secaron. La prueba se consideró positiva cuando se observó la formación de una película teñida en la superficie interna del tubo; se hace una estimación en cruces.

## 5.-RESULTADOS

### **5.1 Prueba de Maki.**

La población total de estudio correspondió a 75 puntas de catéter que llegaron al servicio de bacteriología del laboratorio del Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional SXXI de octubre del 2013 a Enero del 2014, estos fueron tomados de los pacientes hospitalizados en los diversos servicios médicos que brinda el Hospital.

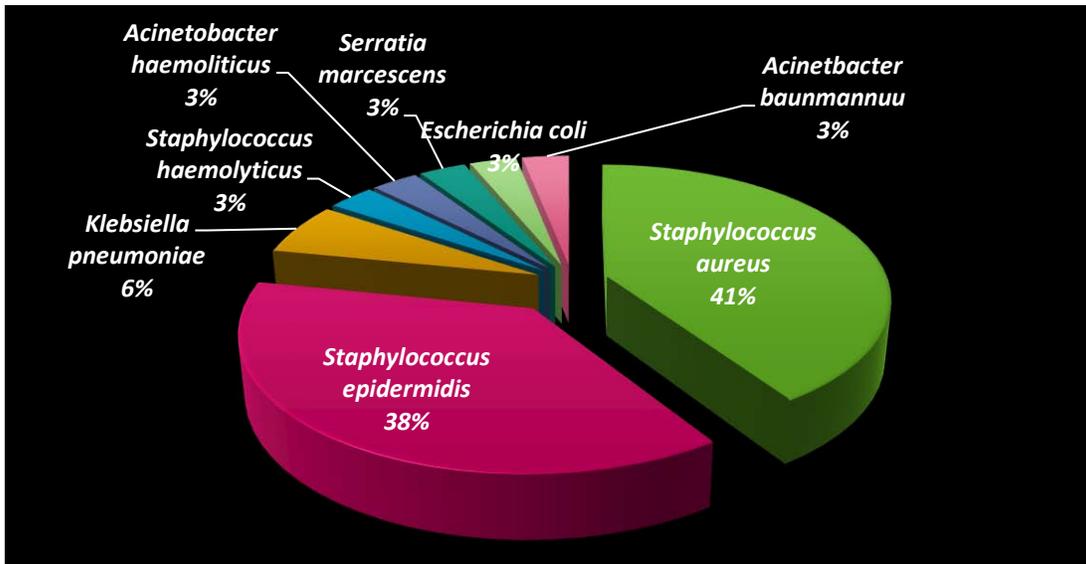
De las 75 muestras de catéter, se obtuvieron 31 catéteres positivos (41%) y 44 negativos (59%) que se puede observar en la gráfica 1.



Gráfica 1.- Total de muestras de puntas de catéter obtenidas durante el estudio.

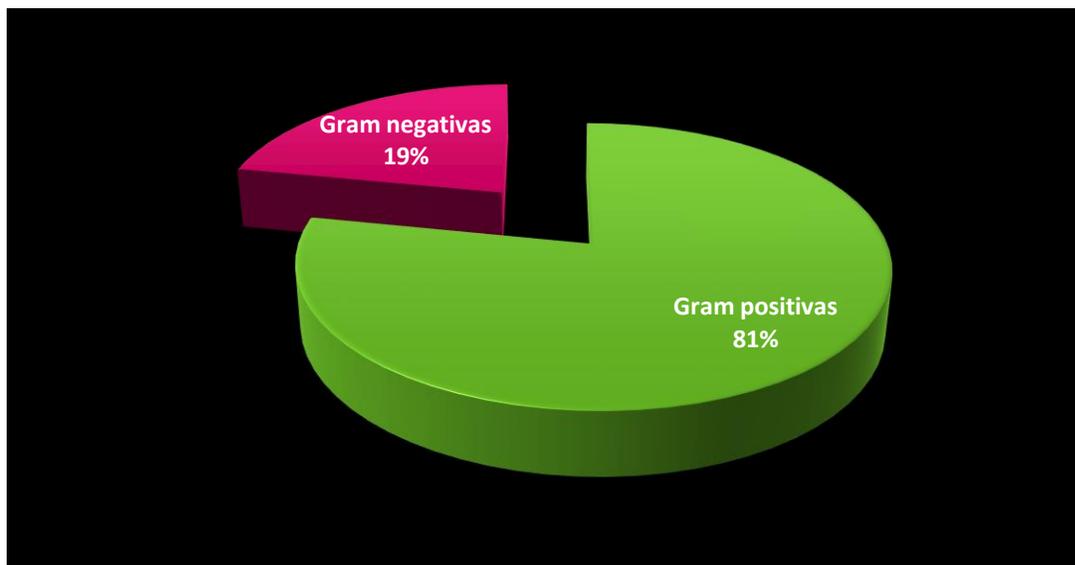
### **5.2 Identificación y sensibilidad.**

La identificación de las bacterias obtenidas se realizó mediante el procesamiento automatizado a través del equipo Vitek 2, en el cual, se realizaron una serie de pruebas bioquímicas para determinar el género y especie de la bacteria o bacterias de aisladas en cada muestra obtenida. Por lo que, de las 31 pruebas positivas, se encontró que en total se aislaron 32 bacterias, de las cuales *Staphylococcus aureus* fueron 13 (41%), *Staphylococcus epidermidis* 12 (38%), *Klebsiella pneumoniae* 2 (6%), *Acinetobacter baumannii* 1 (3%), *Acinetobacter haemolyticus* 1 (3%), *Escherichia coli* 1 (3%), *Staphylococcus haemolyticus* 1 (3%) y *Serratia marcescens* 1 (3%) (Gráfica 2)



Gráfica 2- Total de muestras positivas obtenidas en los catéteres.

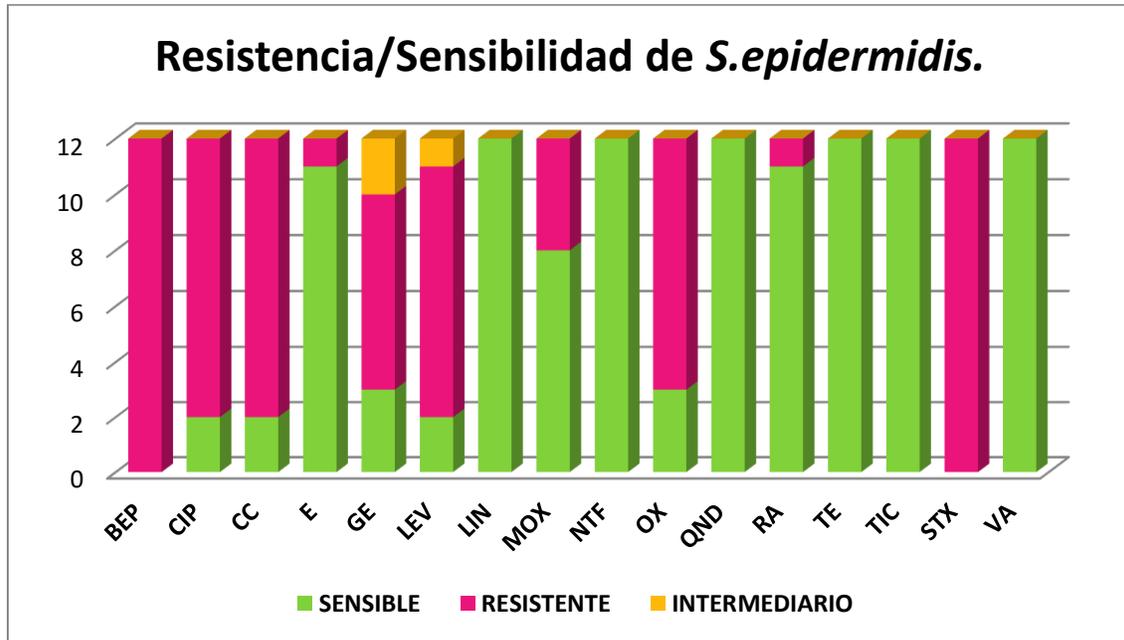
La sensibilidad se determinó de en el mismo equipo, en este caso, se clasifica en dos rubros muy grandes, las bacterias Gram positivas y las Bacterias Gram negativas. De las 32 bacterias, 26 (81%) pertenecen a las bacterias Gram positivas y 6 (19%) a las bacterias Gram negativas (Gráfica 3).



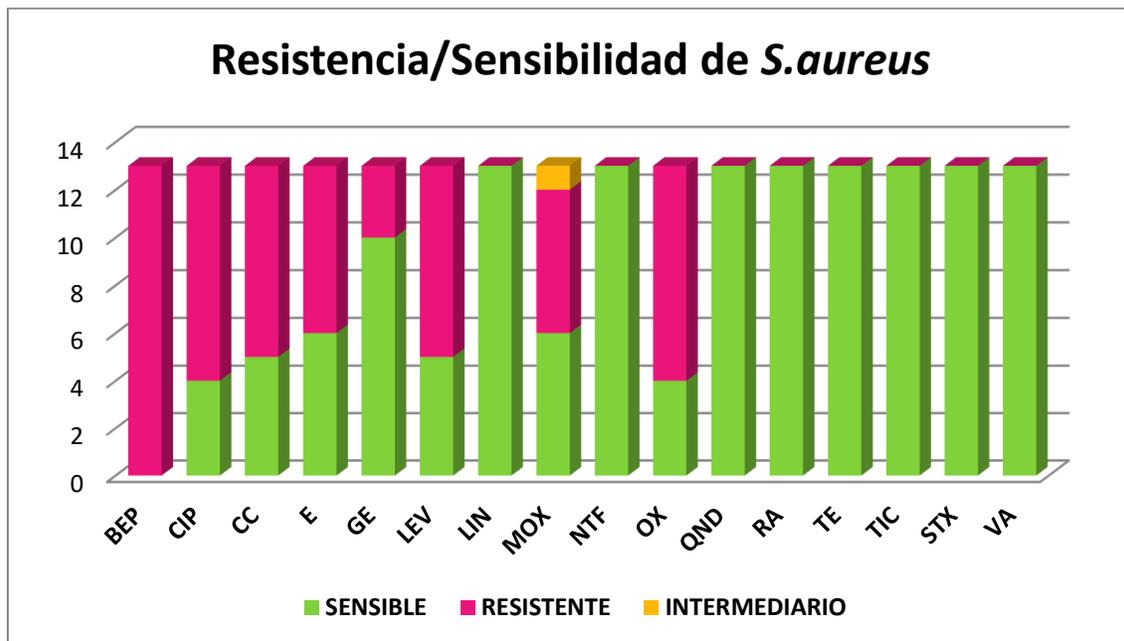
Gráfica 3.- Porcentaje de Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas obtenidas en las muestras positivas

Se realizó la determinación de los perfiles de sensibilidad/resistencia a 16 antibióticos, para las bacterias *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. aemoliticus* que pertenecen a las bacterias Gram positivas obtenidas en las muestras de catéteres en pacientes. Los antibióticos evaluados fueron: Benzilpenicilina (BEP), Ciprofloxacina (CIP), Clindamicina (CC), Eritromicina (E), Gentamicina (GE), Levofloxacina (LEV), Linezolid (LIN), Moxifloxacina (MOX), Nitrofurantoina (NTF), Oxacilina (OX),

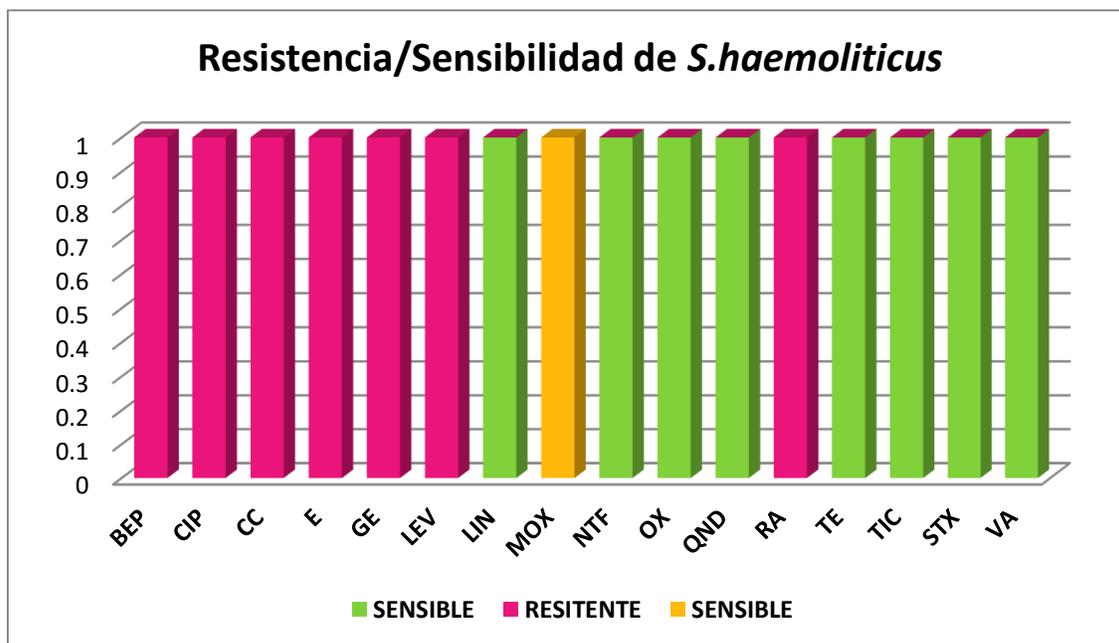
Quinupristina/Dalfopristina (QND), Rifampicina (RA), Tetraciclina (TE), Tigeciclina (TIC), Trimetroprina/Sulfametoxazol (STX) y Vancomicina (VA). En las gráficas 4, 5 y 6 se muestra el perfil de resistencia/sensibilidad para las bacterias Gram positivas.



Gráfica 4.- Resistencia y sensibilidad que presentó *S.epidermidis* ante los 16 antibióticos a los que se sometió.

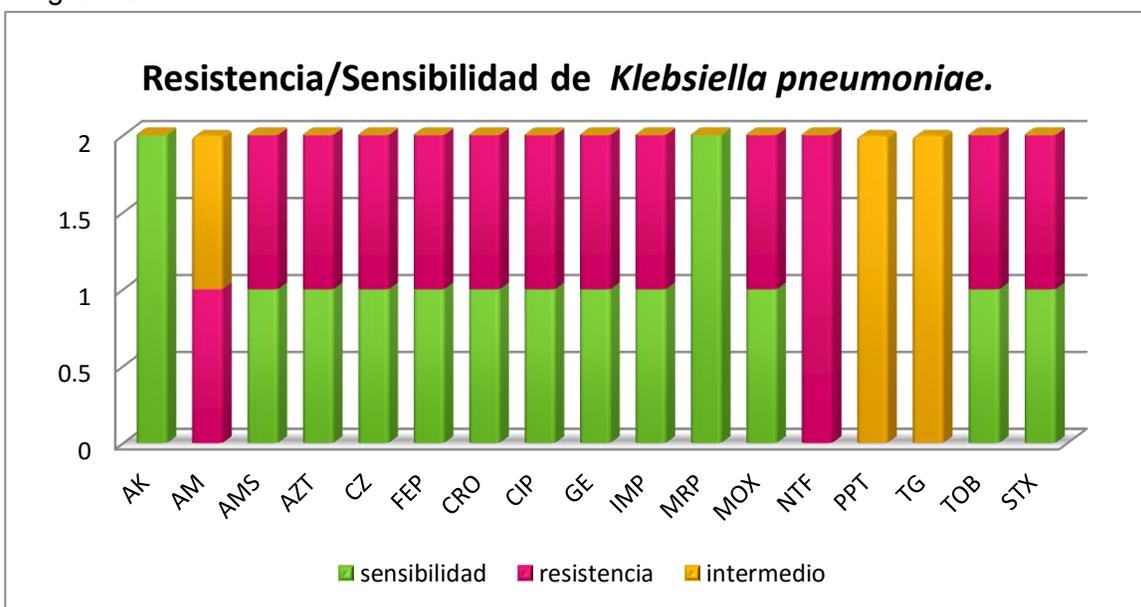


Gráfica 5.- Resistencia y sensibilidad que presentó *S.aureus* ante los 16 antibióticos a los que se sometió.

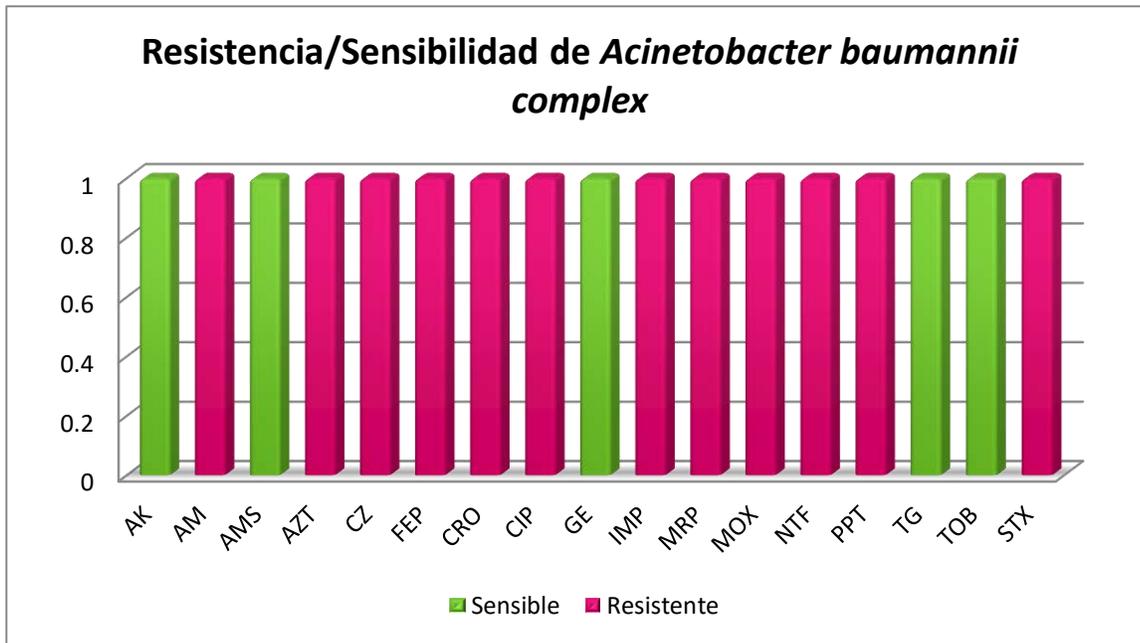


Gráfica 6.- Resistencia y sensibilidad que presentó *S.haemoliticus* ante los 16 antibióticos a los que se sometió.

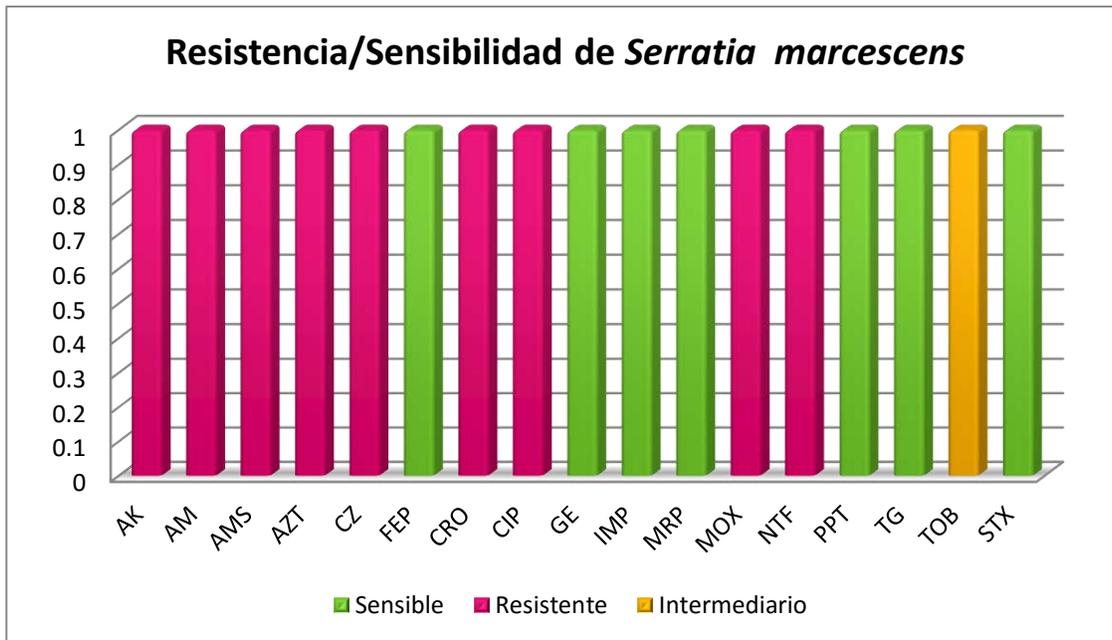
Para las bacterias Gram negativas *Klebsiella pneumoniae*, *Acinobacter baumannii* complex, *Serratia marcescens* y *Escherichia coli* se les realizó la determinación de los perfiles de sensibilidad/resistencia a 17 antibióticos: Amikacina (AK), Ampicilina (AM), Amicilina/Sulbactam (AMS), Aztreonam (AZT), Cefazolina (CZ), Cefepime (FEP), Ceftriaxona (CRO), Ciprofloxacina (CIP), Gentamicina (GE), Imipenem (IMP), Meropenem (MRP), Moxifloxacina (MOX), Nitrofurantoina (NTF), Piperaciclina/Tazobactam (PPT), Tigeciclina (TG), Tobramicina (TOB), Trimetropina/sulfametazol (STX). En las gráficas 7, 8, 9 y 10 se muestra el perfil de resistencia/sensibilidad para las bacterias Gram negativas.



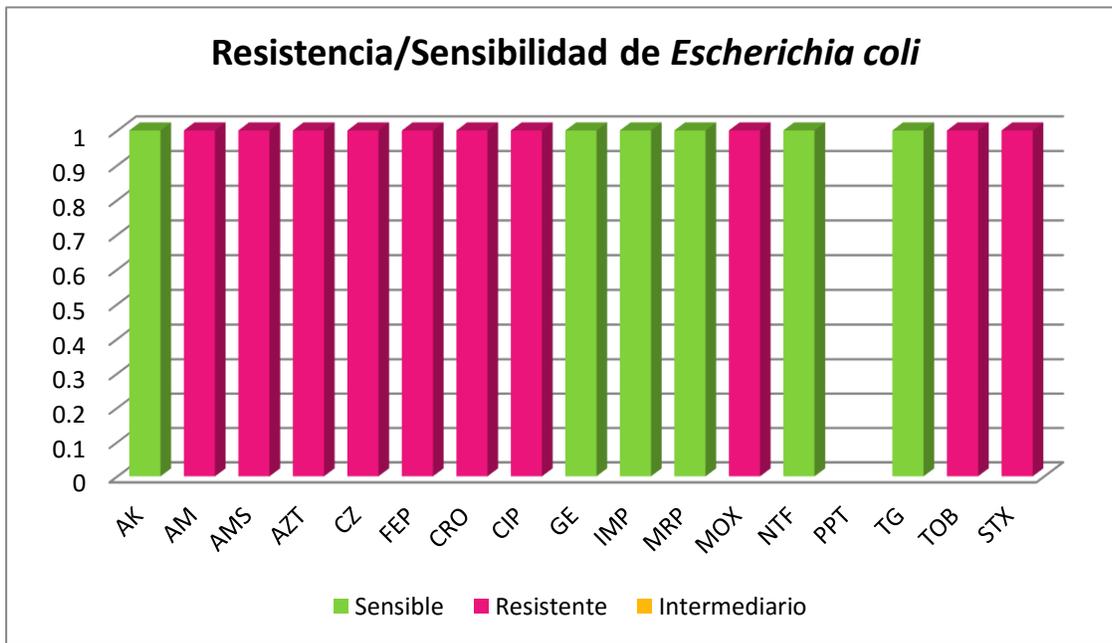
Gráfica 7.- Resistencia y sensibilidad que presentó *Klebsiella pneumoniae* ante los 16 antibióticos a los que se sometió.



Gráfica 8.- Resistencia y sensibilidad que presentó *Acinetobacter baumannii* complex ante los 16 antibióticos a los que se sometió.



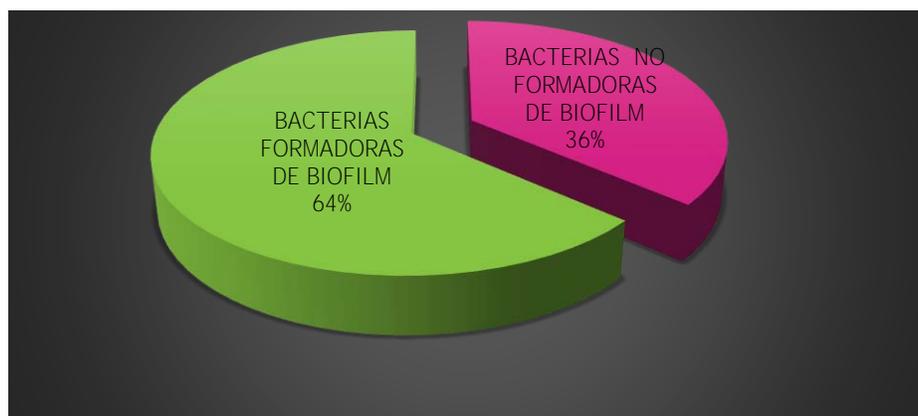
Gráfica 9.- Resistencia y sensibilidad que presentó *Serratia marcescens* ante los 16 antibióticos a los que se sometió.



Gráfica 10.- Resistencia y sensibilidad que presentó *Escherichia coli* ante los 16 antibióticos a los que se sometió.

### 5.3 Producción de Biofilm.

Se realizaron una serie de ensayos para la formación de Biofilm para todas las cepas obtenidas a tiempos distintos (24, 48 y 72 hrs.) en dos medios distintos: caldo infusión cerebro-corazón (BHI) y Caldo Soya Trypticasa (CST), para ver si el enriquecimiento y composición de los medios afectaba en alguna medida en el crecimiento de las bacterias. Así mismo se determinó que del total de las 32 bacterias aisladas solamente 21 muestras (64%) presentan una formación de biofilm y 12 muestras (36%) tienen poca o nula formación de biofilm lo que no representa relevancia para considerarlo como resultado positivo, estos resultados se presentan en la gráfica 11.



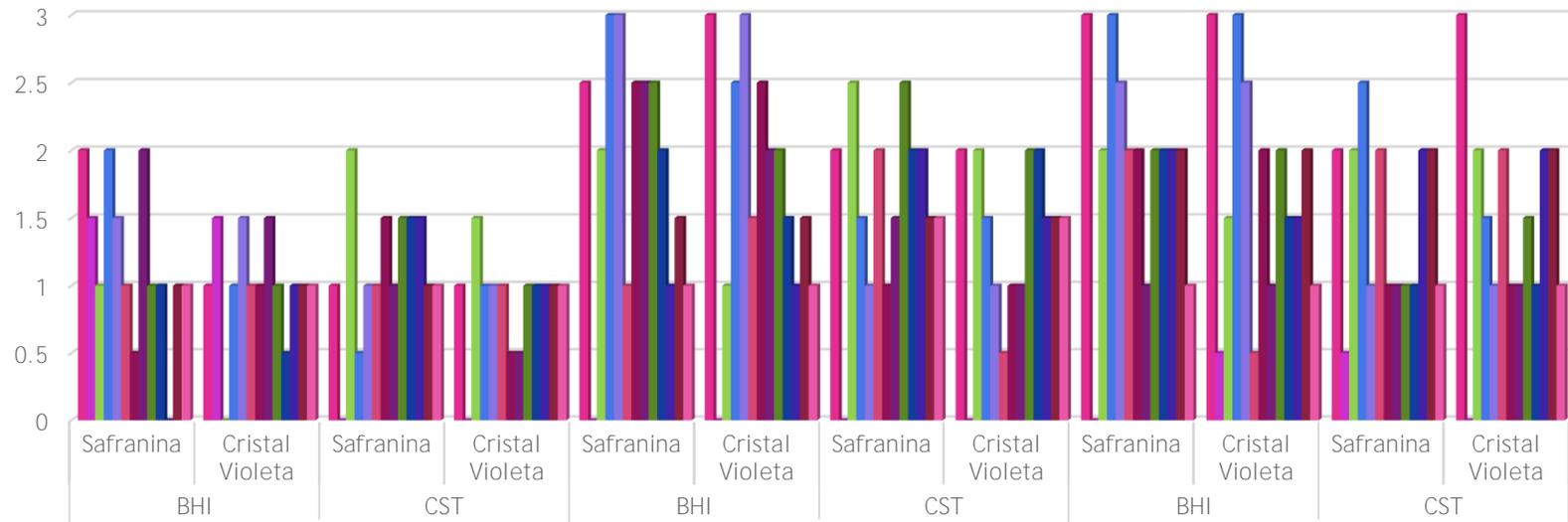
Gráfica 11.- Bacterias que presentaron una formación de biofilm.

La mayoría de las muestras que tuvieron un resultado negativo para la formación de biofilm son Gram negativas, a continuación, se muestra en la tabla 7 los resultados que se obtuvieron de 6 de las 12 bacterias Gram negativas. Las muestras que se presentaron con una formación de biofilm positivo fueron las muestras que tenían *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* (Figuras 9, 10, 11 y 12), aunque también hubo algunas muestras que contenían estas bacterias y que presentaron muy poca o nula formación de biofilm y se incluyeron en las gráficas y tablas de estas bacterias, como se muestra a continuación en la gráfica 12 y gráfica 13.

Tiempo	24 Horas				48 Horas				72 Horas			
	Medio		Medio		Medio		Medio		Medio		Medio	
Colorante	Safranina	Cristal V.										
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	0	1	0	1	1.5	1.5	1	1	0.5	1	0	0.5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	1	0.5	1	1	0.5	0.5
<i>klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0	0	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 7.- Resultados para Bacterias que presentaron una nula formación de biofilm representado en cruces.

Formación de biofilm para *Staphylococcus aureus* a 24, 48 y 72 horas.

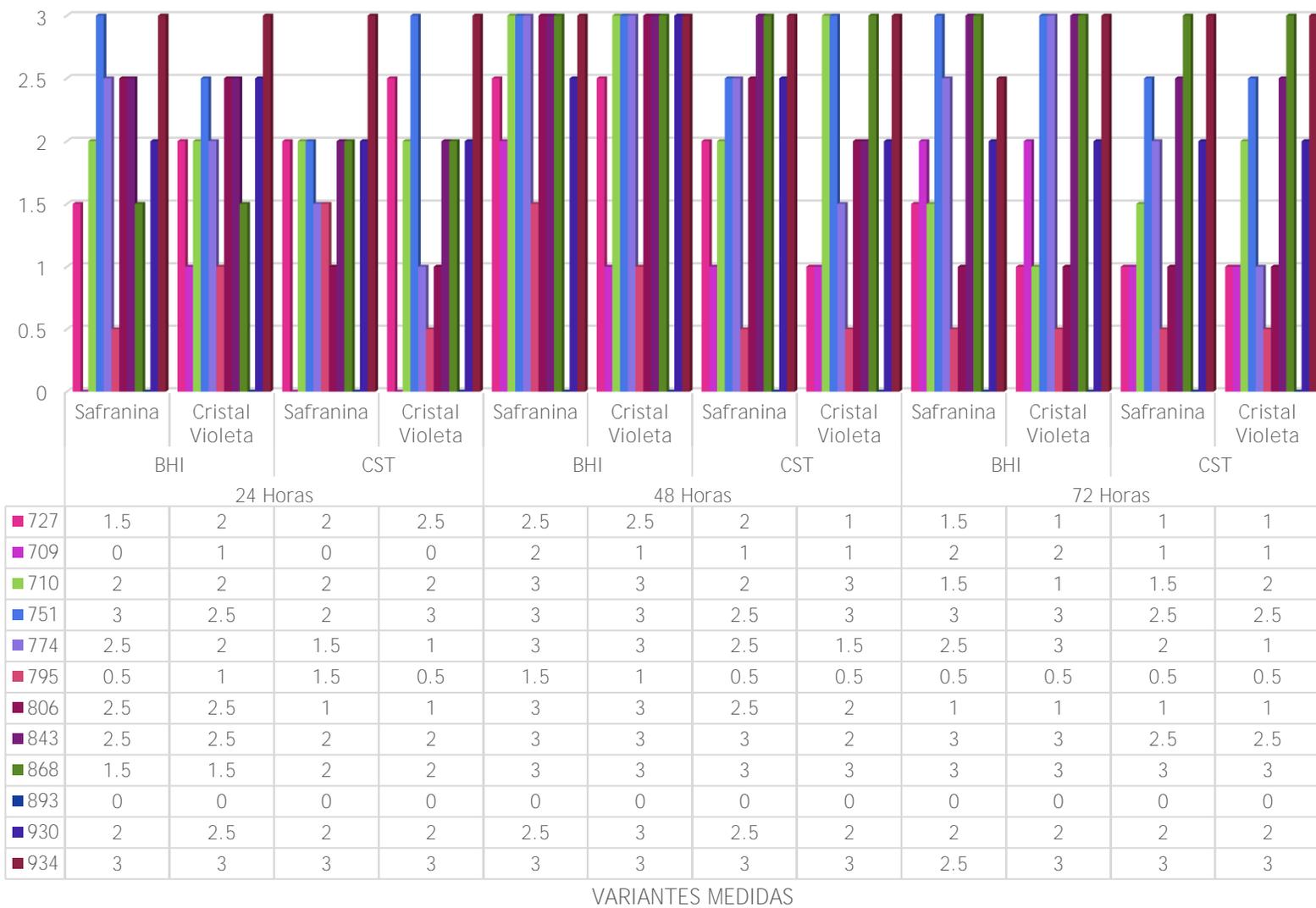


	24 Horas				48 Horas				72 Horas			
	Safranina	Cristal Violeta										
■ 681	2	1	1	1	2.5	3	2	2	3	3	2	3
■ 692	1.5	1.5	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	0
■ 779	1	0	2	1.5	2	1	2.5	2	2	1.5	2	2
■ 791	2	1	0.5	1	3	2.5	1.5	1.5	3	3	2.5	1.5
■ 824	1.5	1.5	1	1	3	3	1	1	2.5	2.5	1	1
■ 826	1	1	1	1	1	1.5	2	0.5	2	0.5	2	2
■ 827	0.5	1	1.5	0.5	2.5	2.5	1	1	2	2	1	1
■ 832	2	1.5	1	0.5	2.5	2	1.5	1	1	1	1	1
■ 835	1	1	1.5	1	2.5	2	2.5	2	2	2	1	1.5
■ 842	1	0.5	1.5	1	2	1.5	2	2	2	1.5	1	1
■ 896	0	1	1.5	1	1	1	2	1.5	2	1.5	2	2
■ 923	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	1.5	2	2	2	2
■ 933	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	1	1	1	1

VARIANTES MEDIDAS

Gráfica 12.- Formación de Biofilm para *Staphylococcus aureus* a 24, 48 y 72 horas.

Formación de biofilm para *Staphylococcus epidermidis* a 24, 48 y 72 horas.



Gráfica 13.- Formación de Biofilm para *Staphylococcus epidermidis* a 24, 48 y 72 horas.

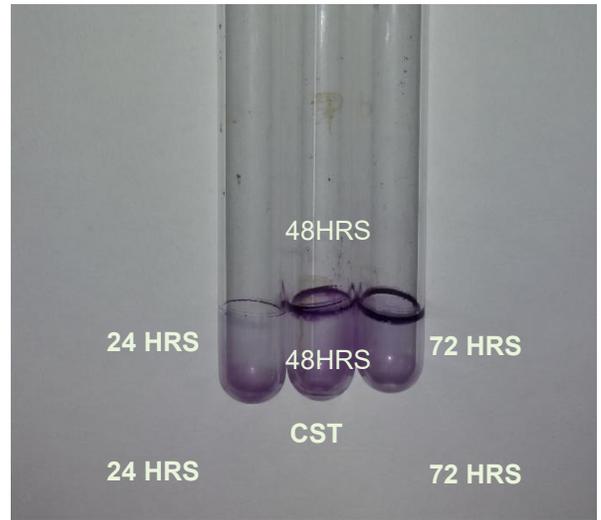
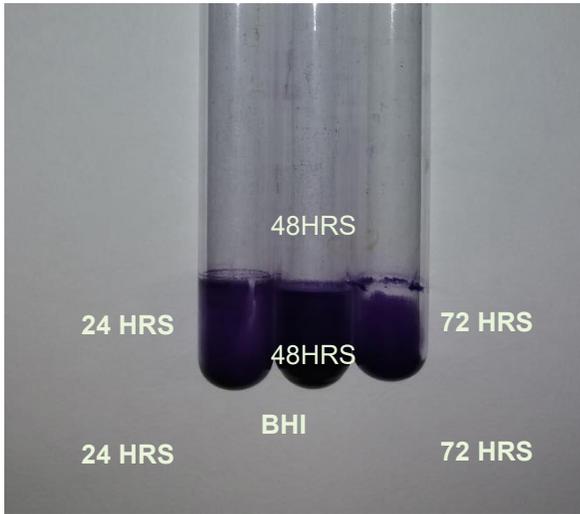


Figura 10. Muestra de Biofilm <sup>BHI</sup> en BHI teñido con Cristal violeta

Figura 11. Muestra de Biofilm <sup>CST</sup> en CST teñido con Cristal violeta

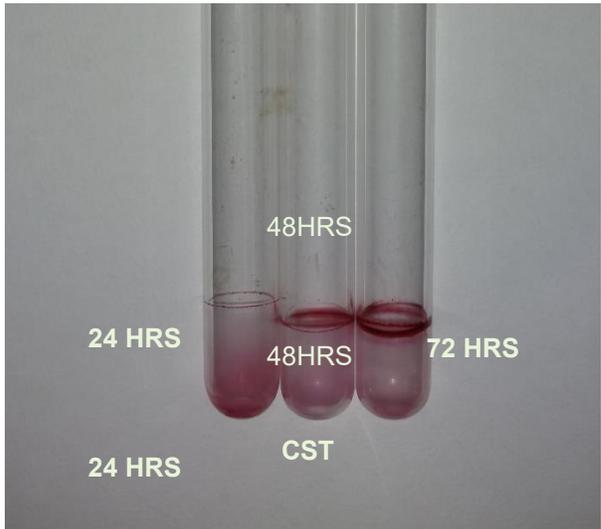
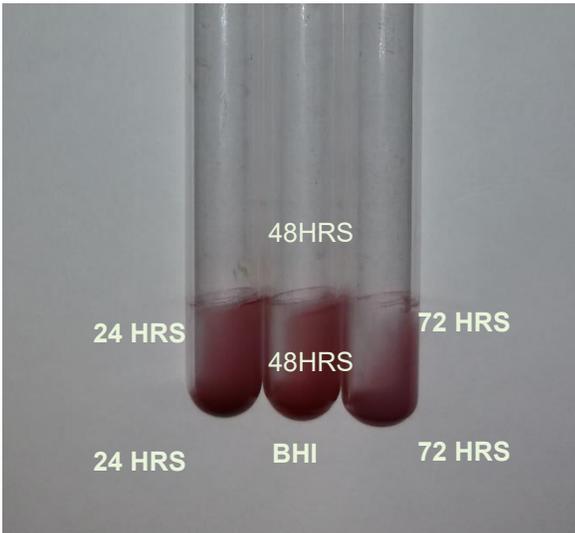


Figura 12. Muestra de Biofilm <sup>BHI</sup> en BHI teñido con Safranina.

Figura 13. Muestra de Biofilm <sup>CST</sup> en CST teñido con Safranina.

## 6.- DISCUSIÓN.

En este estudio se realizó la prueba de Maki a 75 catéteres venosos centrales, con lo que se obtuvo que el 41% dio positiva a la prueba, ya que cumplió con las especificaciones de 15 ufc; posteriormente se realizó la identificación de estas bacterias, siendo *Staphylococcus aureus* la que se presenta con mayor frecuencia con 41%, seguido de *Staphylococcus epidermidis* con 38%, lo que coincide con las infecciones nosocomiales más reportadas frecuentemente en los hospitales, así mismo se presentaron *Klebsiella Pneumoniae* 6%, *Acinetobacter Baumannii* 3%, *Acinetobacter haemolyticus* 3%, *Escherichia coli* 3%, *Staphylococcus haemolyticus* 3% y *Serratia marcenscens* 3%.

Todas las bacterias que se obtuvieron se clasificaron en dos grupos, Gram positivas con un total de 81% y Gram negativas con un 19% de este grupo, con la finalidad de distinguir las características estructurales de cada grupo para posteriormente poder realizar su adecuado perfil de Resistencia/Sensibilidad y utilizar los grupos de antibióticos específicos para cada tipo de bacterias.

Posteriormente se realizó la prueba de formación de biofilm en la cual, se utilizaron dos medios diferentes Caldo Soya Tripticasa (CST) e Infusión Cerebro Corazón (BHI), con la finalidad de observar si la composición del medio y enriquecimiento de estos afectaba en el crecimiento bacteriano, con lo que se observó un mayor y mejor desarrollo bacteriano en el medio BHI en comparación con el medio CST, en el cual el crecimiento fue escaso y en ocasiones inexistente, esto es debido a que el medio BHI es un medio enriquecido para el cultivo de una amplia variedad de organismos como bacterias, levaduras y hongos filamentosos; este medio obtiene los nutrientes de la infusión de cerebro y corazón, la peptona y la glucosa, ya que las peptonas y la infusión son fuentes de nitrógeno orgánico, carbono, azufre, vitaminas y sustancias de traza, la glucosa es la fuente de carbohidratos que los microorganismos utilizan mediante la fermentación (ver el anexo de medios).

Otro de los factores que se midió fue el tiempo de incubación para determinar el mejor crecimiento bacteriano, de acuerdo a las características bacterianas, el mejor crecimiento es a las 48 horas en donde hay un desarrollo de bacterias y aún hay un medio rico en nutrientes, sin embargo, en las 24 horas se observó un ligero crecimiento bacteriano y por el contrario a las 72 horas hay una gran cantidad de bacterias que consumen los nutrientes y esto

provoca que se dé la muerte bacteriana y que en un momento dado ya no se observó bien biofilm.

Se utilizaron dos colorantes, Cristal Violeta y Safranina, para determinar cuál de los dos es el que tiñe mejor el biofilm que se forma. De acuerdo con las características del colorante y de las bacterias, el que mejor tiño fue Cristal violeta posiblemente es debido a que las paredes de bacterias Gram Positivas tienen varias capas interconectadas de peptidoglicano que atrapan el colorante en su pared y fueron las que se presentaron en mayor cantidad como formadoras de biofilm.

En las pruebas en donde se determinó sensibilidad o resistencia que presentó cada bacteria a los antibióticos, se confirma que principalmente las bacterias *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* que pertenecen a las Gram positivas presentaron una mayor resistencia a los fármacos del grupo  $\beta$ -lactámicos al cual pertenecen bencilpenicilina y oxaciclina, esta resistencia está muy ligada a la formación de biofilm en las bacterias, debido a que las moléculas del antibiótico deben difundir a través de la matriz del biofilm para inactivar a las células recubiertas y la matriz constituye una barrera que reduce la difusión de las moléculas al interior del biofilm, así mismo esto favorece la producción de enzimas inactivadoras del antibiótico, lo que genera que se acumulen en la matriz y protege a las células, otro factor importante como lo menciona Waters y colaboradores (2016) en su artículo es que este grupo de fármacos es ineficiente contra las células que no se dividen activamente.

Es importante considerar que en este estudio realizado, se obtuvo una gran cantidad de muestras en las cuales se aisló *S.epidermidis* (38%) que normalmente se considera como microbiota normal de la piel y mucosas del ser humano, sin embargo es uno de los patógenos más frecuentes aislados en los pacientes inmunodeprimidos y se asocia a dispositivos médicos utilizados en los pacientes, por lo que puede llegar a causar infecciones crónicas, mas no mortales, pero eso no implica que se deba de dejar a un lado y restarle importancia, pues también presenta una gran resistencia a antibióticos, como lo menciona Cabrera (2013).

Para las bacterias Gram negativas, casi no se presentó una formación de biofilm, sin embargo, al realizar las pruebas de sensibilidad o resistencia que presentaron ante diversos

grupos de antibióticos, mostraron una resistencia al grupo  $\beta$ -lactámicos, probablemente se debe a diversos mecanismos de resistencia como lo menciona Tafur (2008).

## 7.- CONCLUSIONES

En el estudio realizado en la presente tesis se sembraron e incubaron las bacterias que se obtuvieron de los catéteres venosos centrales en medio Agar sangre, posteriormente de la siembra en el medio Infusión Cerebro Corazón y Caldo Soya Tripticasa, se determinó que el mejor medio para el crecimiento óptimo de bacterias productoras de biofilm fue Infusión Cerebro Corazón debido a la gran cantidad de nutrientes que favorecen el crecimiento bacteriano.

Se determinó que el tiempo óptimo en el cual se produjo una mayor formación de biofilm fue a las 48 horas, así mismo, cuando se probó los dos tipos de colorante que se utilizaron para evidenciar la formación de biofilm se determinó que el mejor colorante fue el cristal violeta debido a que tiñe mejor la estructura de Biofilm.

Se determinó que las bacterias formadoras de biofilm que están más frecuentemente presentes en los catéteres venosos centrales son principalmente *Staphylococcus aureus* en un 41%, seguido de *Staphylococcus epidermidis* con un 38% que son Bacterias Gram Positivas, así mismo al realizar las pruebas de sensibilidad y resistencia en las bacterias formadoras de biofilm obtenidas en los catéteres venosos centrales se determinó que estas presentaron una gran resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos principalmente.

A partir de los catéteres venosos centrales que resultaron positivos al crecimiento de microorganismos causantes de la infección, se aislaron e identificaron las bacterias productoras de biofilm que se encuentran en catéteres de pacientes internos del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI por medio de la técnica de Maki.

## 8. - BIBLIOGRAFIA

- ♣ *Academic*. <http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/834296> .2017.
  
- ♣ Bado, I., et al (2008). *Temas de bacteriología y virología médica*. Oficina del libro FEFMUR.
  
- ♣ Beloso, W. (2009). *Historia de los antibióticos*. Rev Hosp Ital B Aires: 29(2)102-111.
  
- ♣ Betancourt, M., et al. (2004). *Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo*. Colomb Med.; 34-39.
  
- ♣ Beveridge, T. (2001). *Use of the gram stain in microbiology*. Biotech histochem; 76 (3):111-8.
  
- ♣ Biomerieux. <http://www.biomerieux-usa.com/clinical/vitek-2-healthcare> 2017. 2017.
  
- ♣ Bouza, E., et al. (2004). *Procedimientos en Microbiología Clínica: recomendaciones de la sociedad española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. SEIMC.
  
- ♣ Cabrera R., et al. (2013). *Antibiotic Resistance and Biofilm production in Staphylococcus epidermidis Strains, Isolated from a tertiary care Hospital in Mexico City*. General meeting of the American Society for Microbiology.
  
- ♣ Castellano, M., (2010). *Mecanismos de resistencias a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en Staphylococcus aureus*. Kasmera: 38(1): 18-35.
  
- ♣ Christensen, G. (1982). *Adherence of slime-producing strains of staphylococcus epidermidis to smooth surfaces*. Innfec immune; 37(1):318-26.
  
- ♣ Costerton, J., et al (1995). *Microbial biofilm*. Annu, Rev, Microbiology 49: 711-4.
  
- ♣ Costerton, J., et al. (1999). *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science;284(5418): 1318-22.

- ♣ Crespo, M., (2005). *Resistencia bacteriana ¿estamos preparados para detectarla?* Grupo de microbiología médica y enfermedades infecciosas, universidad de Cali, Colombia 9(1): 31-45.
  
- ♣ Diamond, J., et al. (2007). *Biofilm: ¿Amenaza latente o factor de protección? Estado de arte.* Enf Inf Microbiol.: 22-28.
  
- ♣ Dientitos. [http://www.paginasprodiqy.com.mx/dientitos/la\\_caries.htm](http://www.paginasprodiqy.com.mx/dientitos/la_caries.htm) 2017.
  
- ♣ Diggle S. et al. (2007). *Evolutionary theory of bacterial quorum sensing: when is a signal not a signal?*. Phil Trans R Soc B. 2007; 362:1241-1249.
  
- ♣ Donlan R. (2002). *Biofilms: Microbial life on surfaces.* Emerg Infect Dis; 8 (9): 881-90.
  
- ♣ Estrella. (2005). *Ciencia Endodóntica.* Editorial Artes Medicas.
  
- ♣ Fagundo, R., et al. (2007). *Evaluación del instrumento automatizado Phoenix en la identificación y antibiograma de bacterias de origen clínico.* Bioquímica 32(2):39-48.
  
- ♣ Garcia, J., (1999). *Compendio de Microbiología Medica.* Harcourt. Madrid, España.
  
- ♣ García, J., et al *Historia de la antibioterapia* (acceso Diciembre 2013) Disponible en <http://www.sepeap.org/archivos/libros/antibioticos/1.pdf>.
  
- ♣ *Generalidades de antibióticos.* Libros virtuales IntraMed. (Acceso 2017) Disponible en: [http://www.intramed.net/sitios/librovirtual1/pdf/librovirtual1\\_50.pdf](http://www.intramed.net/sitios/librovirtual1/pdf/librovirtual1_50.pdf) .
  
- ♣ Herrera, M., et al. (2004). *Papel del Biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia.* Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca 2(2) 71-80. Bogotá, Colombia.
  
- ♣ Jimenez, A., et al (1982). *Genética Molecular bacteriana.* Primera impresión. Editorial reverté. España: 175-202.
  
- ♣ Jorda, L., et al. (2005). *Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana.* Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 39(1): 19-25.

- ♣ Kaufman, J., et al (1986). *Catheter-relates septic central venous thrombosis: current therapeutic options*. West J Med: 200-3.
  
- ♣ Lasa, I., et al. (2005). *Biofilms bacterianos e infección*. Anales del Sistema Sanitario de Navarra 28(2):163-175.
  
- ♣ Lazdunski A, et al. (2004). Regulatory circuits and communication in gram-negative bacteria. Nat Rev Microbiol; 2:581-591.
  
- ♣ Linares, P. (1998). *Endocarditis infecciosa*. Medicine; 3394-3399.
  
- ♣ Lorenzo, P., et al. (2008). *Velázquez farmacología básica y clínica*. Dieciochoava edición. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires, Madrid.
  
- ♣ Mah, T., et al. (2001). *Mechanisms of biofilm resistance to microbial agents*. Trends Microbiol.: 34-39.
  
- ♣ Martínez, J., et al. (2007) *Mecanismo de acción de los antibióticos*. JANO; 1,660: 28-34.
  
- ♣ *Microbioenergetica*. <http://microbioenergetica.squarespace.com/bacteriologa/2014/7/21/bacterias-gram-positivas> . 2017.
  
- ♣ Moreno, M., et al. (2007). *Staphylococcus epidermidis formador de biofilm en blefaroconjuntivitis*. Revista médica del Hospital General de México 70(1):24-29.
  
- ♣ Nazar, J., (2007). *Biofilms bacterianos*. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello 67:61-72.
  
- ♣ Otto, M. (2008). *Staphylococcus Biofilm*. Curr Top Microbiol Inmunol; 207-28.
  
- ♣ Pumarola, A., et al. (1998). *Microbiología y parasitología médica*. Segunda edición. Masson. Barcelona, España: 25-34.
  
- ♣ Sticker, D., et al.(1993). *Blockage of urethral catheter by bacterial biofilm*. J. Infectec 27:133-5.

- ♣ Strinder, W., et al. (1985). *Candida septic thrombosis of the great central veins associated with central catheters*. Ann Surg.: 653-8.
  
- ♣ Svetla, K., et al. (2004). *The bacterial insertion sequence element IS256 Occurs Preferently in Nosocomial Staphylococcus epidermidis Isolates: Association with Biofilm Formation and Resistance to Aminoglycosides*. Infection and Immunity.; 1210-1215.
  
- ♣ Tafur, J., Torres, J., y Villegas, M. (2008). *Mecanismo de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas*. Asociación colombiana de infectología. Colombia;12(3) 217-226.
  
- ♣ Tortora G., et al. (2010). *Introducción a la microbiología*. Novena edición, Editorial Panamericana. España.
  
- ♣ Vallasedo. <https://vallesedo.wordpress.com/author/vallesedo/page/7/> 2017.
  
- ♣ Waters, E., Rowe, S. y O'gara, J. (2016). *Convergence of Staphylococcus aureus persister and Biofilm Research: can biofilms be defined as communities of adherent persister cells ?*. PLOS Pathogens 12(12).
  
- ♣ Wikispaces. <https://estructurayfuncioncelularbacteriana.wikispaces.com/Pared+celular+gram+negativas> 2017.

**A N E X O A****MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS****\*Material de vidrio**

- ✓ Tubos de ensayo con tapa de rosca de 16x150mm.
- ✓ Tubo de ensayo con tapón de 13x100 mm estériles.
- ✓ Tubos de ensayo de vidrio estériles de 12x75mm.
- ✓ Pipetas serológicas estériles de 10 y 2 mL.
- ✓ Matraz Erlenmeyer de 1 y 2 L.

**\*Equipos**

- ✓ Sistema Vitek 2 de Biomerieux.
- ✓ Incubadora.
- ✓ Balanza.
- ✓ Autoclave.
- ✓ Densitómetro DensiCheck™

**\*Medios de cultivo**

- ✓ Agar Gelosa Sangre.
- ✓ Caldo Soya Tripticasa.
- ✓ Caldo Infusión Cerebro-Corazón.

**\*Colorantes y Reactivos**

- ✓ Safranina al 1 %.
- ✓ Cristal Violeta al 1%.
- ✓ Tarjetas de identificación y sensibilidad para bacterias

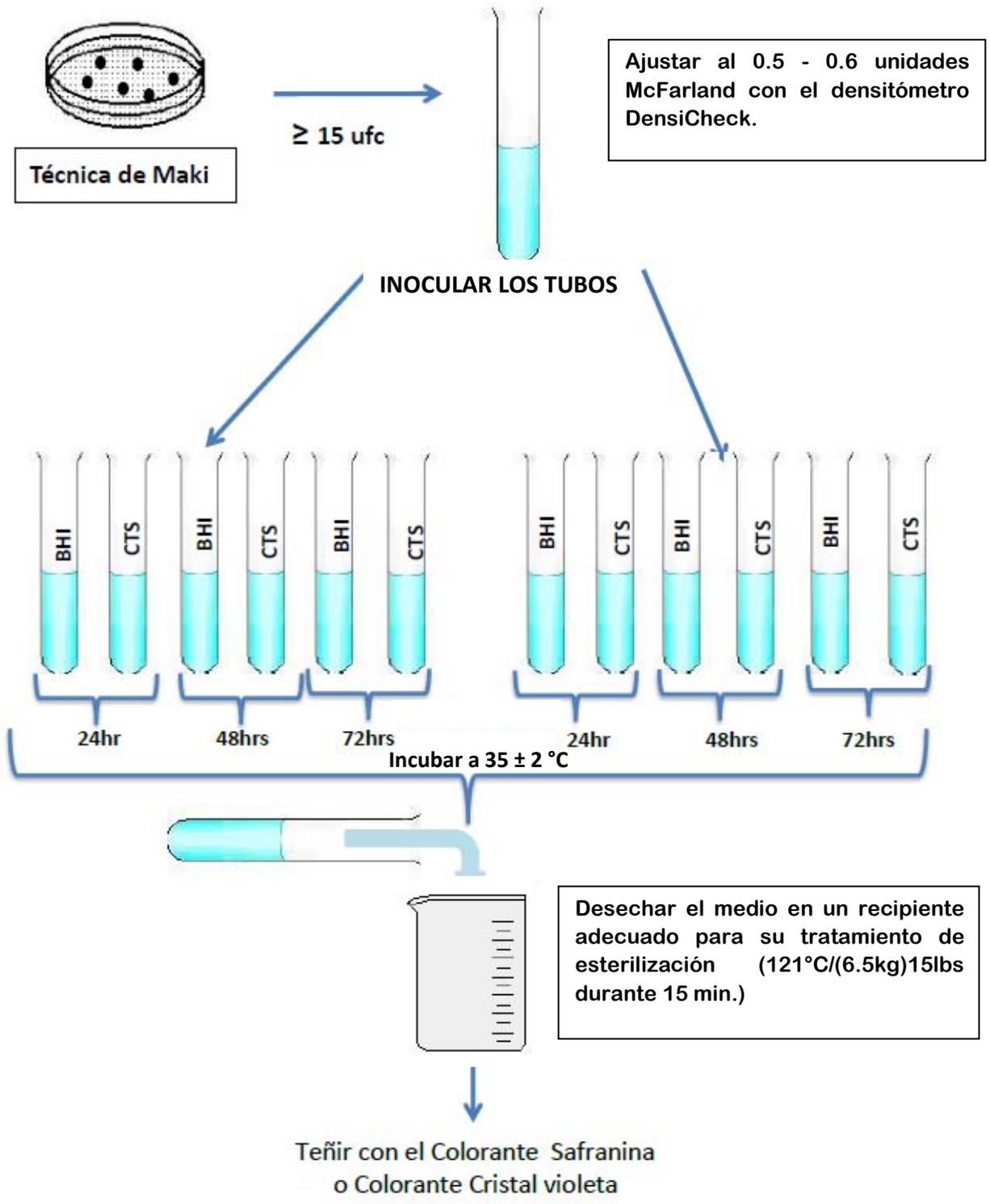
Gram Positivas y Gram Negativas para el equipo Vitek.

- ✓ Solución salina fisiológica estéril.

**\*Otros**

- ✓ Propipeta.
- ✓ Cinta testigo.
- ✓ Puntas estériles.
- ✓ Hisopos de algodón estériles.
- ✓ Mechero.
- ✓ Micropipeta de 100 uL.
- ✓ Asas bacteriológicas.
- ✓ Gradillas.
- ✓ Gasas.
- ✓ Jabón.
- ✓ Escobillón.

**DIAGRAMA DE LA METODOLOGÍA.**





Rodar por 3 minutos los tubos y posteriormente enjuagarlos 3 veces con Solución Salina Fisiológica o Buffer de Fosfato



Dejar secarlos y leerlos



**Registrar resultados**

**COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO****INFUSIÓN DE CEREBRO- CORAZÓN.**

**USO PREVISTO** BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar es un medio de uso general adecuado para el cultivo de una amplia variedad de tipos de organismos, incluidos las bacterias, levaduras y hongos filamentosos, a partir de muestras clínicas.

**PRINCIPIOS Y EXPLICACION DEL PROCEDIMIENTO** Método microbiológico. La infusión de cerebro y corazón ha resultado ser efectiva en el cultivo de una amplia variedad de microorganismos, incluidos muchos tipos de patógenos. Se ha utilizado como medio base para las nuevas fórmulas de medios de cultivo cuando se suplementa con sangre o agentes selectivos. Brain Heart Infusion (BHI) Agar sin suplemento se recomienda actualmente como medio universal para bacteriología aerobia y para la recuperación primaria de hongos y Actinomycetales a partir de muestras clínicas y no clínicas<sup>1-5</sup>. BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar obtiene los nutrientes de la infusión de cerebro y corazón, la peptona y la glucosa. Las peptonas y la infusión son fuentes de nitrógeno orgánico, carbono, azufre, vitaminas y sustancias de traza. La glucosa es la fuente de carbohidratos que los microorganismos utilizan mediante fermentación. Se utiliza fosfato disódico como tampón en el medio.

**REACTIVOS** BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar Fórmula\* por litro de agua purificada Infusión de cerebro y corazón de (sólidos) 8,0 g Digerido péptico de tejido animal 5,0 Digerido pancreático de caseína 16,0 Cloruro sódico 5,0 Glucosa 2,0 Fosfato disódico de hidrógeno 2,5 Agar 13,5 pH 7,4 ± 0,2 \*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

**PRECAUCIONES.** Solamente para uso profesional. No utilizar las placas si muestran evidencia de contaminación microbiana, decoloración, deshidratación, grietas o cualquier otro signo de deterioro. Consultar los procedimientos de manipulación aséptica, riesgos biológicos y desecho del producto usado en el documento

**INSTRUCCIONES GENERALES DE USO. ALMACENAMIENTO Y VIDA UTIL** Al recibir las placas, almacenarlas en un lugar oscuro a una temperatura entre 2 y 8 °C, envueltas en su envase original, hasta justo antes de usarlas. Evitar la congelación y el calentamiento excesivo. Las placas pueden inocularse hasta su fecha de caducidad (ver la etiqueta en el paquete) e incubarse durante los períodos de incubación recomendados. Las placas de grupos de 10 placas ya abiertos pueden usarse durante una semana siempre que se almacenen en un lugar limpio a una temperatura entre 2 y 8 °C.

**CALDO TRIPTICASA SOYA.**

**USO PREVISTO** Medio adecuado para el desarrollo de microorganismos exigentes. Es utilizado en el control de esterilidad de productos biológicos, farmacéuticos y cosméticos. Su fórmula cumple con los requerimientos de la Armonización de Farmacopeas Europea, japonesa y de los Estados Unidos de Norteamérica (EP, JP y USP respectivamente).

**FUNDAMENTO** La tripteína y la peptona de soya aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. La peptona de soya contiene alta cantidad de hidratos de carbono que estimulan el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. El fosfato dipotásico otorga capacidad buffer y la glucosa es la fuente de energía.

**FORMULA.**

Tripteína.....	17.0 g
Peptona de soya.....	3.0 g
Cloruro de sodio.....	5.0 g
Fosfato dipotásico.....	2.5 g
Glucosa.....	2.5 g
Agua purificada.....	1000 ml
pH final: 7.3	