



EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 A LA CIPROFLOXACINA EN FUNCIÓN DE SU FASE DE CRECIMIENTO

JESSICA TATIANA VALENCIA SALGUERO

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C. JUNIO DE 2018



EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 A LA CIPROFLOXACINA EN FUNCIÓN DE SU FASE DE CRECIMIENTO

EDITH DEL CARMEN HERNÁNDEZ ROJAS-MSc
Docente UCMC – Asesora interna

JAIVER EDUARDO ROSAS PÉREZ-PhD
Docente UNAL - Asesor externo

SANDRA CLARISSA VEGA CHAPARRO-PhD
Docente UNAL - Asesora externa

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C. JUNIO DE 2018

Introducción



<http://www.ec-med.cl/DIAAS/>



Calidad
de Vida 

http://grupos.emagister.com/foro_calidad_de_vida/7136



<https://Sp.depositphotos.com/162293452/stock-illustration-healthcare-costs-and-expenses-showing.html>

SDS - Programa de vigilancia en salud pública

Género *Klebsiella*

Inmóviles

Bacilos Gram
negativos cortos

Aspecto mucoso

*Klebsiella
pneumoniae*
ATCC 13883

Sensible

*Klebsiella
pneumoniae*
ATCC 700603

Resistente

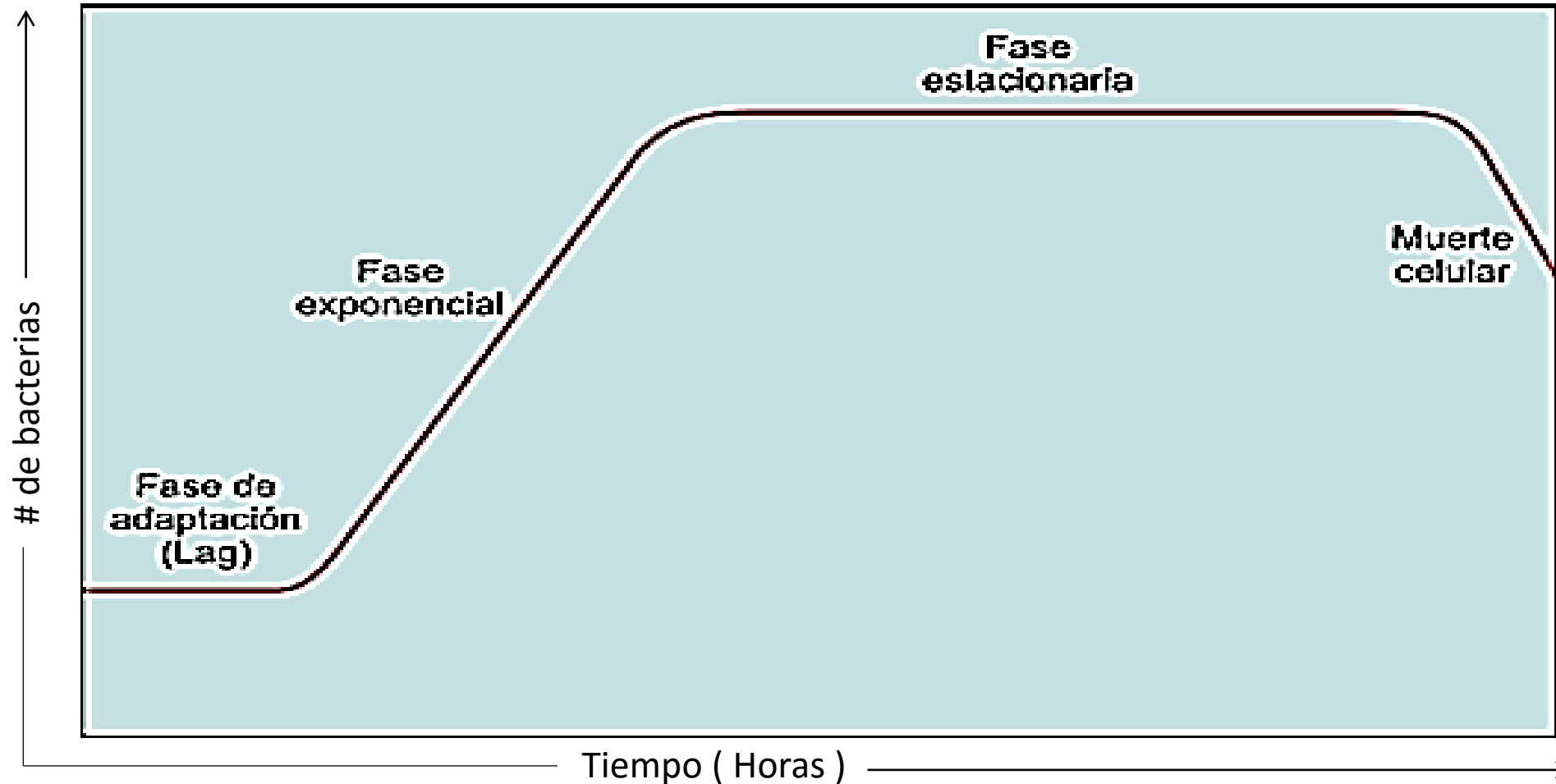
Ciprofloxacina

Fluoroquinolona

Infecciones de
tracto respiratorio o
urinario

Actividad en Gram
negativos

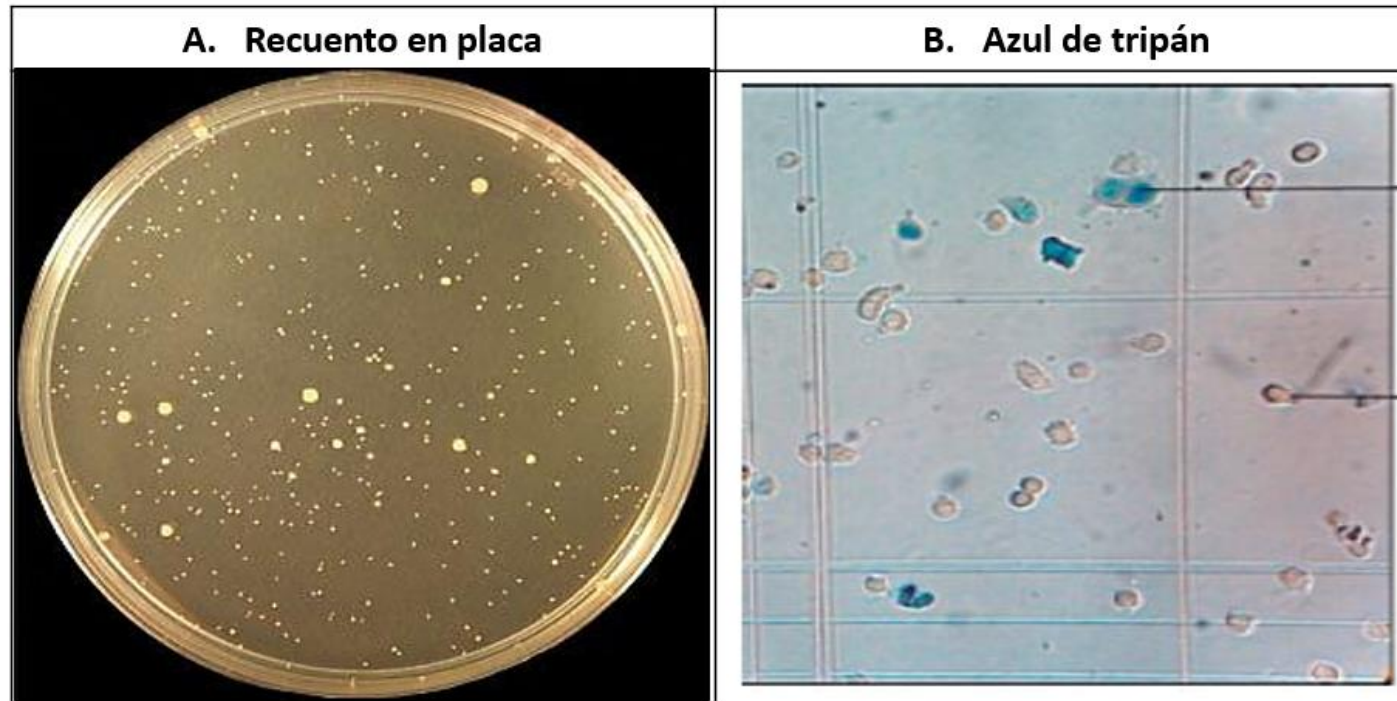
Curva de crecimiento bacteriano



Respuesta diferente a la molécula según fase

Viabilidad bacteriana

Determinar la población que es capaz de dividirse y desarrollarse normalmente



ivoumcauo de. <http://www.uelagua.org/products/details/12555-Plate-Count-Agar-Arria> y <http://www.scielo.org.co/img/revistas/1107a/v13n123/v13n123a02101.jpg>

Tiñe las bacterias muertas de color azul

Métodos de dilución

Observar la susceptibilidad *in vitro* a determinada molécula

CIM

Concentración más baja de molécula antimicrobiana capaz de inhibir el crecimiento

CBM

Concentración mínima de molécula antibacteriana capaz de destruir el 99,9% de la población

Objetivos

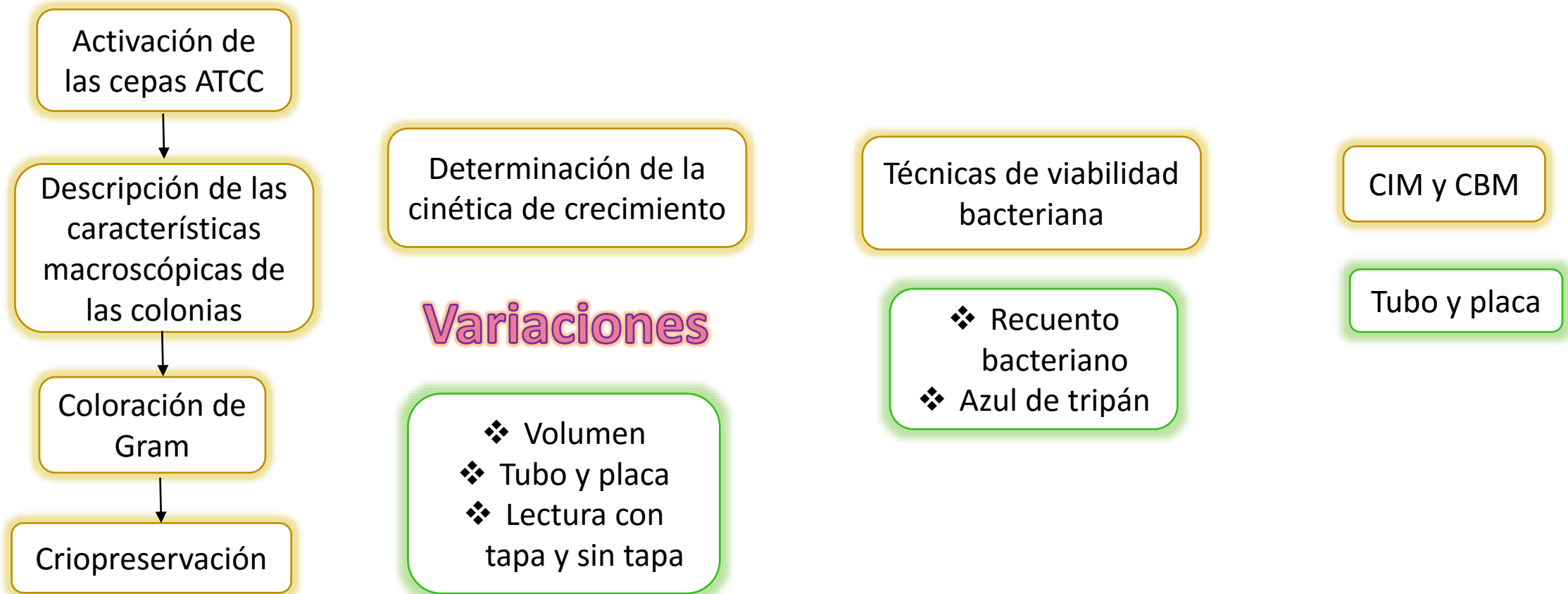
General

Evaluar la susceptibilidad de las cepas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 en cada una de las fases de la cinética de crecimiento, frente a la ciprofloxacina como molécula antibacteriana modelo

Específicos

- Realizar la caracterización morfológica de las cepas en estudio
- Determinar la población bacteriana de dichas cepas presente en cada fase de la cinética de crecimiento por medio de técnicas de viabilidad
- Establecer la posible diferencia en la CIM y CBM de ciprofloxacina en las fases de crecimiento de latencia, exponencial y estacionaria para las cepas en estudio

Metodología general



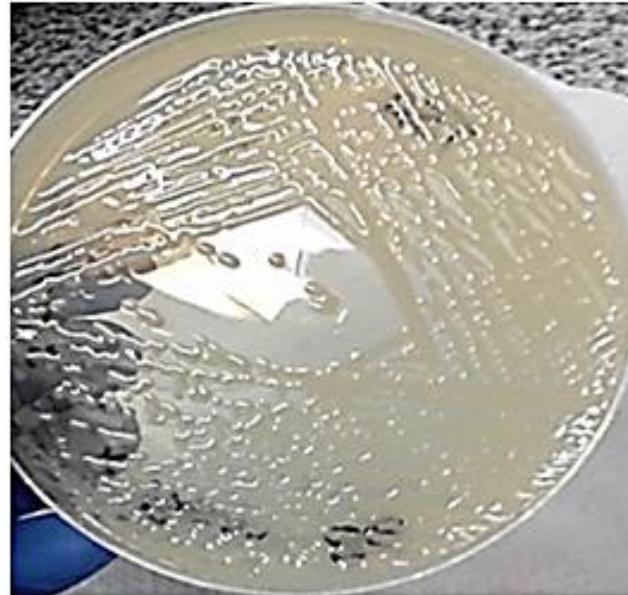
Activación de cepas ATCC



<http://www.microbiologics.com/site/Newsletter/MBL-Summer-2010-disinfectant-qualification.html>

- Kwik stik
- Hisopo para siembra en TSA
- Incubación

Klebsiella pneumoniae
ATCC 13883



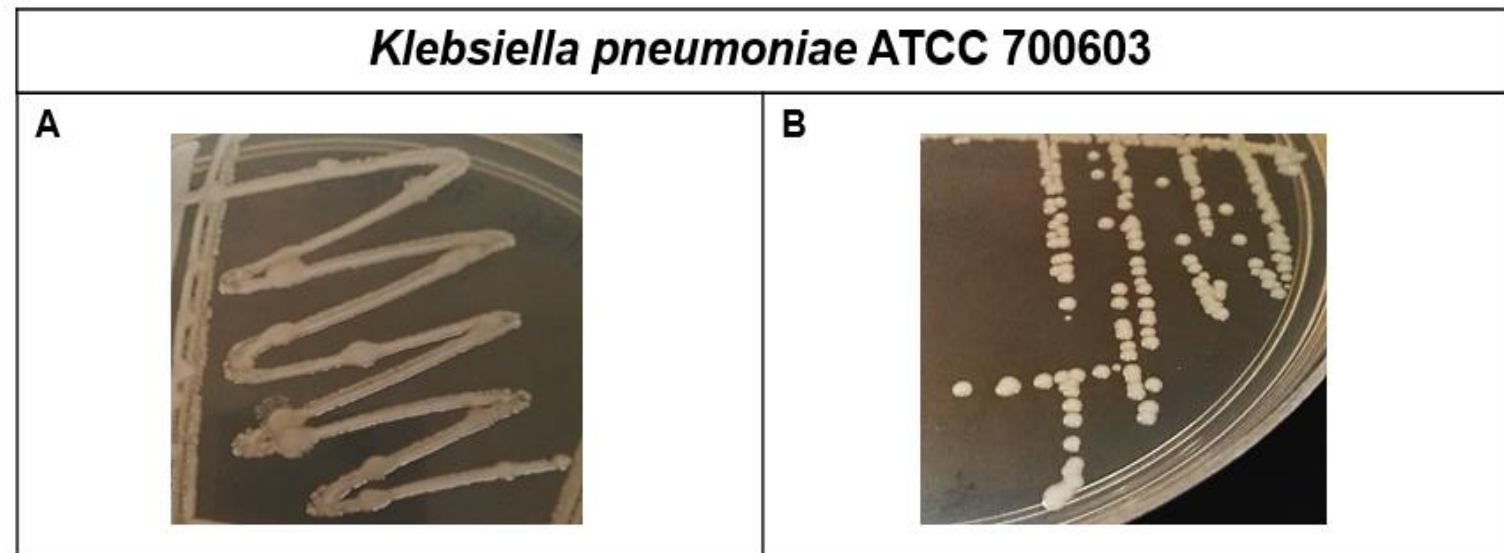
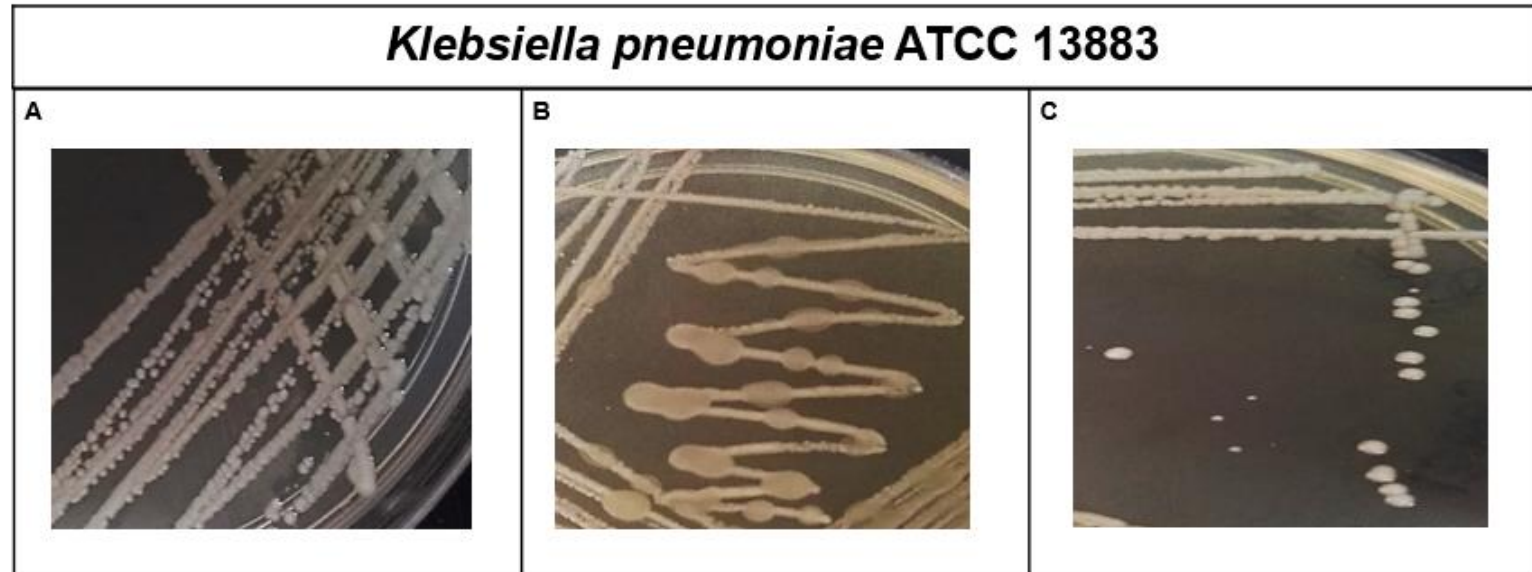
Klebsiella pneumoniae
ATCC 700603



Características macroscópicas de las colonias

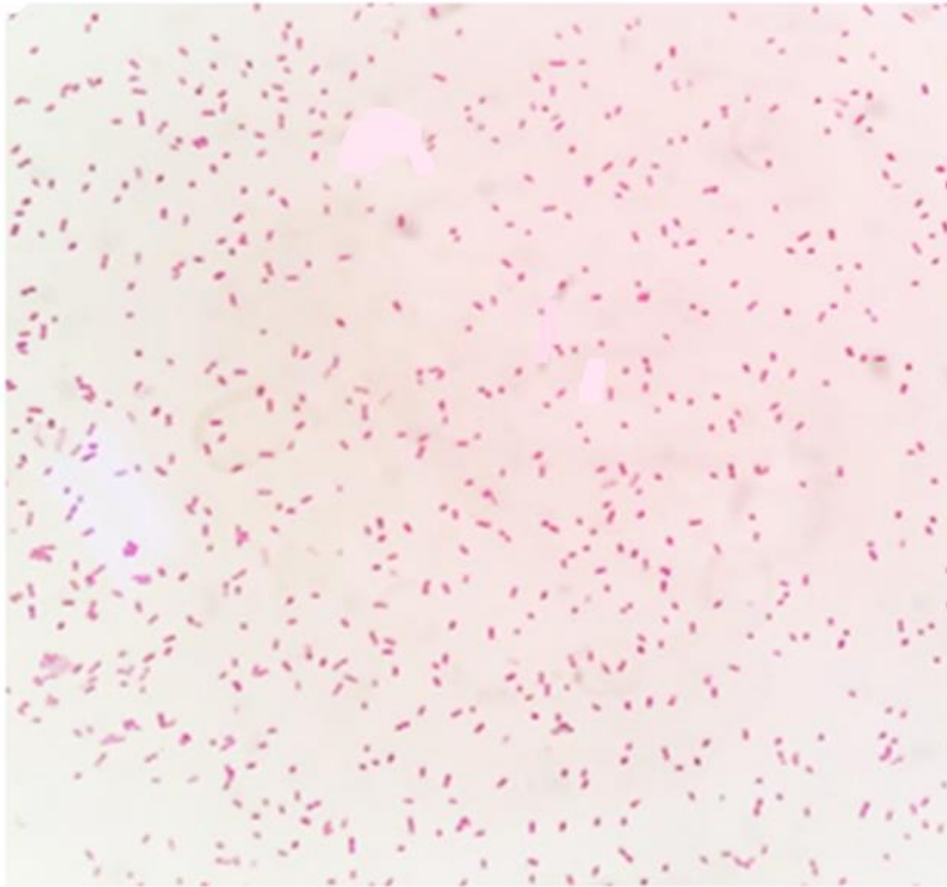
Pases TSA para colonias aisladas

Koneman y Col. 2006. EEUU
Colonias mucosas

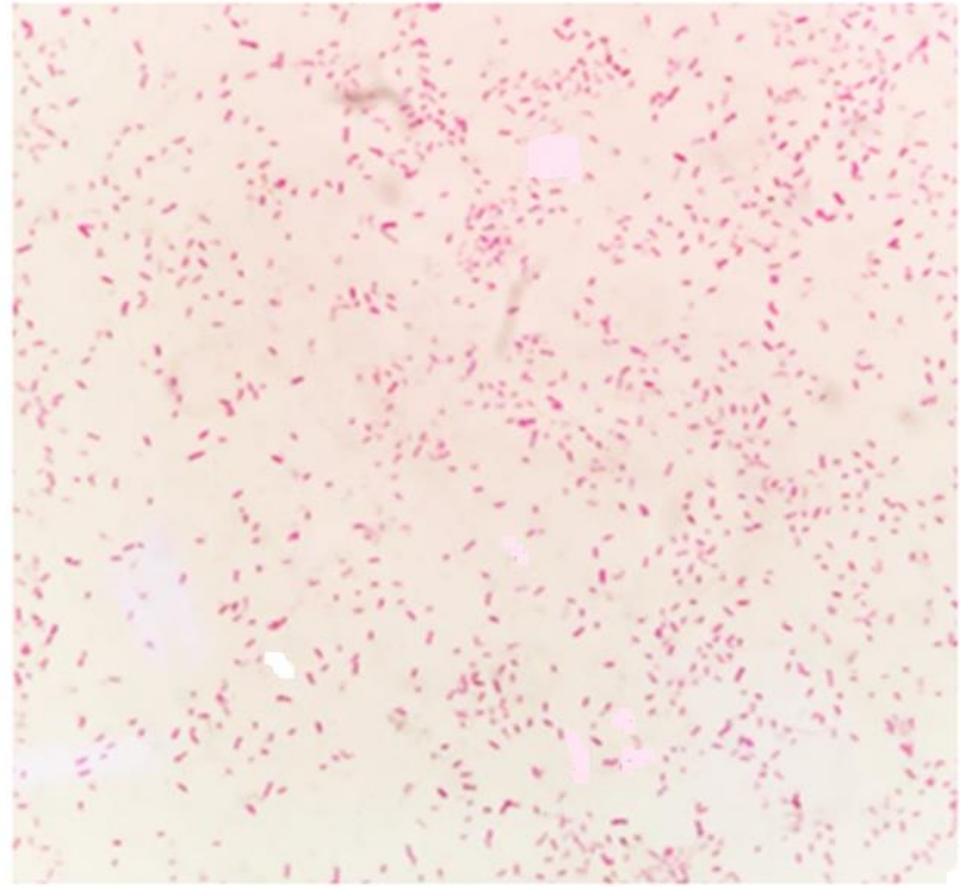


Coloración de Gram

Klebsiella pneumoniae
ATCC 13883



Klebsiella pneumoniae
ATCC 700603

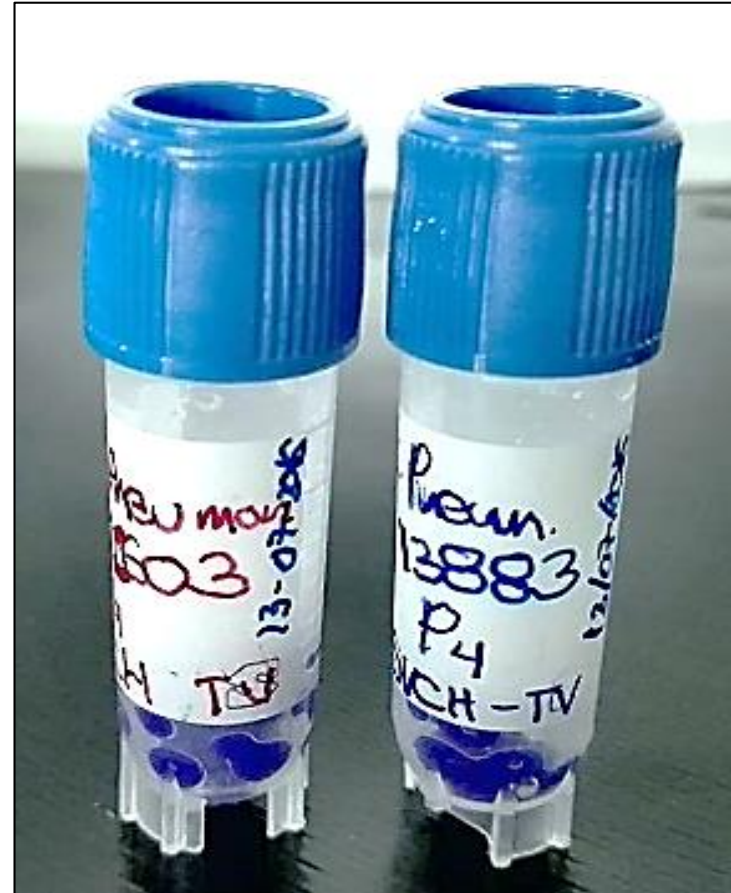


Criopreservación



<http://www.copanusa.com/products/lab-supplies/cryobank/>

- Conservar y mantener cepa
- Cryobank
- Congelación



Hallazgos

- 1. Ambas cepas en estudio presentaron aspecto mucoso y brillante**

Procedimiento general

UFC agar TSA

Caldo MH

Escala 0,5 Mc Farland

Longitud de onda: 620 nm con agitación en el lector

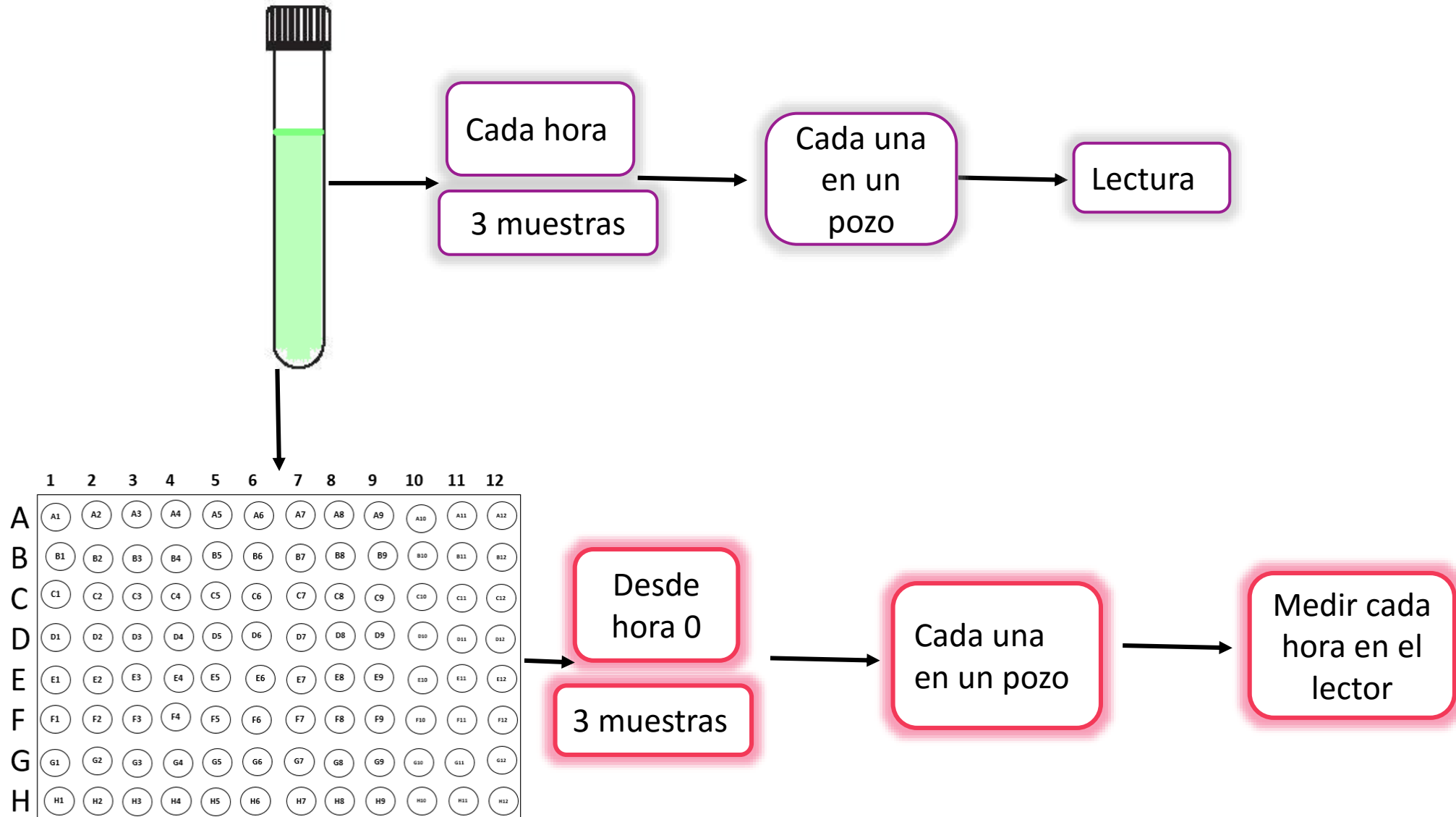
Control de esterilidad, positivo, negativo

Incubación

CLSI. 2014. EEUU

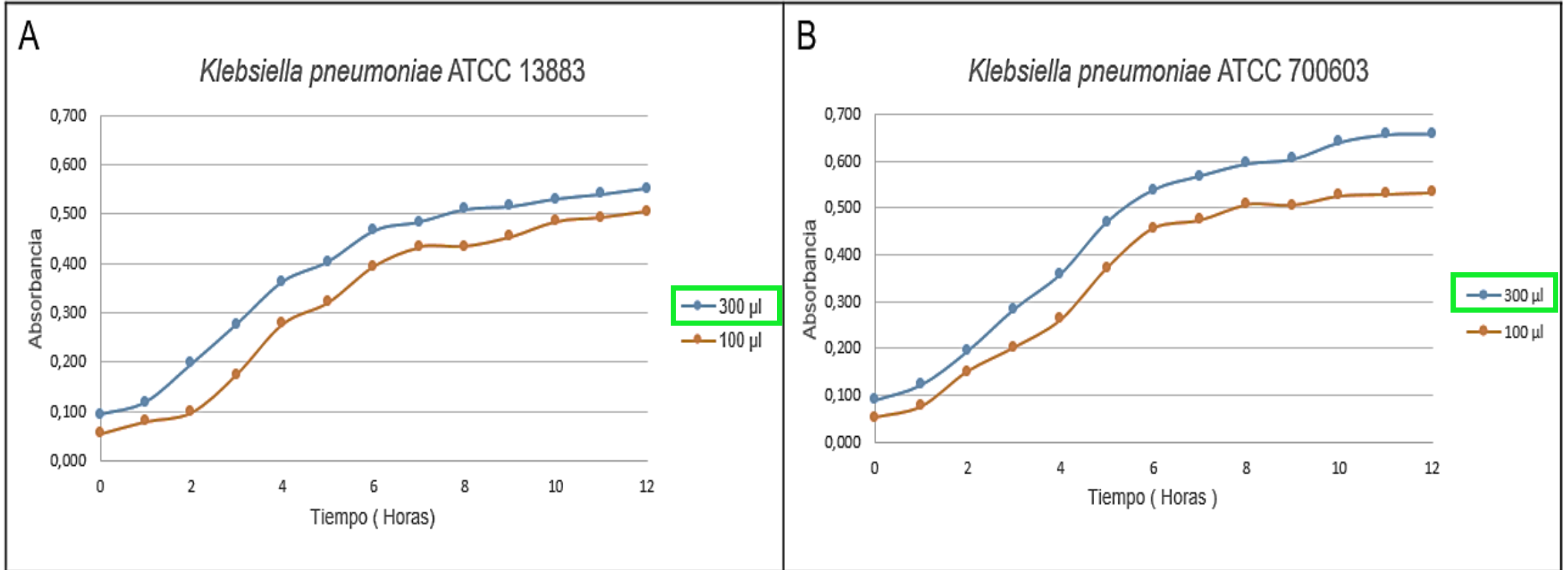
Manual antimicrobiano para pruebas de susceptibilidad en determinaciones *in vitro*

Determinación de la cinética de crecimiento



Cinética: En tubo

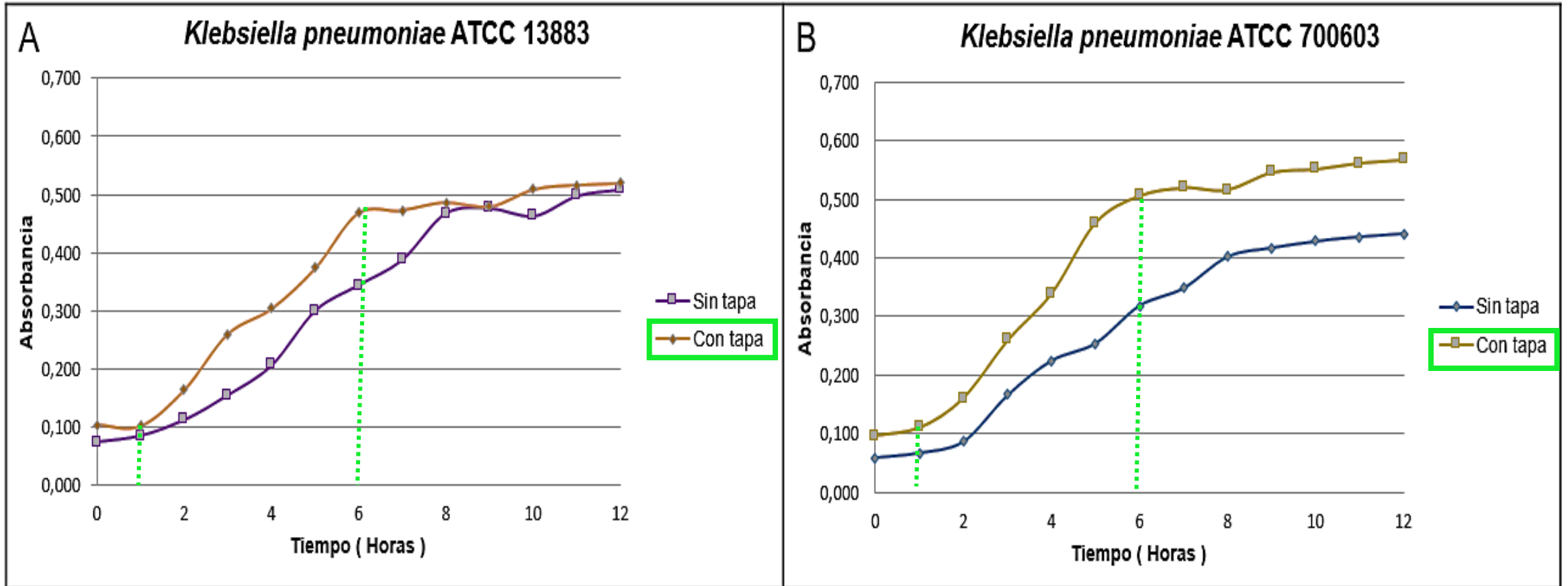
Efecto del volumen de inóculo



Cada punto graficado corresponde a la media de tres lecturas

Cinética: En tubo

Lectura de la placa con y sin tapa



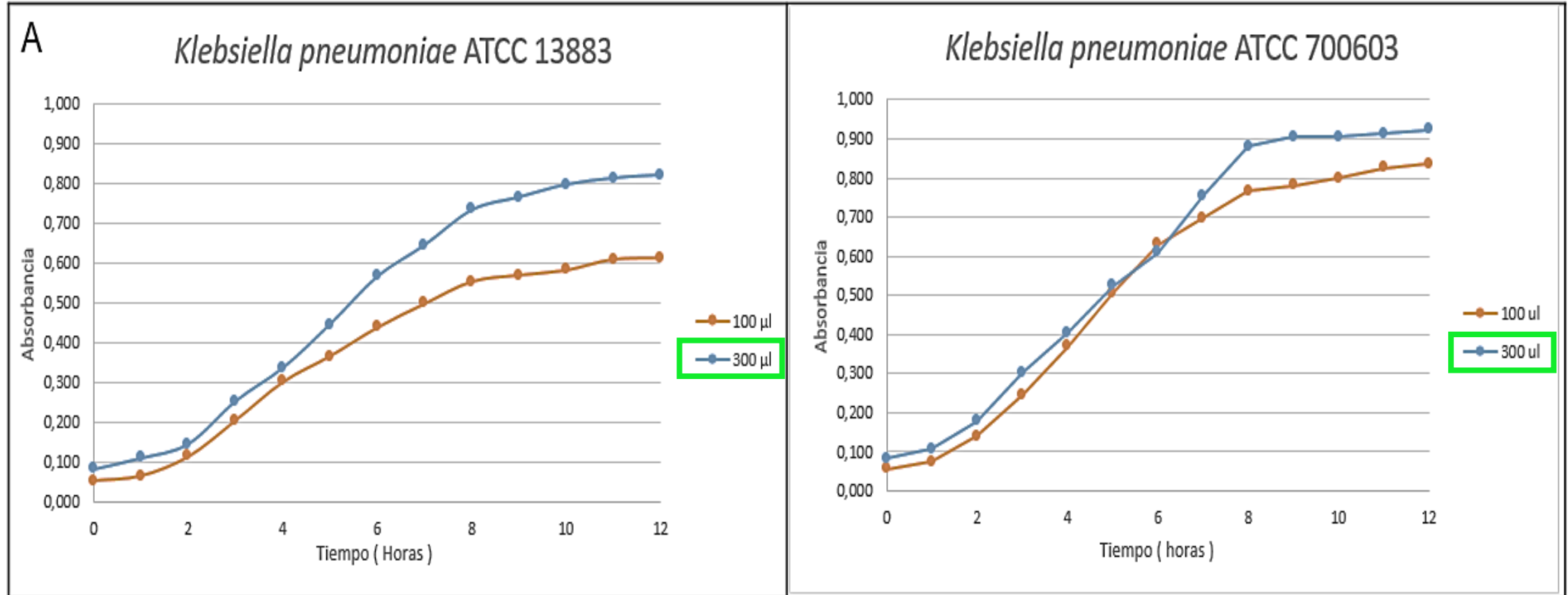
Cada punto graficado corresponde a la media de tres lecturas

CLSI. 2014. EEUU

La fase exponencial de bacterias aerobias no exigentes ocurre en un tiempo menor a 10 horas

Cinética: En placa

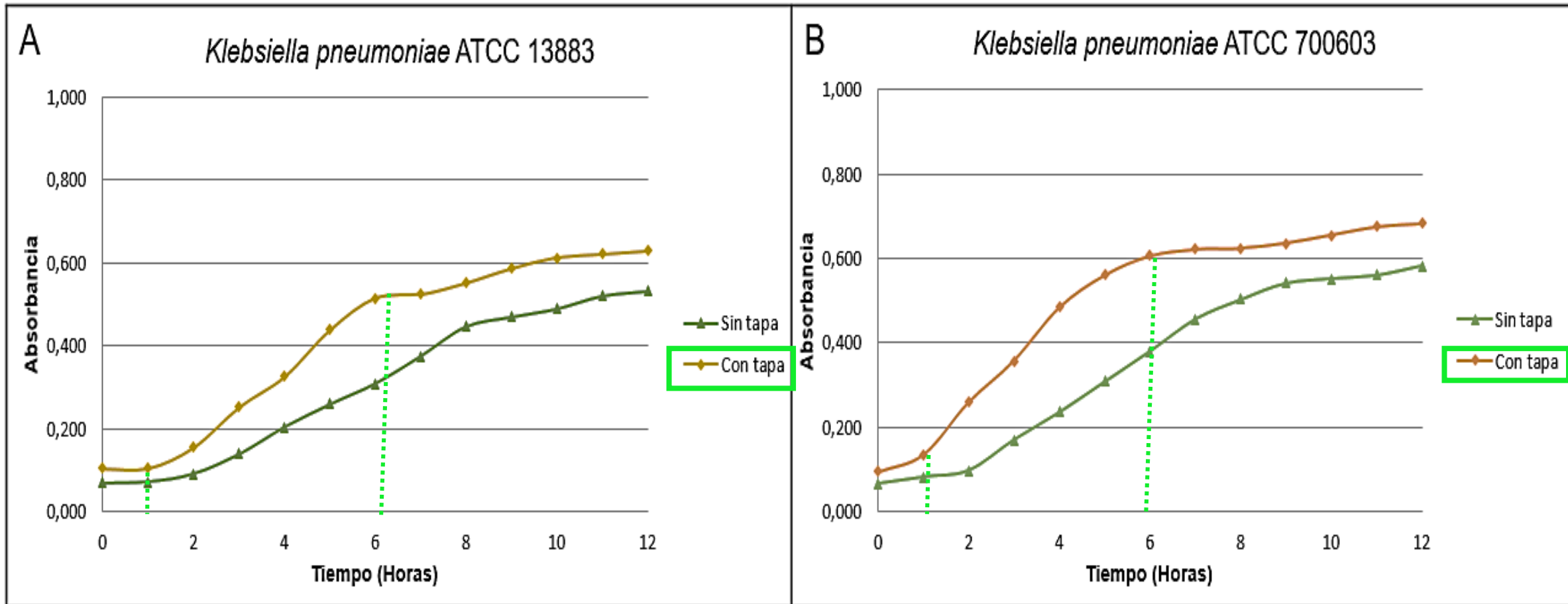
Efecto del volumen de inóculo



Cada punto graficado corresponde a la media de tres lecturas

Cinética: En placa

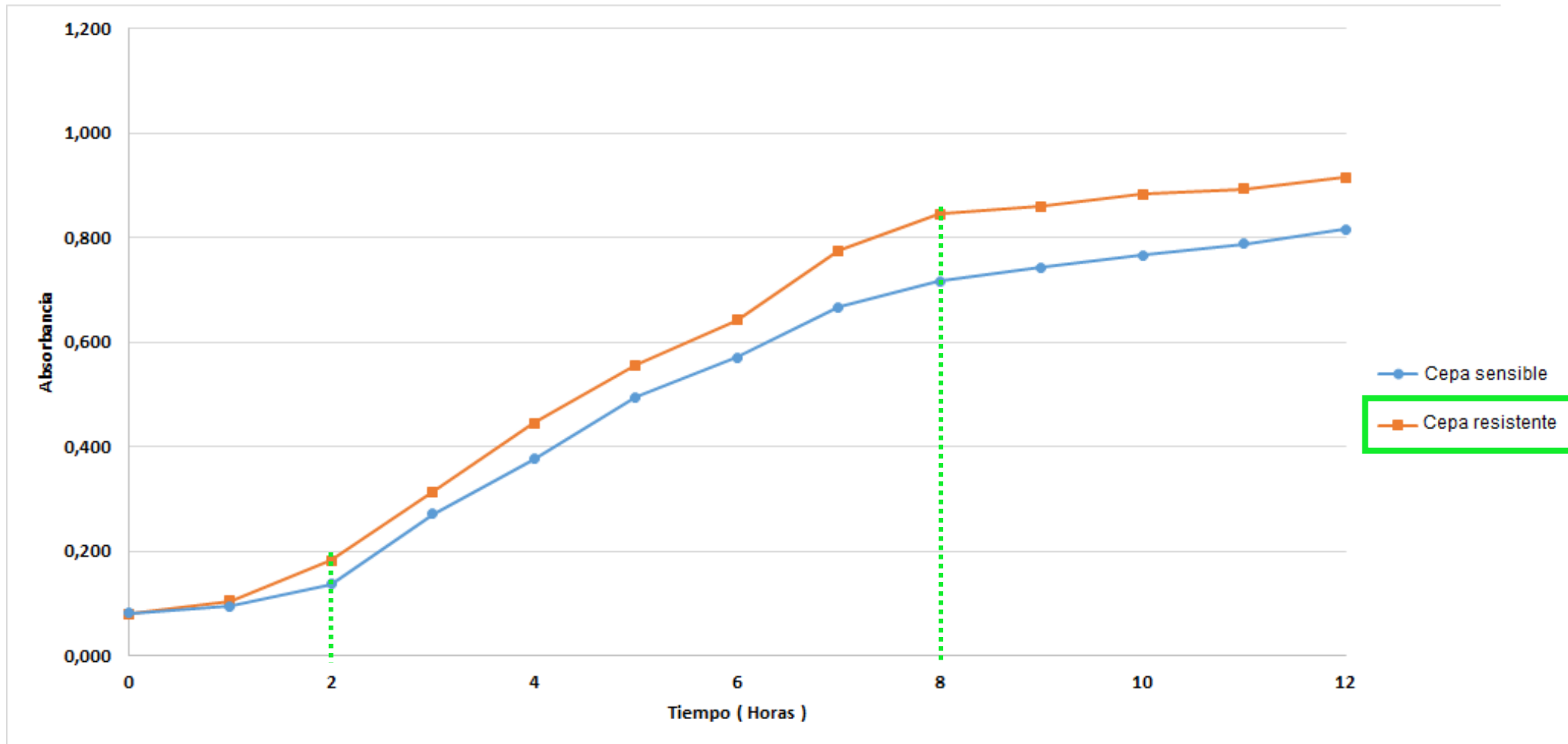
Lectura de la placa con y sin tapa



Cada punto graficado corresponde a la media de tres lecturas

Cinética: En placa

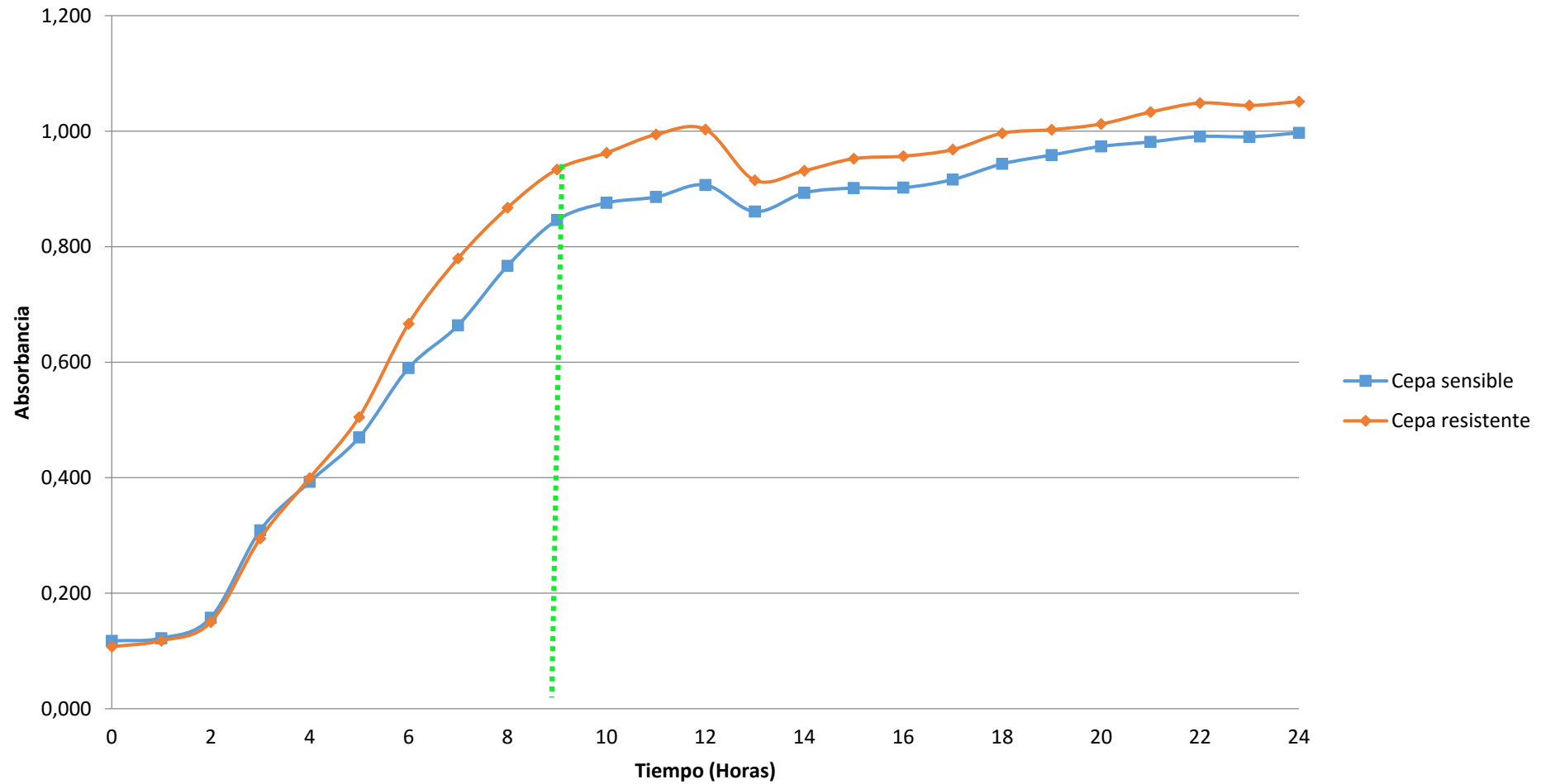
Crecimiento durante 12 horas



Cada punto graficado corresponde a la media de tres lecturas

Cinética: En placa

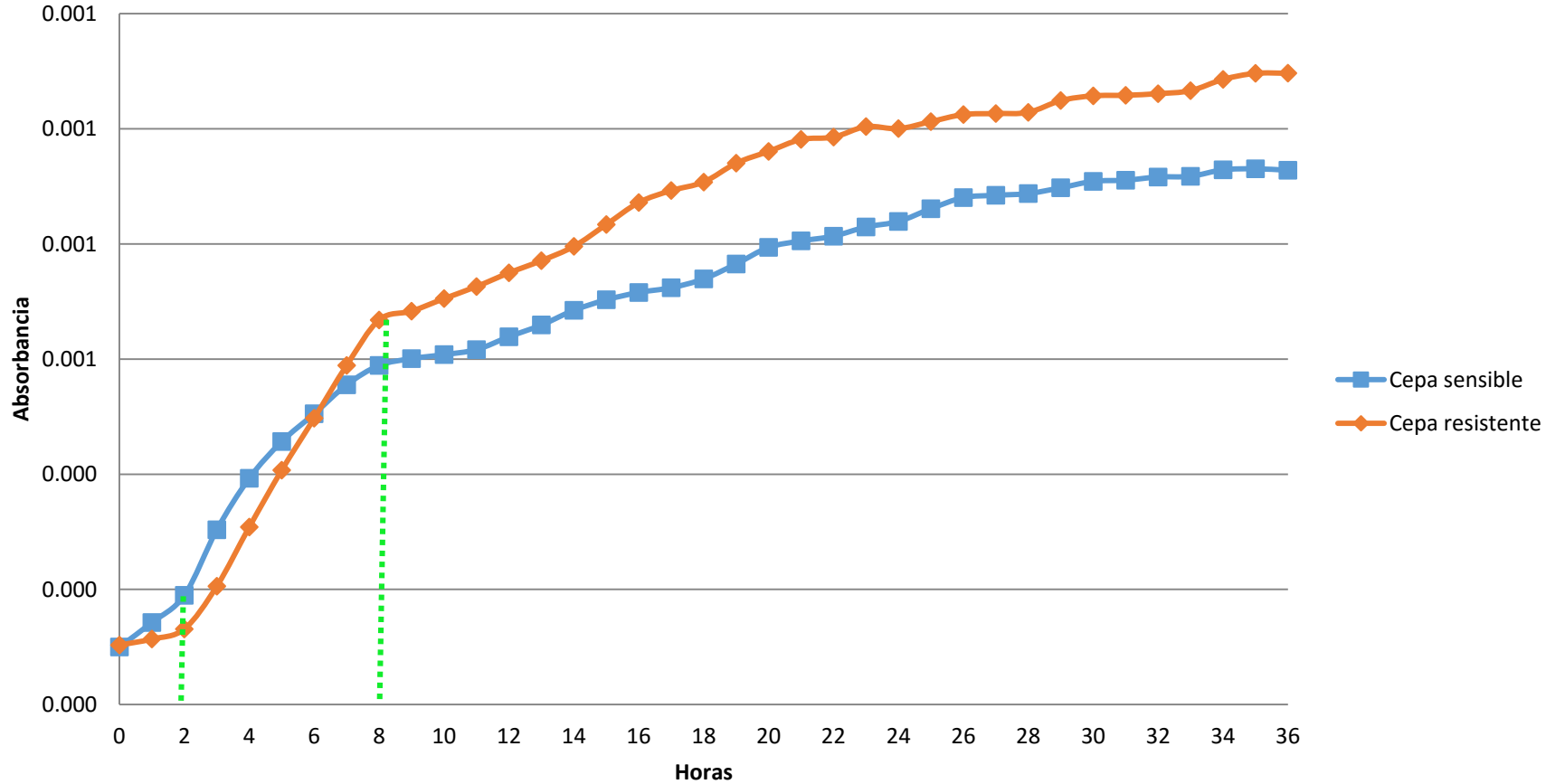
Crecimiento durante 24 horas



Cada punto graficado corresponde a la media de tres lecturas

Cinética: En placa

Crecimiento durante 36 horas



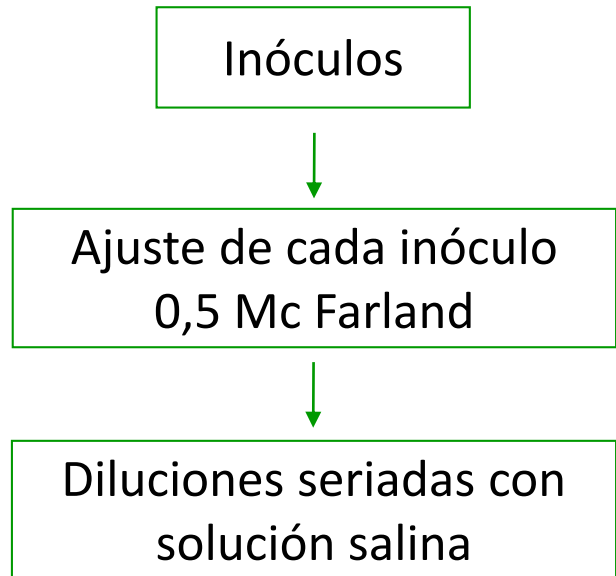
Cada punto graficado corresponde a la media de tres lecturas

Riverón y Col. 2012 . Cuba
Desechos del metabolismo
suspendidos en el medio

Hallazgos

1. Ambas cepas en estudio presentaron aspecto mucoso y brillante
- 2. Se identificaron las fases de latencia, exponencial y estacionaria para ambas cepas en estudio**

Viabilidad: Diseño del experimento






Tiempo (Horas)	Fase de crecimiento
0	Latencia
6	Exponencial
13	Inicio de la estacionaria
24	Durante la estacionaria

35 Horas

Viabilidad: Recuento bacteriano

	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883					<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0 Hrs	6 Hrs	13 Hrs	24 Hrs	35 Hrs	0 Hrs	6 Hrs	13 Hrs	24 Hrs	35 Hrs
B	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
C	10^2	10^2	10^2	10^2	10^2	10^2	10^2	10^2	10^2	10^2
D	10^3	10^3	10^3	10^3	10^3	10^3	10^3	10^3	10^3	10^3
E	10^4	10^4	10^4	10^4	10^4	10^4	10^4	10^4	10^4	10^4
F	10^5	10^5	10^5	10^5	10^5	10^5	10^5	10^5	10^5	10^5
G	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6	10^6
H	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7

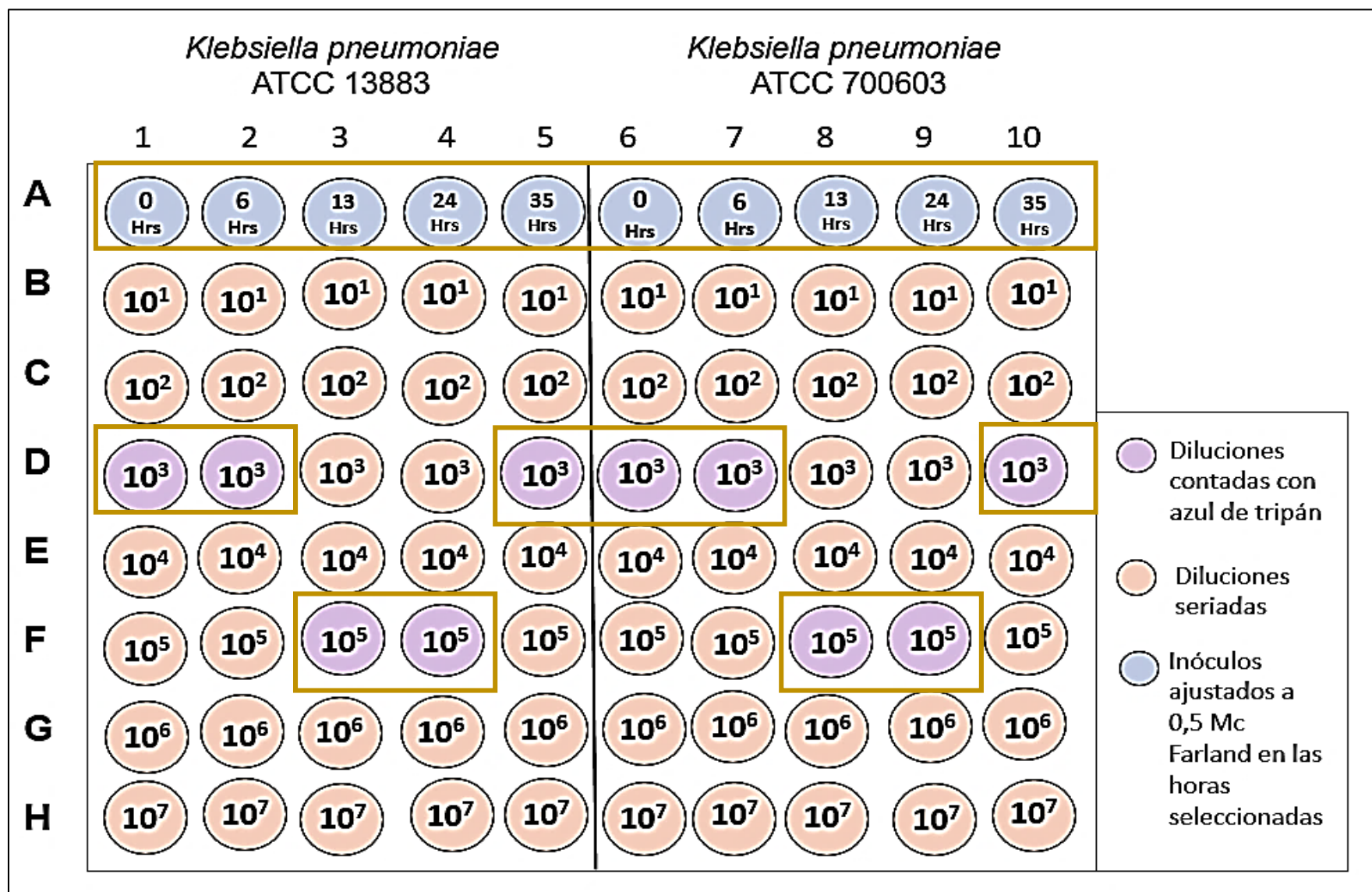
- ❖ Siembra en profundidad
 - ❖ Incubar
 - ❖ Conteo UFC
- Recuento manual

-  Diluciones sembradas con plate count
-  Diluciones seriadas para el plaqueo
-  Inóculos ajustados a 0,5 Mc Farland en las horas seleccionadas

Viabilidad: Resultados recuento bacteriano

Cepa	Tiempo (Horas)	Fase cinética	Dilución	UFC/ ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 (Sensible)	0	Latencia	10^5	$1,7 \times 10^8$
	6	Exponencial	10^5	$3,1 \times 10^8$
	13	Inicio estacionaria	10^7	$2,7 \times 10^{10}$
	24	Durante estacionaria	10^7	$2,4 \times 10^{10}$
	35	Final estacionaria	10^5	$1,5 \times 10^8$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 (Resistente)	0	Latencia	10^5	$1,8 \times 10^8$
	6	Exponencial	10^5	$4,1 \times 10^8$
	13	Inicio estacionaria	10^7	$3,6 \times 10^{10}$
	24	Durante estacionaria	10^7	3×10^{10}
	35	Final estacionaria	10^5	$2,8 \times 10^8$

Viabilidad: Azul de tripán



Conteo microscópico
en 40x con cámara
de Neubauer

Azul de
tripán

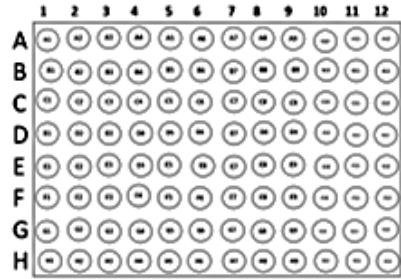
Viabilidad: Resultados azul de tripán

Tiempo (Horas)	Fase cinética	% Viabilidad	% Mortalidad	UFC/ml
Cepa sensible: <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883				
0	Latencia	100	0	$1,4 \times 10^9$
6	Exponencial	97,2	2,7	$1,1 \times 10^{10}$
13	Inicio estacionaria	93,1	6,8	$5,8 \times 10^{11}$
24	Durante estacionaria	89,3	10,6	$4,7 \times 10^{11}$
35	Final estacionaria	75,6	24,3	$7,8 \times 10^9$
Cepa resistente: <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603				
0	Latencia	96,8	3,1	$3,2 \times 10^9$
6	Exponencial	95,4	4,5	$1,3 \times 10^{10}$
13	Inicio estacionaria	91,8	8,1	$7,4 \times 10^{11}$
24	Durante estacionaria	88,0	11,9	$6,7 \times 10^{11}$
35	Final estacionaria	83,0	17,0	$1,0 \times 10^{10}$

Hallazgos

1. Ambas cepas en estudio presentan aspecto mucoso y brillante
2. Se identificaron las fases de latencia, exponencial y estacionaria para ambas cepas en estudio
- 3. En la fase estacionaria se obtuvo mayor población mientras que en la fase de latencia hubo menos población bacteriana cepa para ambas cepas en estudio**

Determinación de CIM con ciprofloxacina



Cada placa contenía caldo MH y ciprofloxacina



		75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	Descartar 75 µl
		2	3	4	5	6	7	8	9	10
B	118 µl MH 32 µl Cipro	50 µl MH	50 µl MH	50 µl MH	50 µl MH	50 µl MH	50 µl MH	50 µl MH	50 µl MH	50 µl MH
C	118 µl MH 32 µl Cipro	50 µl MH	50 µl MH	50 µl MH	50 µl MH	50 µl MH	50 µl MH	50 µl MH	50 µl MH	50 µl MH
D	40 µl Cipro 10 µl MH	40 µl Cipro 10 µl MH	50 µl MH	50 µl MH	100 µl MH	100 µl MH				

0, 3, 6, 13 y 24 horas

A medida que se tomaba el inóculo del tubo en cada tiempo se colocaba en los pozos



	2	3	4	5	6	7	8	9	10
B	118 µl MH 32 µl Cipro 50 µl Inóculo	50 µl MH 50 µl Inóculo	50 µl MH 50 µl Inóculo	50 µl MH 50 µl Inóculo	50 µl MH 50 µl Inóculo	50 µl MH 50 µl Inóculo	50 µl MH 50 µl Inóculo	50 µl MH 50 µl Inóculo	50 µl MH 50 µl Inóculo
C	118 µl MH 32 µl Cipro 50 µl Inóculo	50 µl MH 50 µl Inóculo	50 µl MH 50 µl Inóculo	50 µl MH 50 µl Inóculo	50 µl MH 50 µl Inóculo	50 µl MH 50 µl Inóculo	50 µl MH 50 µl Inóculo	50 µl MH 50 µl Inóculo	50 µl MH 50 µl Inóculo
D	40 µl Cipro 50 µl inóculo 10 µl MH	40 µl Cipro 50 µl inóculo 10 µl MH	50 µl MH 50 µl inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo	100 µl MH	100 µl MH			

T
U
B
O

CIM: Resultados crecimiento en tubo

Tiempo (Horas)	Fase cinética	CIM
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 (Cepa sensible)		
0	Latencia	4 µg/ml
3	Inicio exponencial	2 µg/ml
6	Exponencial	8 µg/ml
13	Inicio estacionaria	8 µg/ml
24	Durante estacionaria	8 µg/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 (Cepa resistente)		
0	Latencia	4 µg/ml
3	Inicio exponencial	4 µg/ml
6	Exponencial	8 µg/ml
13	Inicio estacionaria	8 µg/ml
24	Durante estacionaria	8 µg/ml

Ramírez y Col. 2012. Venezuela
CIM y CBM únicamente en fase exponencial

Caldo MH e
inóculo inicial a
incubar

0, 6, 13 y 24 horas de
desarrollo bacteriano

Adicionar
ciprofloxacina

Diluciones
seriadas

P
L
A
C
A

		100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	Descartar 100 µl
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
B	118 µl MH 32 µl Cipro 50 µl Inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo
C	118 µl MH 32 µl Cipro 50 µl Inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo
D	40 µl Cipro 50 µl inóculo 10 µl MH	40 µl Cipro 50 µl inóculo 10 µl MH	50 µl MH 50 µl inóculo	50 µl MH 50 µl inóculo	100 µl MH	100 µl MH				

CIM: Resultados crecimiento en placa

Tiempo (Horas)	Fase cinética	CIM
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 (Cepa sensible)		
0	Latencia	1 µg/ml
6	Exponencial	16 µg/ml
13	Inicio estacionaria	16 µg/ml
24	Durante estacionaria	4 µg/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 (Cepa resistente)		
0	Latencia	2 µg/ml
6	Exponencial	16 µg/ml
13	Inicio estacionaria	32 µg/ml
24	Durante estacionaria	8 µg/ml

Wiegand y Col. 2008. Canadá
Inóculos ajustados a 0,5 Mc
Farland

Anderl y Col. 2003. EEUU
Inicio de la fase estacionaria
menos susceptible

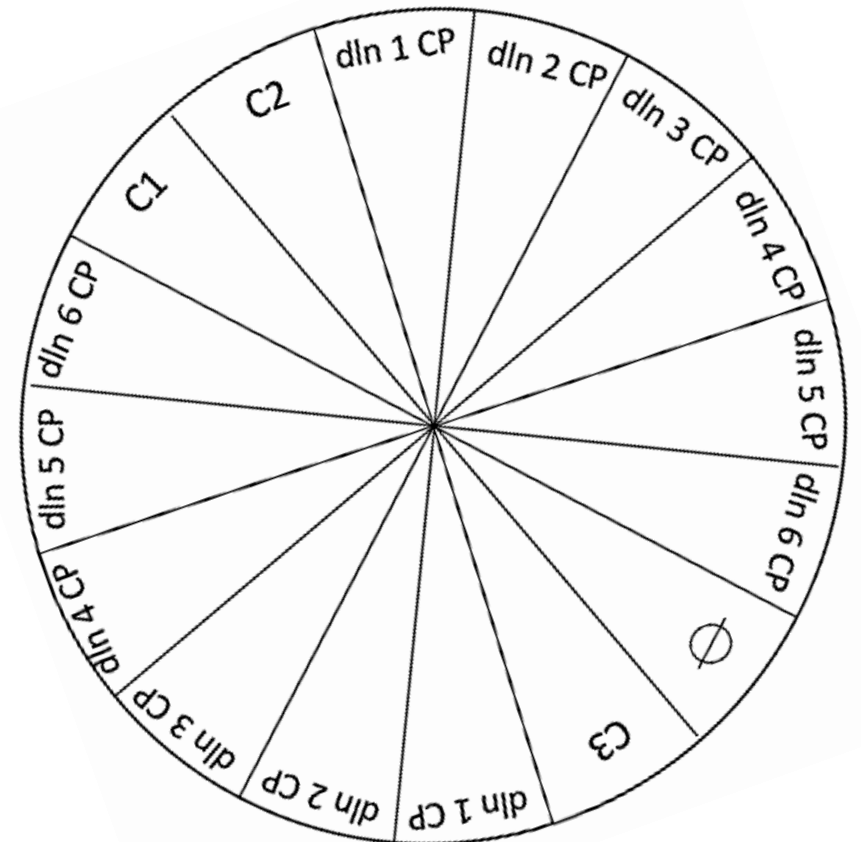
Determinación de la CBM con ciprofloxacina

Leer placa de determinación CIM luego de su incubación

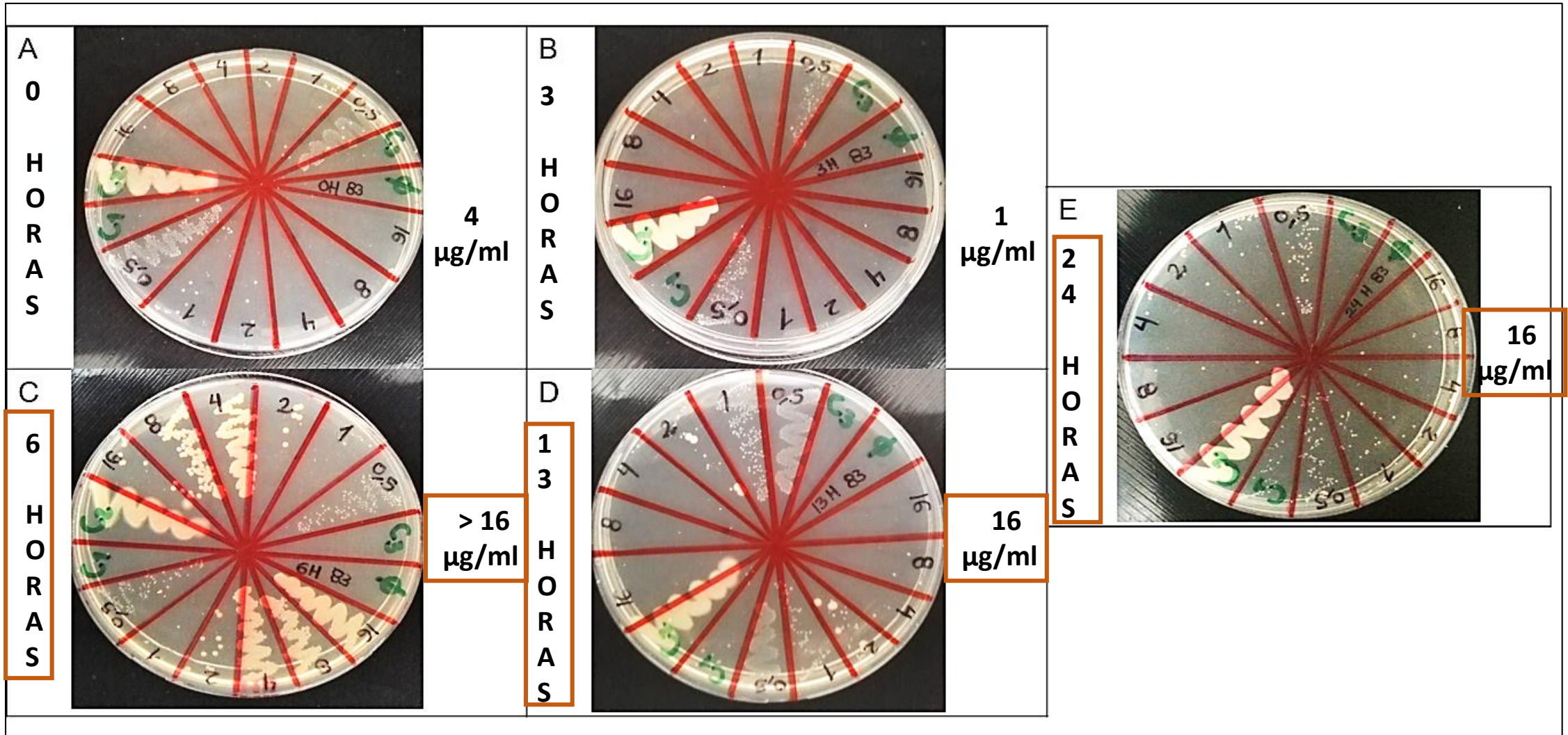
Según turbidez observar en cuál dilución hubo inhibición

Incubar cajas de petri

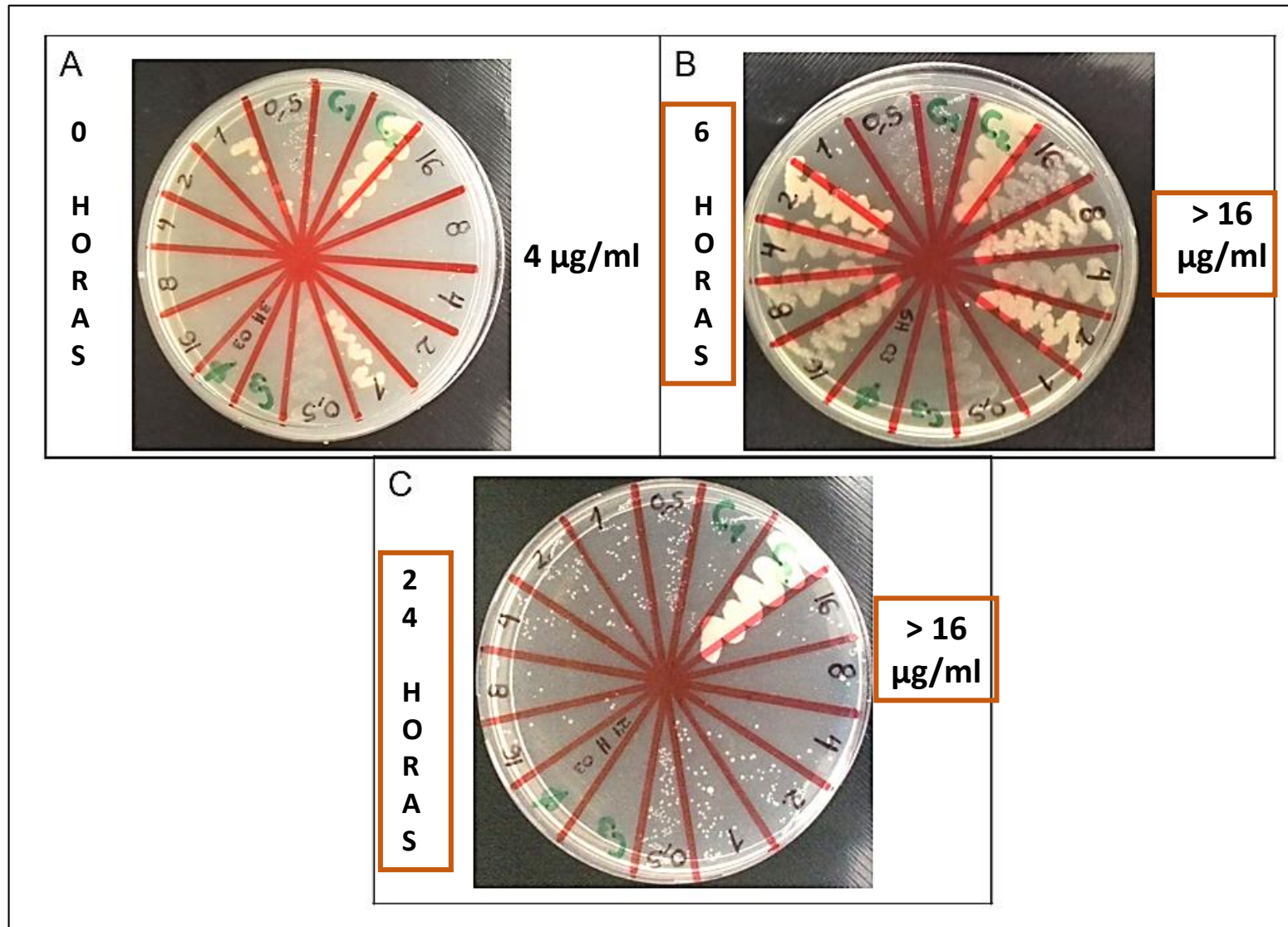
Observar inhibición en cada concentración de ciprofloxacina utilizada



CBM: Resultados en tubo cepa sensible



CBM: Resultados en tubo cepa resistente

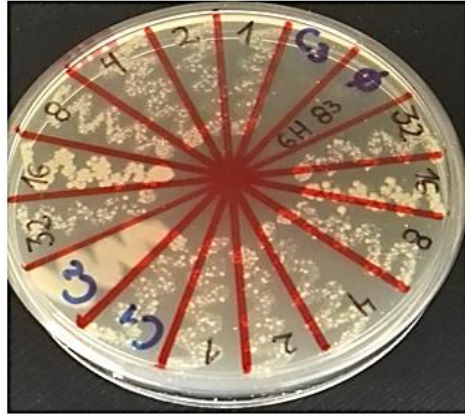


Determinación de la CBM en placa

Klebsiella pneumoniae ATCC 13883 (Cepa sensible)

A

6
H
O
R
A
S



> 32
µg/ml

B

1
3
H
O
R
A
S



> 32
µg/ml

C

6
H
O
R
A
S



> 32
µg/ml

D

1
3
H
O
R
A
S



> 32
µg/ml

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 (Cepa resistente)

Hallazgos

1. Ambas cepas en estudio presentan aspecto mucoso y brillante
2. Se identificaron las fases de latencia, exponencial y estacionaria para ambas cepas en estudio
3. En la fase estacionaria se obtuvo mayor población mientras que en la fase de latencia hubo menos población bacteriana cepa para ambas cepas en estudio
- 4. La determinación de CIM y CBM varía según la fase donde se realice el estudio y si el desarrollo bacteriano se lleva a cabo en tubo o en placa**
- 5. La susceptibilidad de las cepas en estudio frente a la ciprofloxacina fue menor en la fase exponencial y estacionaria y mayor en la fase de latencia**

Conclusiones

- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 presentaron aspecto mucoso y brillante
- En las cinéticas de crecimiento se identificaron las fases de latencia, exponencial y estacionaria para ambas cepas en estudio
- En la fase estacionaria, seguida de la fase exponencial se obtuvo la mayor población bacteriana viable para ambas cepas en estudio mientras que en la fase de latencia hubo menos población viable

Conclusiones

- La determinación de CIM y CBM frente a la ciprofloxacina en ambas cepas en estudio varía según la fase de crecimiento donde se realice el estudio y si el desarrollo bacteriano se lleva a cabo en tubo o en placa, necesitando menores concentraciones de antibiótico en la fase de latencia
- La susceptibilidad de las cepas en estudio frente a la ciprofloxacina fue menor en la fase exponencial y estacionaria, motivo por el cual se sugiere realizar la determinación de CIM y CBM en estas fases

Agradecimientos

A Dios, por ser el centro de mi vida

A mis padres, por su apoyo incondicional

A mis asesores, por sus consejos y tiempo invertido

A la UCMC y sus docentes, por cada aprendizaje otorgado en el transcurso de mi carrera profesional

A la Universidad Nacional de Colombia, por brindarme todos los recursos económicos y humanos para culminar este trabajo