



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

**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***

**JESSICA TATIANA VALENCIA SALGUERO**

**EDITH DEL CARMEN HERNÁNDEZ ROJAS-MSc**  
Asesora interna

**JAIVER EDUARDO ROSAS PÉREZ-PhD**  
Asesor externo

**SANDRA CLARISSA VEGA CHAPARRO-PhD**  
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**

## **DEDICATORIA**

### ***A Dios***

*Por darme la vida para vivir esta experiencia y ser mi apoyo, sustento y fortaleza en la cada dificultad. Por ser mi inspiración y mi mejor amigo cuando nadie más estuvo, por ser fiel y confiar en mis capacidades.*

### ***A mis padres***

*Fernando Valencia Moreno y Mary Lucía Salguero por haber creído en mí, por sus oraciones y por ser mi apoyo incondicional, porque han sido mi sustento durante este camino, por su amor en los momentos difíciles y sus sacrificios para que este camino llegara a feliz término.*

### ***A mi hermano***

*Por sus consejos y acompañamiento, que fueron importantes para seguir adelante*

***Con amor, Tatiana Valencia***

## **AGRADECIMIENTOS**

***A Dios, quien es la fuente de todo conocimiento y quien guía cada uno de mis días***

***A mi familia, por sus sacrificios para brindarme lo mejor y estar conmigo en todo momento***

***A mis asesores, por sus enseñanzas, consejos y tiempo invertido en el acompañamiento de este proceso***

***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 todo lo necesario para culminar este trabajo de investigación en sus instalaciones, con todos los recursos humanos y económicos para mi bienestar***

***A Diana Martínez, Nataly Huertas, Estefanía Marín, Paola Forero, por sus enseñanzas, recomendaciones, apoyo y dedicación***

***A los laboratoristas, Doris Rojas, Miriam Herrera y Jorge Laverde porque gracias a su disposición contribuyeron a cada uno de los resultados obtenidos***

***A Dayana Forero Katherine Medina y especialmente a Brayan Téllez, porque confiaron en mí desde el primer momento y nunca dudaron de mis capacidades***

***Al Programa Nacional de Ciencia y Tecnología de la salud de COLCIENCIAS, Convocatoria 656 de 2014 “Es tiempo de Volver”. Proyecto: Diseño y desarrollo de un Sistema para Liberación Controlada de péptidos sintéticos derivados de Lactoferricina Bovina con actividad antibacteriana. Contrato No. FP44842-154-2015***

***Al grupo de representación Cámara mayor de la UCMC, especialmente al director Juan Franco y al profesor Camilo Abello por su comprensión durante toda la carrera para continuar perteneciendo al grupo a pesar de mis limitaciones de tiempo***

***Tatiana Valencia***

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>1. ANTECEDENTES</b>	<b>17</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>22</b>
<b>2.1. GÉNERO <i>Klebsiella</i></b>	<b>22</b>
2.1.1. Características generales y clasificación	22
2.1.2. Epidemiología	22
2.1.3. Factores de patogenicidad y virulencia	23
2.1.4. Identificación del género <i>Klebsiella</i>	24
<b>2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	<b>27</b>
2.2.1. Epidemiología	27
2.2.2. Patogenicidad	28
<b>2.3. CEPAS ATCC</b>	<b>29</b>
2.3.1. Cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC	29
<b>2.4. CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO</b>	<b>30</b>
2.4.1. Fases de la cinética de crecimiento	31
<b>2.5. TÉCNICAS DE VIABILIDAD</b>	<b>32</b>
2.5.1. Recuento en placa	32
2.5.2. Azul de tripán	33
<b>2.6. INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN EN SALUD - IAAS</b>	<b>34</b>
<b>2.7. RESISTENCIA BACTERIANA</b>	<b>34</b>

2.7.1. Resistencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	36
<b>2.8. ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN INFECCIONES POR <i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	<b>37</b>
2.8.2. Ciprofloxacina	38
<b>2.9. MÉTODOS DE DILUCIÓN</b>	<b>39</b>
2.9.2. CIM y CBM	39
<b>3. DISEÑO METODOLÓGICO</b>	<b>41</b>
<b>3.1. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS</b>	<b>41</b>
3.1.1. Activación de las cepas ATCC	41
3.1.2. Características macroscópicas de las colonias	41
3.1.3. Coloración de Gram	42
3.1.4. Criopreservación de las cepas ATCC	42
3.1.5. Determinación de la cinética de crecimiento en tubo	42
3.1.6. Determinación de la cinética de crecimiento en placa	43
3.1.7. Ensayo preliminar para evaluar viabilidad bacteriana	45
3.1.8. Técnica de plaqueo manual	45
3.1.9. Viabilidad con azul de tripán	46
3.1.10. Determinación de CIM con ciprofloxacina	48
3.1.11. Determinación de la CBM con la ciprofloxacina	50
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>52</b>
<b>4.1. ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS ATCC</b>	<b>52</b>
<b>4.2. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS COLONIAS</b>	<b>52</b>
4.2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	52
4.2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	53
<b>4.3. COLORACIÓN DE GRAM</b>	<b>54</b>
<b>4.4. CRIOPRESERVACIÓN DE LAS CEPAS ATCC</b>	<b>54</b>
<b>4.5. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN TUBO</b>	<b>55</b>
4.5.1. Ensayo utilizando 100 o 300 µl de inóculo durante 12 horas de	

incubación	55
<b>4.5.2.</b> Ensayo utilizando 100 o 300 µl de inóculo durante 12 horas de incubación, para determinar el tiempo de la fase de latencia y exponencial de cada cepa	56
<b>4.5.3.</b> Cinética de crecimiento en tubo realizando la lectura de la placa con y sin tapa	57
<b>4.6. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN PLACA</b>	58
<b>4.6.1.</b> Ensayo utilizando 100 o 300 µl de inóculo durante 12 horas de incubación en placa	58
<b>4.6.2.</b> Variación leyendo la placa con y sin tapa	59
<b>4.6.3.</b> Cinética de crecimiento durante 12 horas de incubación en placa, para determinar el tiempo de la fase de latencia y exponencial de cada cepa	60
<b>4.6.4.</b> Cinética de crecimiento durante 24 horas de incubación en placa	61
<b>4.6.5.</b> Cinética de crecimiento durante 36 horas de incubación en placa	62
<b>4.7. VIABILIDAD BACTERIANA</b>	63
<b>4.7.1.</b> Ensayo preliminar	63
<b>4.7.2.</b> Ensayo de plaqueo bacteriano	64
<b>4.7.3.</b> Ensayo de viabilidad con azul de tripán	67
<b>4.8. DETERMINACIÓN DE LA CIM UTILIZANDO CIPROFLOXACINA</b>	69
<b>4.8.1.</b> Determinación de la CIM en placa	69
<b>4.8.2.</b> Determinación de la CIM en tubo	70
<b>4.9. DETERMINACIÓN DE LA CBM UTILIZANDO CIPROFLOXACINA</b>	71
<b>4.9.1.</b> Determinación de la CBM en placa	71
<b>4.9.2.</b> Determinación de la CBM en tubo	72
<b>5. DISCUSIÓN</b>	75
<b>6. CONCLUSIONES</b>	82
<b>7. REFERENCIAS</b>	84

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>FIGURA 1.</b> Fases de la cinética de crecimiento bacteriano	<b>31</b>
<b>FIGURA 2.</b> Técnicas de viabilidad	<b>33</b>
<b>FIGURA 3.</b> Resultados de vigilancia en resistencia bacteriana del año 2015	<b>37</b>
<b>FIGURA 4.</b> Cinética de crecimiento bacteriano durante 24 horas	<b>44</b>
<b>FIGURA 5.</b> Distribución de la placa para ensayo de plaqueo	<b>46</b>
<b>FIGURA 6.</b> Distribución de la placa para el ensayo con azul de tripán	<b>47</b>
<b>FIGURA 7.</b> Esquema de los pozos utilizados en el ensayo para determinar CIM en placa	<b>49</b>
<b>FIGURA 8.</b> Esquema de los pozos utilizados para determinar CIM con el desarrollo bacteriano en tubo	<b>50</b>
<b>FIGURA 9.</b> Distribución de la caja de petri para determinación de CBM	<b>51</b>
<b>FIGURA 10.</b> Activación de las cepas de trabajo ATCC	<b>52</b>
<b>FIGURA 11.</b> Visualización macroscópica de las colonias de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	<b>53</b>
<b>FIGURA 12.</b> Pases realizados para obtener colonias aisladas para <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	<b>53</b>
<b>FIGURA 13.</b> Coloración de Gram para las dos cepas en estudio	<b>54</b>
<b>FIGURA 14.</b> Criopreservación de cada cepa	<b>54</b>
<b>FIGURA 15.</b> Efecto del volumen de inóculo en la cinética de crecimiento en tubo durante 12 horas	<b>56</b>
<b>FIGURA 16.</b> Ensayo durante 12 horas con 100 o 300 µl para establecer el tiempo de la fase de latencia y exponencial	<b>57</b>
<b>FIGURA 17.</b> Ensayo en tubo leyendo la placa con y sin tapa para ambas cepas durante 12 horas	<b>58</b>
<b>FIGURA 18.</b> Efecto del volumen de inóculo en la cinética de crecimiento en placa durante 12 horas	<b>59</b>
<b>FIGURA 19.</b> Lectura con y sin tapa para ambas cepas incubadas en	



placa durante 12 horas	60
<b>FIGURA 20.</b> Cinética de crecimiento durante 12 horas para ambas cepas bacterianas en placa	61
<b>FIGURA 21.</b> Cinética de crecimiento durante 24 horas para ambas cepas bacterianas en placa	62
<b>FIGURA 22.</b> Cinética de crecimiento durante 36 horas de incubación para cada cepa en placa	63
<b>FIGURA 23.</b> Ensayo de plaqueo bacteriano	66
<b>FIGURA 24.</b> Visualización microscópica del cuadrante en 40x con azul de tripán	68
<b>FIGURA 25.</b> CBM de los inóculos de 6 y 13 horas	72
<b>FIGURA 26.</b> Resultado de CBM para <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	73
<b>FIGURA 27.</b> CBM obtenidos para <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	74

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>TABLA 1.</b> Pruebas bioquímicas para identificación del género <i>Klebsiella</i>	<b>26</b>
<b>TABLA 2.</b> Conteo manual de UFC a diferentes volúmenes de inóculo	<b>64</b>
<b>TABLA 3.</b> Tiempos utilizados para la obtención de los inóculos en las técnicas de viabilidad	<b>65</b>
<b>TABLA 4.</b> Plaqueo bacteriano	<b>67</b>
<b>TABLA 5.</b> Resultados del conteo manual con azul de tripán	<b>69</b>
<b>TABLA 6.</b> Determinación de la CIM de ciprofloxacina en placa para cada cepa evaluada	<b>70</b>
<b>TABLA 7.</b> Determinación de la CIM de ciprofloxacina en tubo para cada cepa evaluada	<b>71</b>



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

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

**RESUMEN**

La determinación *in vitro* de susceptibilidad antimicrobiana a diferentes moléculas actualmente se realiza indistintamente en las fases de la cinética de crecimiento, aunque en cada una de ellas el microorganismo tiene una serie de cambios en su metabolismo y desarrollo, lo que muy seguramente podría inducir una respuesta diferente a los antimicrobianos.

Por lo anteriormente descrito, en este trabajo se evaluó 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, con el propósito de determinar si hay diferencia en la concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM), dependiendo de la fase de crecimiento bacteriano en la cual se realice la determinación.

Con esta finalidad se realizó la caracterización morfológica macroscópica de las colonias de cada cepa en estudio, luego se determinó la cinética de crecimiento y

mediante la utilización de técnicas de viabilidad se evidenció que la fase en donde hay mayor población bacteriana viable es al final de la fase exponencial en la fase estacionaria. Finalmente se realizó la prueba de susceptibilidad a la ciprofloxacina de las cepas estudiadas, para determinar la CIM y CBM en las fases de latencia, exponencial y estacionaria. Se encontró que la susceptibilidad varía según la fase de la cinética de crecimiento bacteriano en donde se realice la determinación y de la condición en la que se lleve a cabo el estudio.

**Palabras clave:** *Klebsiella pneumoniae*, cinética, viabilidad, CIM, CBM, ciprofloxacina

**Estudiante:** Jessica Tatiana Valencia Salguero

**Docentes:** Edith del Carmen Hernández Rojas-MSc

Jaiver Eduardo Rosas Pérez-PhD

Sandra Clarissa Vega Chaparro-PhD

**Fecha:** 1 de junio de 2018

## INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de antibióticos convencionales produce continuamente consecuencias desfavorables para la salud, debido a la generación de resistencia bacteriana. Sabiendo que, en una alta proporción de los casos presentados, estos antibióticos no responden a la necesidad de control y disminución de la infección (1).

En este contexto, se ha adoptado el término de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), correspondientes a aquellas que se contraen en el ambiente intrahospitalario y que no se habían manifestado en el paciente antes de ingresar al servicio de salud. Esta situación afecta su calidad de vida, generando un mayor tiempo de hospitalización y aumentando los costos para el sistema de salud. Este tipo de infecciones, en algunas ocasiones pueden ser contraídas por el personal que trabaja en la entidad prestadora del servicio de salud (1–4).

En vista de la alta incidencia de IAAS causadas por diferentes microorganismos, las entidades gubernamentales han diseñado nuevas estrategias en el campo de la salud pública, como la notificación de los eventos nuevos en las subredes de atención y han creado indicadores para controlar esta incidencia incluyendo otras infecciones como sífilis y tuberculosis (5). Por otra parte, como medida complementaria para disipar el aceleramiento en la resistencia bacteriana causada por el uso indiscriminado de los antibióticos, se están implementando nuevas alternativas terapéuticas como la utilización de moléculas peptídicas o extractos naturales, con el fin de ampliar las opciones de tratamiento y generar cada día una mayor aproximación hacia la medicina personalizada y preventiva, que contribuya a disminuir la morbimortalidad (6–9).

Para aportar al avance en la caracterización de las cepas y el efecto de las moléculas antimicrobianas en ellas es necesario conocer los procedimientos que actualmente se tienen en cuenta al suministrar un antibiótico. Para ello, existen ayudas diagnósticas como el antibiograma y la determinación de los valores de CIM y CBM, porque de esta manera el profesional de salud puede tener un indicio de las características propias de la bacteria en cuestión y así ayudar a establecer la dosis efectiva a utilizar en cada caso.

En la literatura consultada, se evidencia que en algunos estudios no hay claridad acerca del momento más adecuado para realizar la determinación de CIM y CBM según la cinética de crecimiento propia de cada bacteria (10–12). Aunque normas internacionales como la CLSI recomiendan algunos parámetros a tener en cuenta para su realización, no se especifica detalladamente aspectos como el volumen del inóculo, si es necesario realizar una cinética de crecimiento para identificar cada fase o si el desarrollo de la bacteria debe hacerse en tubo o en placa, lo cual sería importante conocer si tiene algún impacto en la determinación (13).

Si se conoce el efecto que tiene realizar la determinación de CIM y CBM en las cuatro fases de la cinética de crecimiento: fase de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte; es posible que métodos *in vitro* como los antibiogramas, generen resultados más fiables en relación a la susceptibilidad de los microorganismos a varios antibióticos, suministrando un tratamiento más apropiado para cada paciente; además de disminuir la propagación en las personas que rodean a quienes padecen la infección (14).

Por lo anteriormente descrito, se consideró que la realización de este trabajo aportaría conocimiento respecto a las posibles diferencias al realizar la determinación de CIM y CBM durante las diferentes fases de la cinética de crecimiento de una bacteria; esta información podría usarse como evidencia

relevante de los aspectos que se deben tener cuenta a la hora de seleccionar un antibiótico y su dosis. Con este propósito se utilizó la ciprofloxacina como agente antibacteriano modelo, el cual ha sido ampliamente utilizado para el control de infecciones causadas por bacterias Gram negativas (10,15), y para realizar este estudio fueron seleccionadas las cepas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (16–18).

En este trabajo se utilizaron cepas ATCC, pero se considera muy importante dar continuidad a estos estudios, evaluando cepas silvestres para de esta forma contar con mayor información de los parámetros a tener en cuenta al momento de realizar las determinaciones de CIM y CBM de los microorganismos más frecuentemente aislados en 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 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.
- Determinar la población bacteriana de las cepas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 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 frente a las cepas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 en las fases de crecimiento de latencia, exponencial y estacionaria.



## 1. ANTECEDENTES

Desde 1928 se inició el interés por los antibióticos cuando Alexander Fleming descubrió de manera fortuita la penicilina, a partir de un moho que contaminaba sus placas de cultivo, pero que a su vez inhibía el crecimiento del microorganismo *Staphylococcus aureus*. Desafortunadamente fue solamente hasta 1941, durante la segunda guerra mundial, cuando se pudo disponer de la penicilina a gran escala para resolver las infecciones presentes en los militares y en la población civil (19).

A partir de ese momento, se comenzaron a descubrir nuevos antibióticos, por ejemplo, en 1962 se conoció el grupo de las quinolonas, al cual pertenece la ciprofloxacina. Posteriormente hacia 1981 se detectó la generación de un mecanismo de resistencia por parte de los microorganismos, conocido como BLEE ( $\beta$ -lactamasas de espectro extendido), el cual es detectado actualmente en algunas cepas de *Klebsiella pneumoniae* (19).

En el boletín de medicamentos esenciales publicado en el año 2000, se afirma que la resistencia a los agentes antimicrobianos representa una amenaza mundial ya que, si bien, con la industrialización llegó la mejora en cuanto a calidad de vida; incluyendo vivienda, nutrición y saneamiento, así como el desarrollo de nuevos antimicrobianos para combatir las enfermedades. Con el paso del tiempo y el mal manejo de estos medicamentos se ha visto gran diferencia con respecto a la susceptibilidad que antes presentaban a ellos los microorganismos. Es así como en 1990 casi todos los gérmenes del cólera aislados en India eran sensibles a medicamentos de primera línea como la ampicilina o el ácido nalidíxico, pero para el año 2000 esos mismos medicamentos ya no funcionaban de la misma manera para controlar esta epidemia (3).

En Perú, durante el año 2005 se realizó un estudio sobre la determinación de CIM y CBM utilizando la ciprofloxacina en cepas clínicas aisladas de consulta externa y hospitalizaciones, encontrando resistencia a la ciprofloxacina del 49% y 73% respectivamente (10). Durante este mismo año, en New York se reportó un estudio con 602 aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* obtenidos en dos hospitales de Brooklyn; el 45% de las muestras analizadas producían  $\beta$ -lactamasas, lo cual dificultó el tratamiento en los pacientes y generó una mortalidad del 47% al cabo de 14 días, especialmente en aquellos que cursaban con bacteriemia (18). Por esa época también se presentó mayor incidencia de infecciones por *Enterococcus faecium*, especialmente en Europa; encontrándose la primera cepa resistente a vancomicina, en un paciente renal trasplantado en España (20).

En el año 2006 aseguran que “en países como Estados Unidos, las IAAS causaron la muerte de 60.000 personas por año, con un costo anual para las instituciones de salud de 4,5 billones de dólares; y se estimó que alrededor del 90% de estas infecciones fueron causadas por gérmenes multirresistentes” (2).

En Israel, en el año 2008 se realizó un estudio con 48 pacientes para conocer la mortalidad causada por *Klebsiella pneumoniae*. Se encontró que el 44% presentaban aislamientos compatibles con cepas resistentes a carbapenémicos y solo el 12,5% presentaron aislamientos acordes con cepas sensibles. Adicional a esto, se reportó la existencia de algunos factores que aumentaron la mortalidad; como por ejemplo enfermedad renal, estancia en unidad de cuidado intensivo (UCI) , uso de catéter venoso central o ventilación mecánica y el hecho de haber tenido procedimientos invasivos no quirúrgicos (21). Por otra parte, en el año 2010 se aisló *Enterococcus faecium* en 22 pacientes con vínculos epidemiológicos entre ellos (20).

Aunque no se han reportado artículos similares a este trabajo, en el año 2011 Miki Matsuo *et.al.*, utilizaron *Staphylococcus aureus* con algunas mutaciones genéticas, para evaluar si la expresión génica podía sufrir alguna modificación dependiendo de la fase de crecimiento en la cual se encontrara la bacteria y si esto podía afectar la susceptibilidad a moléculas peptídicas antimicrobianas. En este estudio, se demostró que la expresión de algunos genes aumenta significativamente durante la fase exponencial, pudiendo afectar la susceptibilidad antimicrobiana, y se sugirió que *Staphylococcus aureus* posiblemente era más susceptible a los péptidos antimicrobianos durante la fase estacionaria (22).

En el año 2012, se reportó un estudio realizado en Australia, donde utilizaron cepas de *Acinetobacter baumannii*, sensibles y resistentes a la colistina, para analizar si su efecto era diferente en la fase exponencial y estacionaria. Concluyendo que en ambas fases hubo un comportamiento similar con respecto a este antibiótico (23).

En el informe titulado *Antimicrobial resistance: global report on surveillance* del año 2014, se reportó que las principales bacterias que presentan resistencia a los fármacos antimicrobianos son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella*, *Shigella*, y *Neisseria gonorrhoea*, resaltando que algunas cepas de *Klebsiella pneumoniae* presentan resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, incluida la resistencia conferida por las carbapenemasas y las BLEE. Además, esta bacteria es una causa importante de IAAS en casos de neumonía, infecciones de los recién nacidos, septicemias o pacientes en unidad de cuidado intensivo (4). Recientemente en el año 2017, se reportó de nuevo un brote por *Enterococcus faecium* con la característica de tener en su ADN una enzima de restricción *SmaI* conocida como ST17, encontrada en otros aislados en el ambiente hospitalario a

nivel mundial que produce principalmente IAAS en Europa y afecta niños entre las 29 y 40 semanas de vida (24).

En Colombia, se han realizado varios estudios relacionados con las IAAS con el fin de conocer la frecuencia en la población y de esta manera contribuir a su detección, vigilancia y control; prevención de los efectos adversos y su adecuado reporte por medio del plan estratégico de consolidación de la red Nacional del Ministerio de Protección Social , como un ente que aporte a la implementación de políticas para la seguridad del paciente (25) .

En el contexto nacional, se llevó a cabo una investigación en hospitales de tercer nivel de la ciudad de Bogotá , donde mostraron que en general las bacterias año tras año están aumentando la resistencia a los antibióticos, como por ejemplo *Acinetobacter baumannii* resistente a imipenem en un 39% en 2003 (26).

Por esa misma época, se realizó un estudio publicado en 2006 sobre la vigilancia epidemiológica en hospitales de tercer nivel de complejidad pertenecientes al Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana de Bogotá (GREBO), en donde participaron 14 instituciones y se recolectaron 84.664 aislamientos provenientes de UCI, no UCI y extrahospitalarios; obteniendo como resultado siete microorganismos aislados con mayor frecuencia: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Enterobacter cloacae* (26). Encontrados estos agentes, se concluyó que hay diferentes factores que aumentan la resistencia de los microorganismos a los antibióticos convencionales, como por ejemplo, el punto epidémico para *Klebsiella pneumoniae* resistente a ceftazidima en el período de septiembre del 2001, que repitió en enero del 2002 y marzo - mayo del 2003 posiblemente atribuido a factores externos como cambios ambientales (26). Luego, en el año 2007 se publicó una investigación realizada en la ciudad de Medellín, donde aseguran que *Klebsiella pneumoniae* puede causar daño en

tracto urinario, pulmones y tejidos blandos; así como también puede producir en los pacientes sepsis, meningitis, conjuntivitis, absceso renal, endocarditis y bacteriemia asociada a catéter en población de riesgo como los neonatos, personas inmunosuprimidas o con enfermedades de base como diabetes mellitus o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (27).

En el año 2011, en Santander, Colombia se llevó a cabo una investigación acerca del efecto antibacteriano de nanopartículas de plata en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; para la determinación de CIM establecieron un inóculo inicial de 14 horas para ambos microorganismos y no se registra la cinética de crecimiento para cada bacteria, con el fin de establecer qué fase era la más adecuada para realizar dicha determinación (11).

En Bogotá, se presentó un brote de KPC (*Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas) en una unidad de cuidado coronario durante el año 2015; se identificaron 3 pacientes con sintomatología urinaria, respuesta inflamatoria sistémica con leucocitosis y trombocitopenia con un tiempo mayor a 72 horas de estancia hospitalaria; encontraron que el 100% de las cepas analizadas eran resistentes a ciprofloxacina, ceftazidima, ertapenem, gentamicina, nitrofurantoina, entre otros antibióticos (28). Finalmente en Medellín, a inicios del año 2016 se publicó una investigación en la cual se describieron las características clínicas de los pacientes hospitalizados con IAAS por KPC. En el estudio se incluyeron 52 pacientes, que tenían problemas clínicos de base relacionados con el uso de inmunosupresores, cirugía gastrointestinal, hepatopatía crónica o haber recibido un trasplante de órgano. Las afecciones más comunes que presentaron a causa de la infección fueron bacteremias (30,7%) y neumonías (13,7%). Y a pesar de haber administrado antibióticos al 100% de los pacientes analizados, sólo se utilizó el antibiograma para guiar el tratamiento en un 50,7%, en donde se tuvo

necesidad de utilizar terapia antibiótica combinada con tigeciclina y colistina para contrarrestar la infección (29).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. GÉNERO *Klebsiella*

#### 2.1.1. Características generales y clasificación

La familia *Enterobacteriaceae*, está compuesta por un gran número de especies que se encuentran en el suelo, agua, materia en descomposición y en el intestino del hombre. Dentro de la familia *Enterobacteriaceae* se encuentra el género *Klebsiella*, dentro del cual se conocen cuatro especies de mayor interés clínico: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae*, *K. rhinoscleromatis* y *K. oxytoca* (30).

Generalmente son bacterias inmóviles y con una capa gruesa de mucopolisacáridos que genera en las unidades formadoras de colonia (UFC) del microorganismo un aspecto mucoso (30). Morfológicamente se caracterizan por ser bacilos Gram negativos cortos que miden entre 0.3 a 1.0  $\mu\text{m}$  en diámetro y 0.6 a 6.0  $\mu\text{m}$  de longitud; son capsulados, no esporulados y aerobios facultativos (31).

Dentro de este género se encuentran cepas que son potentes patógenos oportunistas, pero también algunas son flora normal en el intestino del ser humano; a tal punto que las cepas no patógenas contribuyen a mantener el pH, trabajando en simbiosis junto con otras bacterias como *Escherichia coli* (32).

#### 2.1.2. Epidemiología

El género *Klebsiella* es junto con *Enterobacter* y *Serratia* la segunda causa más común de infección por enterobacterias y origina especialmente bacteremia, infección urinaria y neumonía (30). Aunque indudablemente *Klebsiella* representa problemas a nivel clínico, también causa dificultades a nivel económico. Según un informe del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), se estima que se producen alrededor de 25.000 muertes al año causadas por bacterias multirresistentes, dentro de las cuales se encuentra *Klebsiella spp.*, y las infecciones ocasionadas por estos microorganismos cuestan anualmente alrededor de 1,5 billones de euros (19).

Durante el año 2008, se informó una alta frecuencia de *Klebsiella spp.* en muestras clínicas de diferentes lugares del mundo; mostrando porcentajes del 9% en Europa y Estados Unidos, 25% en Asia y 45% en Sur América. En Colombia el problema es muy semejante al resto del mundo, con porcentajes de resistencia cercanos al 32%, pero con la diferencia de carecer de un sistema de información que contribuya al seguimiento de los tratamientos y posibles resistencias que se puedan presentar en las diferentes regiones del país (33).

En Pereira, se analizaron 5.226 urocultivos con el fin de identificar los microorganismos más frecuentemente aislados causantes de infección en el tracto urinario. Se concluyó que *Escherichia coli* ocupaba el primer lugar con un 67,2% y en segundo lugar el 19,2% de los casos presentados fueron ocasionados por *Klebsiella spp.*, se recomendó utilizar la ciprofloxacina como opción terapéutica para pielonefritis por su alta efectividad y baja resistencia (34).

### **2.1.3. Factores de patogenicidad y virulencia**

El género *Klebsiella* posee polisacáridos capsulares que le permiten protegerse de la fagocitosis y también ayudan a prevenir su muerte por factores bactericidas presentes en el suero. La bacteria produce múltiples adhesinas con distinta especificidad por los receptores celulares, de tal forma que le permite adherirse a la célula huésped y los sideróforos ayudan a captar el hierro con el fin de tomar los nutrientes necesarios para su desarrollo (30).

Algunas cepas de *Klebsiella* tienen plásmidos que median la resistencia a agentes  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro gracias a la producción de enzimas BLEE, lo cual hace que sean resistentes a la mayoría de  $\beta$ -lactámicos, incluyendo las cefalosporinas de tercera generación, su modo de acción es inhibiendo la síntesis de la barrera de peptidoglicano de la pared celular bacteriana lo cual afecta su integridad estructural (19).

#### **2.1.4. Identificación del género *Klebsiella***

Aunque se pueden utilizar técnicas automatizadas como el vitek para la identificación de género y especie de los microorganismos en forma rápida y con un porcentaje de concordancia alto, aún se siguen utilizando las técnicas manuales que son de bajo costo y en la mayoría de casos permiten dar una aproximación al microorganismo causante por medio de las tablas de identificación existentes.

Para el caso de las enterobacterias, se pueden utilizar los medios de cultivo selectivos para guiar el proceso de identificación bacteriana; como por ejemplo el agar Mac Conkey que contiene sales biliares y cristal violeta que inhiben el crecimiento de la flora Gram positiva y su indicador es el rojo neutro; lo cual permite ver la degradación de la lactosa. Para el caso de *Klebsiella* se observan colonias grandes, rosadas y mucosas. El agar XLD (Xilosa-Lisina-Desoxicolato)



permite ver la fermentación de la xilosa, lactosa y sacarosa por medio del indicador rojo de fenol, en el caso de *Klebsiella* se observan colonias amarillas, opacas y mucosas. Para el cultivo de estos medios es recomendable incubar de 18-24 horas a 35-37 °C en aerobiosis (31).

Aparte de las características morfológicas observadas en los agares selectivos también se encuentran las pruebas bioquímicas, útiles para la identificación de los microorganismos. En la tabla 1 se muestran las pruebas más utilizadas para guiar un análisis presuntivo de identificación del género *Klebsiella*.

**TABLA 1.** Pruebas bioquímicas para identificación del género *Klebsiella* (31,35).

Pruebas bioquímicas	Resultado
Motilidad	-
<b>Citrato</b>	+
Producción de Co <sub>2</sub>	+
Urea	+
Voges proskauer	+

Pruebas bioquímicas	Resultado
Oxidasa	-
Catalasa	+
Ornitina	-
TSI	A/A
LIA	K/K

Pruebas bioquímicas	Resultado
Reducción de nitratos	+
Rojo de metilo	-
Fenilalanina	-

Indol	+/-
Lisina	+

Fermentación de carbohidratos	Resultado
Glucosa	+
Lactosa	+
Trealosa	+
Arabinosa	+
Manitol	+
Sorbitol	+
Rafinosa	+

### 2.2.1. Epidemiología

En el aspecto mundial, en el año 2017 se reportó que China, Korea, Taiwan e Irán hacen parte de los países con mayor reporte de infecciones por este patógeno, especialmente de cepas multirresistentes que se caracterizan por tener plásmidos y así causar infecciones invasivas especialmente en pacientes inmunocomprometidos. De esta manera, se concluyó que la tasa de mortalidad para las personas infectadas por estas cepas oscila entre 3 y 42% (36).

En Latinoamérica se reportó una investigación con este microorganismo en donde utilizaron antibiograma, vitek y PCR para tipificar cepas de aislados clínicos; se concluyó que el sitio de infección más afectado es el tracto urinario y que los lugares intrahospitalarios en donde posiblemente se contraen con mayor frecuencia cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* es en salas de

cirugía y en UCI (37). También se reportó que aproximadamente el 63% de estos casos tuvieron un tratamiento empírico inadecuado al no tener información veraz de que se encontraban frente a una cepa multirresistente, presentándose una mortalidad aproximada del 59% (37).

En Colombia, la Red de Vigilancia de Eventos Nosocomiales del Valle (RENOVA) llevó a cabo un análisis con la recolección de 123.798 aislamientos microbiológicos, el 48% correspondiente al servicio de consulta externa; encontrando que el 65% del total de las infecciones fueron causadas por enterobacterias. Afirman que *Klebsiella pneumoniae* se encuentra dentro de los aislamientos microbiológicos más prevalentes y además que el tipo de muestra donde se aísla más frecuentemente es en sangre y en muestras de tracto respiratorio bajo (17).

La Secretaría Distrital de Salud por medio del programa de vigilancia en salud pública menciona que *Klebsiella pneumoniae* hace parte de los agentes causales más frecuentemente aislados en IAAS tanto en unidad de cuidado intensivo como en los aislados clínicos en general de Bogotá ; en el año 2012 este microorganismo alcanzó una incidencia del 12% (38) y durante la época 2013-2014 *Klebsiella pneumoniae* se consideró nuevamente dentro de los microorganismos más frecuentemente aislados, especialmente en las UCI de cuidado neonatal y también se concluyó que la enfermedad mayormente encontrada fue la neumonía (39) . En el boletín epidemiológico de 2015 de la misma entidad, se reportó que continúa la prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* en UCI con una frecuencia del 14,2% y del 10,2% en no UCI, mostrando la importancia de este microorganismo a nivel de salud pública (5).

### **2.2.2. Patogenicidad**

*Klebsiella pneumoniae* es un microorganismo que coloniza principalmente la nasofaringe, el tracto urinario y en ocasiones el tracto gastrointestinal. Existen aspectos que favorecen su colonización como el ambiente hospitalario en condiciones sanitarias no aptas y el uso inapropiado de antibióticos de amplio espectro como la ciprofloxacina, es así como se han informado porcentajes de colonización en pacientes hospitalizados de 77% en materia fecal, 42% en las manos y 19% en la faringe (33). Este bacilo produce infecciones urinarias, bacteriemias, infección en heridas quirúrgicas, peritonitis y meningitis. Además de neumonía asociada a IAAS que afecta especialmente a adultos mayores, alcohólicos y pacientes con EPOC (30).

*Klebsiella pneumoniae* cuenta con la capacidad de resistir a la desecación en el medio ambiente y de sobrevivir en la piel por la cápsula hidrófila bacteriana que también ayuda a protegerse de la fagocitosis por los polimorfonucleares. Cuenta con adhesinas y fimbrias no flagelares constituidas por subunidades de proteínas poliméricas que le permiten adherirse. Posee antígeno O que la protege contra la muerte mediada por el complemento y presenta actividad de endotoxina que facilita su multiplicación en los tejidos del huésped. Además, secreta sideróforos que son quelantes del hierro, lo cual favorece a la bacteria porque puede atrapar tal nutriente para su crecimiento (33).

### **2.3. CEPAS ATCC**

Las siglas ATCC son derivadas del inglés *American type culture collection*; son cepas certificadas, con características definidas tanto fenotípicas como genotípicas y son empleadas generalmente para estudios de investigación, control de calidad, validación de nuevos métodos, control de reactivos y procedimientos en los laboratorios. Son útiles en diferentes campos del conocimiento cuando se quiere garantizar las características propias del microorganismo, y así evitar

realizar pruebas adicionales para identificar las cepas y cada característica que la compone, lo cual ayuda a ahorrar tiempo y recursos (40). Además, son recomendadas por la norma ISO 17025 para aspectos de trazabilidad en los insumos utilizados del laboratorio (41) . Generalmente, también son importantes para mantener el cepario, es decir, para organizar y conservar cepas de referencia que son previamente identificadas para brindar información confiable de las cepas puras. Su apropiado almacenamiento permite tener reproducibilidad de las características de las cepas tanto bioquímicas como morfológicas (40).

### **2.3.1. Cepas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC**

La cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 es utilizada para control de calidad en estudios de conservantes, para analizar susceptibilidad de antimicrobianos, pruebas para medios de cultivo, pruebas de alimentos e investigación, ya que es sensible a los antibióticos comúnmente utilizados para las infecciones por este patógeno. La ficha técnica del producto, menciona que es recomendable contar con un nivel de bioseguridad tipo 2 para su manipulación y para su almacenamiento se sugiere mantener en congelación a -80 °C (42).

La cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 es utilizada también para control de calidad, investigación especialmente para afecciones de tipo respiratorio y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Esta cepa fue aislada de la orina de un paciente hospitalizado en Richmond, VA en el año 1994. Se considera como cepa resistente porque tiene la característica de tener cambios en algunos de sus nucleótidos, que la hace ser productora de  $\beta$ -lactamasas gracias al gen SHV-18, lo cual genera resistencia a los antibióticos carbapenémicos y en su comportamiento antimicrobiano presenta sensibilidad intermedia a algunas cefalosporinas como por ejemplo a ceftazidima. En cuanto a su almacenamiento, se recomienda

mantener en congelación a -80 °C y además contar con un nivel de bioseguridad tipo 2 para su manipulación (43).

## **2.4. CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO**

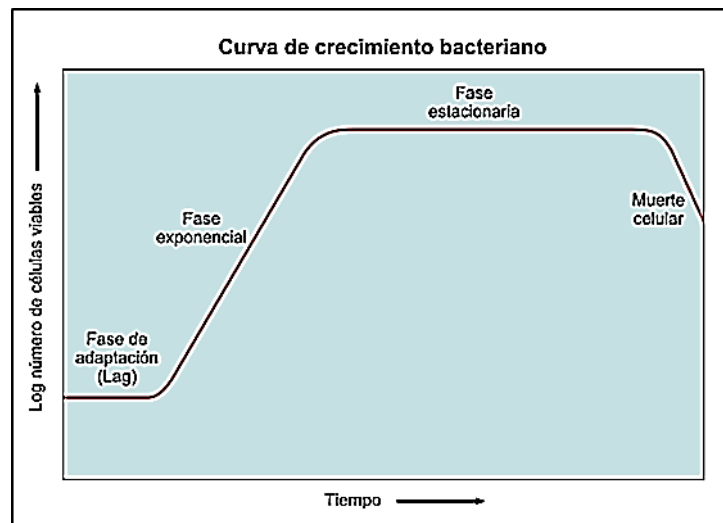
La curva de crecimiento bacteriano es una representación gráfica útil para conocer el comportamiento y desarrollo del microorganismo a lo largo del tiempo por medio de métodos turbidimétricos en donde la absorbancia medida en cada pozo se relaciona con el crecimiento de la bacteria y con esta información se determinan las diferentes fases de crecimiento (44). La medición por turbidez se utiliza para estudios de crecimiento bacteriano, ya que las bacterias absorben y dispersan la luz transmitida, lo cual ayuda a registrar los cambios turbidimétricos en un medio de cultivo líquido. Siendo la luz absorbida directamente proporcional a la concentración de bacterias presentes (44).

### **2.4.1. Fases de la cinética de crecimiento**

El crecimiento microbiológico está dado por el incremento del número de bacterias en una población de microorganismos que varía durante sus cuatro fases como se muestra en la figura 1.

Inicialmente se presenta la fase de latencia o también llamada fase lag, en la cual la población bacteriana se estabiliza y toma los nutrientes necesarios del medio, razón por la cual no hay crecimiento aparente y la bacteria sintetiza las enzimas necesarias para iniciar su actividad metabólica. Luego, ocurre la fase de crecimiento exponencial; en donde la velocidad de crecimiento es máxima hasta que se acumulan sustancias tóxicas en el ambiente y agotamiento de nutrientes

esenciales que inhiben el crecimiento. Seguidamente la bacteria llega a la fase estacionaria, donde hay cambios significativos en la cantidad de nutrientes del medio que desencadena control y regulación del crecimiento de la población bacteriana, y por último la fase de muerte celular en donde empieza a disminuir el número de células viables de manera progresiva y a su vez da inicio a la nueva generación (44).



**FIGURA 1.** Fases de la cinética de crecimiento bacteriano (45).

En la mayoría de estudios reportados sobre CIM y CBM la fase de crecimiento utilizada para su determinación es la estacionaria, debido a que es la fase más larga donde posiblemente la bacteria se mantiene constante en su crecimiento (46,47). Hay otros documentos que recomiendan tomar el inóculo en la fase exponencial (9) y también hay algunos reportes que no especifican la caracterización o cinética de crecimiento tomada en cuenta para cada bacteria, sino que se realiza un inóculo de 18-24 horas entre 35 – 37 °C independientemente de la cepa a trabajar (10–12).

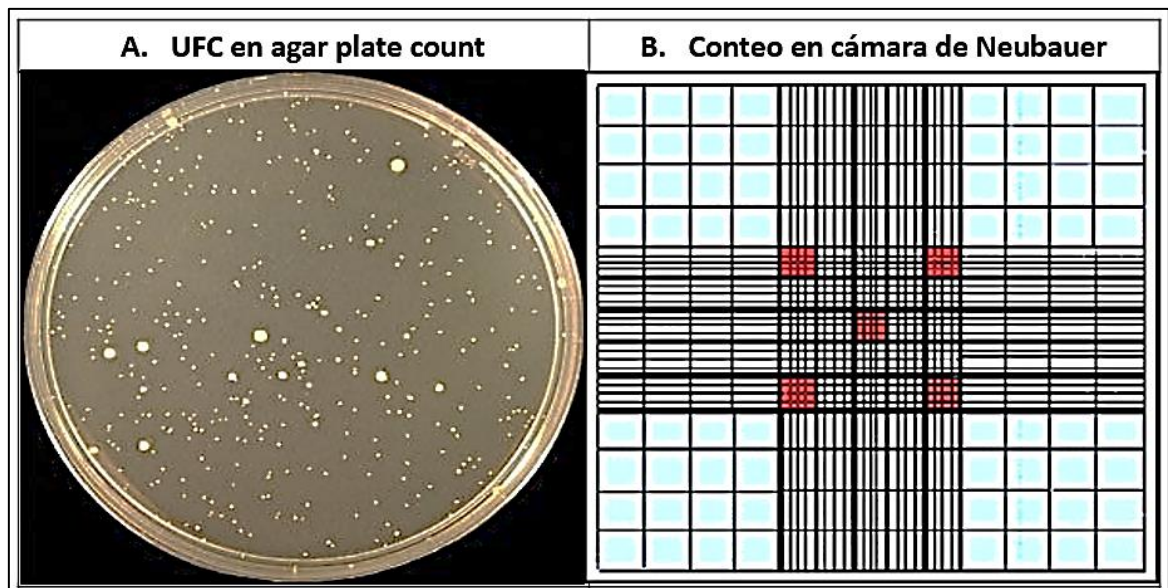
## 2.5. TÉCNICAS DE VIABILIDAD

Desde el punto de vista microbiológico, un microorganismo muere cuando pierde de forma irreversible su capacidad de dividirse, es decir, en el momento en que no es capaz de formar una colonia en el medio de cultivo porque no hay desarrollo metabólico y por lo tanto no necesita tomar nutrientes. De esta manera, las técnicas de viabilidad son importantes para determinar la población bacteriana que es capaz de dividirse y desarrollarse normalmente (48). Esta determinación se puede realizar por medio de recuentos en placa y por tinciones como el azul de tripán.

### **2.5.1. Recuento en placa**

Esta técnica permite tener un aproximado de la población bacteriana viable presente en la muestra, mediante la incubación de la placa con el medio sólido durante 18-24 horas a 35-37 °C. Al final de este periodo es posible ver la formación de UFC que posteriormente se cuentan manualmente. En la figura 2A se observa una caja de agar plate count una vez ha sido incubada y lista para el conteo manual. El agar plate count, contiene triptona y extracto de levadura utilizados como fuente de nitrógeno y vitaminas, además contiene glucosa como fuente de energía. Todo lo anterior para favorecer las condiciones de la bacteria y que la población viable pueda desarrollarse y crecer. Adicional a esto, el medio es transparente lo que facilita el recuento bacteriano. Esta técnica es recomendada para bacterias aerobias no exigentes (49).





**FIGURA 2.** Técnicas de viabilidad **A:** Se observan colonias claras en fondo negro para facilitar el conteo manual (49). **B:** Cuadrantes utilizados para el conteo bacteriano en la cámara de Neubauer (50).

### 2.5.2. Azul de tripán

El azul de tripán es un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir las bacterias muertas de color azul, es decir que no penetra en las bacterias vivas porque mantienen su membrana íntegra. Para esta técnica es necesario utilizar el microscopio y la cámara de Neubauer para facilitar su visualización y conteo. Una desventaja es que en ocasiones puede teñir también artefactos que no necesariamente sea población bacteriana (51) . En la figura 2B se observan los 5 cuadrantes coloreados en rojo, los cuales son recomendados para realizar el conteo manual.

## 2.6. INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN EN SALUD - IAAS

Una infección IAAS según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se define como “una infección contraída en el hospital de un paciente internado por una razón distinta a la que ingresó al servicio” y también comprende “las infecciones adquiridas en el hospital, pero manifiestas después del alta hospitalaria y aquellas infecciones que adquiere el personal sanitario”(52). Actualmente son de gran importancia a nivel de salud pública y por esta razón se han determinado algunos factores que propician la infección en los pacientes hospitalizados como por ejemplo la baja inmunidad de la persona causada por una enfermedad de base, las técnicas invasivas que crean posibles vías de infección y la transmisión de bacterias multirresistentes especialmente bajo condiciones de hacinamiento o prácticas inadecuadas por parte del personal de salud (52).

En Colombia, más específicamente en Neiva, se realizó una investigación sobre las situaciones de mayor riesgo para contraer IAAS utilizando 251 casos confirmados. Los procedimientos quirúrgicos fueron responsables del mayor número de infecciones, seguido de los dispositivos médicos como por ejemplo el catéter vesical. En el estudio se reportó una letalidad en los casos presentados del 9,5%, siendo la neumonía y las infecciones del torrente sanguíneo los de mayor proporción (24).

## **2.7. RESISTENCIA BACTERIANA**

Según la organización Sanitas Internacional la resistencia bacteriana hace referencia al rechazo parcial o total de las bacterias al efecto de los antibióticos, el cual puede ser generado por el uso no racional e indiscriminado de la sustancia antibacteriana. También mencionan que la multirresistencia de un microorganismo se define como la ausencia de sensibilidad o no respuesta a los fármacos. Adicionalmente, se habla de resistencia adquirida cuando una bacteria que inicialmente es sensible a los antibióticos se hace resistente porque adquiere

genes que le ayudan a producir plásmidos o enzimas que facilitan el rechazo a los antimicrobianos. Esta situación es preocupante ya que la inapropiada utilización de los antibióticos convencionales para controlar y tratar las infecciones bacterianas, pueden inducir la generación de resistencia y cada vez las terapias antibióticas responden de manera menos eficiente (53).

Anteriormente la industria farmacéutica modificaba la estructura química de las moléculas de los antibióticos que ya habían sido reconocidos por las bacterias, con el propósito de que las nuevas moléculas pudieran esquivar los mecanismos de resistencia que habían sido adquiridos por los microorganismos. Esta aproximación fue eficaz durante algunos años, pero las bacterias al cabo del tiempo desarrollaron nuevos mecanismos de resistencia a las moléculas antibióticas modificadas (19).

Un informe publicado en el año 2012 por el Ministerio de Salud de Perú, resalta la importancia de bacterias de origen intrahospitalario, relacionadas con la resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, las cuales fueron encontradas en casi el 50% de los pacientes hospitalizados, debido posiblemente a la presencia de cepas productoras de BLEE como mecanismo de resistencia (54).

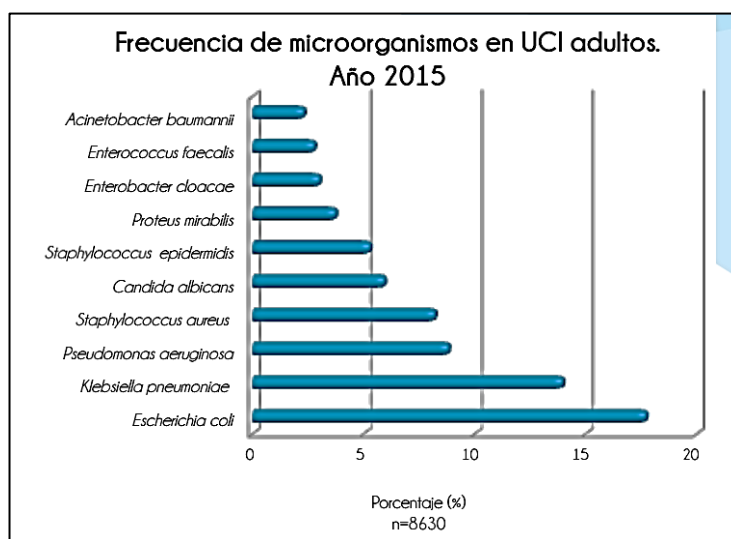
La generación de las resistencias bacterianas, son posiblemente atribuibles a modificaciones genéticas en el microorganismos que se generan a través del tiempo de forma natural, pero este proceso es severamente acelerado por el mal uso y abuso de los antimicrobianos porque son administrados sin supervisión profesional, por suministrar un tratamiento incompleto , un tratamiento no apropiado o cuando se trata de enfermedades que no se resuelven con antibiótico, como es el caso de las infecciones virales o para la prevención de enfermedades (55).

### **2.7.1. Resistencia de *Klebsiella pneumoniae***

Esta bacteria presenta resistencia natural a las aminopenicilinas (como la ampicilina) , debido a que dispone de una  $\beta$ -lactamasa cromosómica de clase A; pero además de esto, es frecuente encontrar cepas de *Klebsiella pneumoniae* que poseen genes o plásmidos de resistencia que les permiten codificar enzimas para modificar los antibióticos convencionales o evadirlos para continuar con la infección. Se conoce que KPC cada vez cuenta con mayores variaciones, lo cual dificulta su identificación y tratamiento. Estas cepas, tienen la capacidad de producir enzimas llamadas carbapenemasas para inactivar los antibióticos comúnmente conocidos como carbapenémicos (56). Las cepas también pueden contener otros genes que codifican enzimas modificadoras de antibióticos de tipo aminoglucósidos y algunas de ellas además pueden codificar plásmidos como QnrA y QnrB ( plásmidos contra las quinolonas), lo que resulta en una susceptibilidad reducida a las fluoroquinolonas, ya que las otras familias de antibióticos posiblemente puedan no ser eficientes porque las cepas contienen genes que codifican para enzimas de resistencia (56).

En un estudio realizado en el año 2014 en Colombia, fueron incluidos 13 clínicas y hospitales de alta complejidad. En este estudio; se reportó un perfil de resistencia bacteriana promedio a ceftazidima y ceftriaxona del 32% en pacientes de UCI y hospitalización. Específicamente afirman que *Klebsiella pneumoniae* presentó un 35% de resistencia promedio en UCI y salas de hospitalización general, 25% en servicios de urgencias y hasta el 15% en servicios de consulta externa a cefalosporinas de tercera generación; sumando a ello que el perfil de resistencia a los carbapenémicos incrementó hasta un 2,7% para ertapenem, imipenem y meropenem desde el año 2010 a 2012 (17). En el año 2015, el grupo GREBO realizó un estudio publicado en 2016 en donde se mostró la frecuencia de

microorganismos mayormente aislados en UCI de adultos. En la figura 3, se observa que *Klebsiella pneumoniae* se encuentra dentro de los microorganismos más frecuentemente aislados, pues ocupa el segundo lugar, luego de *Escherichia coli*.



**FIGURA 3.** Resultados de vigilancia en resistencia bacteriana del año 2015 (57).

Así mismo, se observó un incremento en el porcentaje de aislamientos resistentes a carbapenémicos del 5,9% en 2014 y del 13,7% en 2015, lo cual es un hecho que impacta negativamente en el pronóstico de los pacientes, aumentando la mortalidad y la estancia hospitalaria. Por esta razón es importante establecer planes locales, regionales y nacionales para disminuir su diseminación, aumentando las buenas costumbres en la comunidad como la higiene de manos e implementando precauciones de contacto a todos los pacientes infectados o colonizados por estas bacterias; además de generar estrategias de uso prudente de antibióticos (57).

## 2.8. ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN INFECCIONES POR *Klebsiella pneumoniae*

En vista que actualmente gran cantidad de cepas de este microorganismo muestran resistencia frente a los antimicrobianos comúnmente utilizados como la amikacina, gentamicina, rifampicina, cloranfenicol o ciprofloxacina, últimamente se ha recurrido a la tigeciclina, colistina y polimixina, como alternativa para el tratamiento de las infecciones causadas por patógenos resistentes a múltiples fármacos, los cuales no están bien identificados ni caracterizados (56).

En una investigación realizada en el año 2012, se encontró que el mal uso de antimicrobianos acelera de manera considerable la resistencia presentada por *Klebsiella pneumoniae*. En el artículo, se reportó que existe una asociación entre la infección por *Klebsiella pneumoniae* multirresistente y el uso frecuente de carbapenémicos, al que se atribuye un cambio en la microbiota intestinal, lo cual favorece la presencia de microorganismos patógenos como los productores de BLEE, porque estos desplazan la flora normal presente en el intestino. Es importante realizar el uso racional de antimicrobianos como se evidenció en un estudio realizado en el año 2001 en Barcelona, en el cual se demostró que la restricción en el uso de las cefalosporinas de espectro extendido en UCI permitió controlar un brote causado por KPC (58).

### **2.8.2. Ciprofloxacina**

La ciprofloxacina es un antibiótico perteneciente al grupo de las quinolonas, más específicamente es una fluoroquinolona de amplio espectro que actúa inhibiendo la ADN girasa, enzima que cataliza el superenrollamiento del ADN cromosómico que contribuye a una adecuada división celular. Se considera una fluoroquinolona de segunda generación y presenta mayor actividad sobre los microorganismos Gram negativos (59). Este antibiótico se utiliza en infecciones bacterianas de tipo dérmico, pulmonar, de tracto urinario y conjuntivitis; mediante administración vía oral o intravenosa (60). Según el informe del Ministerio de Protección Social de

Colombia, en el año 2007, cepas salvajes de *Klebsiella pneumoniae* presentaron resistencia a ceftazidima y sensibilidad intermedia a ciprofloxacina (61).

## **2.9. MÉTODOS DE DILUCIÓN**

Son metodologías aplicadas con el fin de observar la susceptibilidad bacteriana a determinada molécula. Para esto es importante estandarizar la concentración bacteriana a utilizar con el ánimo de evitar un crecimiento que dificulte el análisis de los resultados, por lo cual se recomienda utilizar una concentración de bacterias equivalente a la escala de 0,5 Mc Farland, que en absorbancia equivale a 0,08-0,110 a una longitud de onda de 620 nm (9,16).

Mediante estas metodologías se realiza la determinación de la concentración bactericida mínima (CBM), derivada de su sigla en inglés MBC ( *Mínimum Bactericidal Concentration*) y de la concentración inhibitoria mínima (CIM) derivada de su sigla en inglés MIC ( *Mínimum Inhibitory Concentration*) (47).

### **2.9.2 CIM y CBM**

La concentración mínima inhibitoria corresponde a la concentración más baja de molécula antimicrobiana que es capaz de impedir el crecimiento de la población bacteriana, CIM<sub>50</sub> corresponde a la concentración de antimicrobiano que inhibe el 50% de la población bacteriana y CIM<sub>90</sub> corresponde a la concentración de antimicrobiano que inhibe el 90% de la población bacteriana. Para realizar esta determinación, se incuba una cantidad conocida de bacteria con diluciones seriadas específicas del agente antimicrobiano para observar en donde se obtiene la inhibición de la población bacteriana. Generalmente se utiliza el CBM como estudio complementario y hace referencia a la mínima cantidad de molécula

antibacteriana capaz de destruir el 99,9% de la población bacteriana en condiciones de temperatura de 35-37°C (9,13).

En el año 2013 se llevó a cabo una investigación acerca de la actividad antibacteriana con aceites de importancia a nivel cosmético y se realizó la determinación de CIM y CBM, utilizando para la obtención del inóculo inicial una incubación de 24 horas, sin tener en cuenta la cinética de crecimiento propia de la cepa en estudio (12). En el año 2017, se realizó un estudio en hongos para determinar la CIM de algunas moléculas con actividad antifúngica en cepas causantes de esporotricosis; para realizar esta determinación se utilizó un inóculo de 48-72 horas incubado a 35°C para todas las cepas estudiadas siguiendo las directrices de la CLSI (18).



### 3. DISEÑO METODOLÓGICO

**Tipo de diseño:** Experimental

**Universo:** Cepas de *Klebsiella pneumoniae*

**Población:** Cepas bacterianas ATCC de *Klebsiella pneumoniae*

**Muestra:** *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

#### 3.1. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

##### 3.1.1. Activación de las cepas ATCC

Las cepas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (que para este trabajo se nombrará como *Kp 83*) y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (que en este caso se llamará *Kp 03*) fueron obtenidas comercialmente. Cada empaque venía sellado herméticamente y la presentación del producto se conoce como Kwik stik. Luego de romper la ampolla y reconstituir el microorganismo liofilizado, se impregnó el hisopo con la suspensión bacteriana para ser sembrado masivamente en agar enriquecido; para este caso se utilizó agar TSA en su activación. Posterior a eso, se incubó de acuerdo a las condiciones de crecimiento durante 18-24 horas en aerobiosis a 35-37°C para observar la morfología de las colonias.

##### 3.1.2. Características macroscópicas de las colonias

Una vez las cepas estaban activadas en el agar TSA, se procedió a realizar varios pases en dicho medio de cultivo con el fin de obtener colonias aisladas; para el

caso de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 se realizaron 3 pases adicionales y para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 fue necesario realizar 2 pases a partir de la cepa activada para el mismo fin. De esta manera se pudo realizar la descripción morfológica macroscópica de las UFC de cada cepa y establecer si era posible diferenciarlas.

### **3.1.3 Coloración de Gram**

Con las colonias aisladas que se obtuvieron se realizó una coloración de Gram para cada cepa, teniendo en cuenta los tiempos para cada colorante según la estandarización previamente realizada por el grupo de investigación en estudios anteriores.

### **3.1.4. Criopreservación de las cepas ATCC**

Con el fin de conservar y mantener las cepas en su pase original, se utilizaron Cryobank, que son viales con perlas de cerámica suspendidas en una solución de preservación criogénica y se inoculó un vial por cada cepa; cada vial contiene aproximadamente 64 perlas y se mantuvieron en congelación a una temperatura menor a -20 °C. A partir de la cepa original, cada 5 pases se tomaba una nueva perla para evitar variaciones morfológicas, metabólicas o de comportamiento de las cepas en estudio y se realizaba la reactivación para obtener las cepas de trabajo.

### **3.1.5. Determinación de la cinética de crecimiento en tubo**

Inicialmente se tomó un tubo que contenía 8 ml de caldo Mueller-Hinton (MH) y se tomaron UFC de las cepas previamente activadas en TSA con el asa metálica para obtener un inóculo, homogeneizando la suspensión para ajustar a 0,5 Mc

Farland por espectrofotometría (0.08-0.110) con longitud de onda de 620 nm; lo cual equivale a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml (16). Cada hora, durante 12 horas se tomaron 300  $\mu$ l de la suspensión previamente agitada en vórtex por 10 segundos y se dispensó en tres pozos de la placa de 96 pozos para realizar la medición en el lector de placas con una agitación nuevamente de 10 segundos.

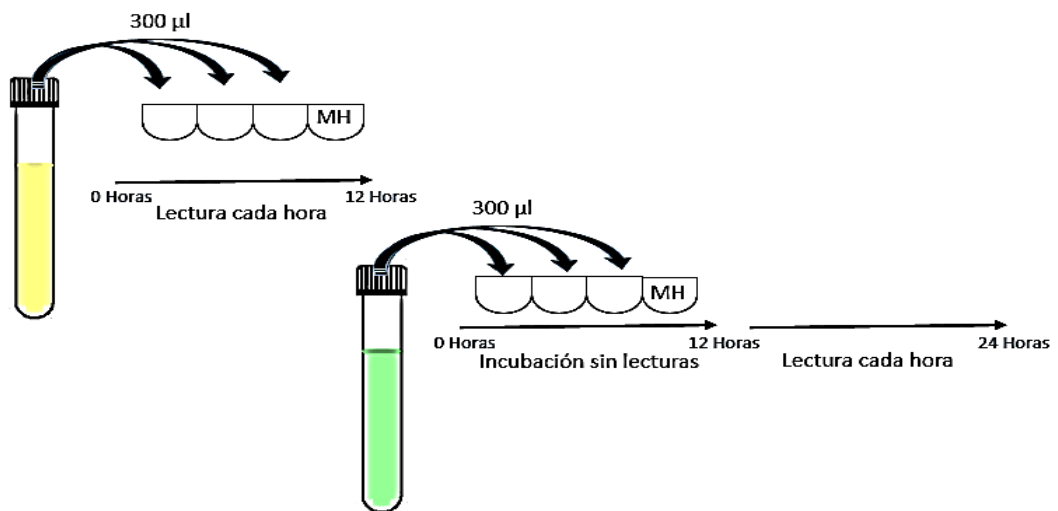
Adicional a esto, se tuvo en cuenta un control de calidad del caldo MH dispensando 300  $\mu$ l en un pozo y midiendo la lectura de cada hora junto con los inóculos a evaluar. Cabe mencionar que este ensayo fue realizado por triplicado, bajo las mismas condiciones para ambas bacterias y en cabina de flujo laminar para evitar cualquier contaminación.

En este ensayo se hizo una variación al medir en el lector de placas con y sin la tapa de la placa. Todos los resultados obtenidos hora tras hora de las absorbancias en cada pozo se guardaron para luego hacer gráficas que permitieran ver de una manera clara el comportamiento de cada cepa, dado que en cada hora se medía la absorbancia de 3 pozos se tomaba promedio de los datos para graficar la media correspondiente.

### **3.1.6. Determinación de la cinética de crecimiento en placa**

En este ensayo se preparó el inóculo inicial y se utilizó la misma longitud de onda en el lector de placas como se explicó en el numeral 3.1.5; al tener el inóculo ajustado a 0,5 Mc Farland se tomaron 300  $\mu$ l de la suspensión previamente homogeneizada, para luego depositar dicho volumen en 3 pozos de la placa. Esta placa fue incubada y leída cada hora durante 12 horas en el lector de placas para obtener las absorbancias necesarias para la construcción de la gráfica. En este caso, también se realizó la variación en el espectrofotómetro midiendo con y sin la tapa de la placa y se tuvo en cuenta el control del medio MH.

Posteriormente en otro ensayo, se realizó una cinética de crecimiento bacteriano en placa con una duración total de 24 horas; siguiendo el mismo procedimiento anteriormente mencionado, leyendo cada hora la placa sin tapa y con 10 segundos de agitación en el equipo. Para este ensayo, se hizo la medición cada hora durante 12 horas leyendo la placa, al finalizar este tiempo se realizó un nuevo inóculo con una absorbancia muy similar al que se utilizó en la medición de 0 a 12 horas. Y posteriormente se dejó incubando durante 12 horas. Al día siguiente se realizaron las lecturas correspondientes al intervalo de 12 a 24 horas; como se ilustra en la figura 4.



**FIGURA 4.** Cinética de crecimiento bacteriano durante 24 horas. El primer inóculo se utilizó para medir las lecturas de 0 a 12 horas; pasado este tiempo se ajustó un segundo inóculo el cual fue incubado durante 12 horas y luego se utilizó para medir las lecturas correspondientes a las 12-24 horas. Para ambos inóculos se colocó el control de medio MH y este mismo procedimiento se tuvo en cuenta para cada cepa en estudio.

Luego de esto, se realizó un ensayo adicional midiendo las absorbancias durante 36 horas consecutivas, utilizando un solo inóculo para todo el estudio. Las absorbancias resultantes de la medición hora tras hora se utilizaron para graficar de tal forma que se ilustrara el comportamiento de cada cepa.

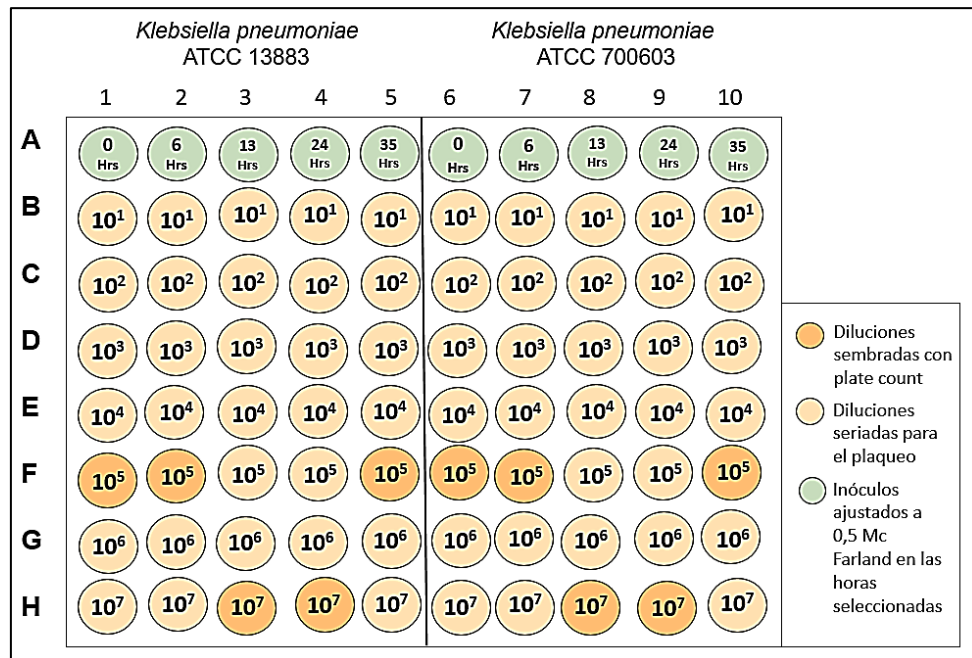
### **3.1.7. Ensayo preliminar para evaluar viabilidad bacteriana**

Para estas técnicas, se realizaron ensayos por duplicado igualmente ajustando los inóculos a 0,5 Mc Farland por espectrofotometría (0.08-0.110) en caldo MH incubado a 37 °C, se midió a una longitud de onda correspondiente a 620 nm con agitación de 10 segundos para homogeneizar la suspensión. Inicialmente, se utilizaron volúmenes de 100 µl, 200 µl y 300 µl.; posteriormente se sembró en profundidad con el agar plate count y se incubó a 37 °C por 18-24 horas. Al día siguiente, se procedió a sacarlas del incubador y realizar el conteo manual de las UFC.

### **3.1.8. Técnica de plaqueo manual**

En este ensayo se trabajó con un volumen de inóculo correspondiente a 200 µl previamente ajustado como se indicó anteriormente y seguidamente se incubó para obtener de un mismo tubo inóculos correspondientes a 0, 6, 13, 24 y 35 horas. A medida que se obtenían, se ajustaban nuevamente a 0,5 Mc Farland y con cada uno de ellos se realizaron diluciones seriadas con solución salina al 0,9% teniendo en cuenta la curva de calibración resultante de estudios anteriores dentro del grupo de investigación para establecer el número aproximado de diluciones que debían hacerse para obtener colonias contables. Todas las lecturas se realizaron a 620 nm en el lector de placas, con agitación de 10 segundos en el equipo y realizando la lectura sin tapa. A medida que se fue estandarizando la técnica, se estableció un rango de absorbancia más reducido dentro de lo estipulado en la escala Mc Farland para ajustar el inóculo. Se realizó el ensayo

con 100 µl de inóculo y además se realizó control de la solución salina utilizada en las diluciones. Y se utilizó el lector de placas para guiar los pozos recomendados a plaquear y realizar la siembra por profundidad con agar plate count con el fin de obtener un conteo de UFC contables para todos los inóculos. La distribución de la placa utilizada para este ensayo, una vez fueron establecidas las diluciones necesarias para cada inóculo se ilustra en la figura 5.



**FIGURA 5.** Distribución de la placa para ensayo de plaqueo

### 3.1.9. Viabilidad con azul de tripán

Para iniciar se preparó la solución de azul de tripán a una concentración del 1%, luego se desarrolló el ensayo con los mismos inóculos del ensayo del plaqueo, ajustando cada uno de manera individual con caldo MH a escala de 0,5 Mc Farland, con la longitud de onda de 620 nm. Después se realizaron diluciones seriadas con solución salina al 0,9% para establecer una concentración adecuada que permitiera observar bacterias contables. Para la estandarización de la técnica en este trabajo fue necesario utilizar el lector de placas al finalizar el tiempo de

incubación con el fin de guiar los pozos recomendados a observar microscópicamente con azul de tripán y también teniendo en cuenta las diluciones estandarizadas en el ensayo del plaqueo. En la figura 6, muestra la distribución de la placa utilizada para el ensayo de viabilidad con azul de tripán.

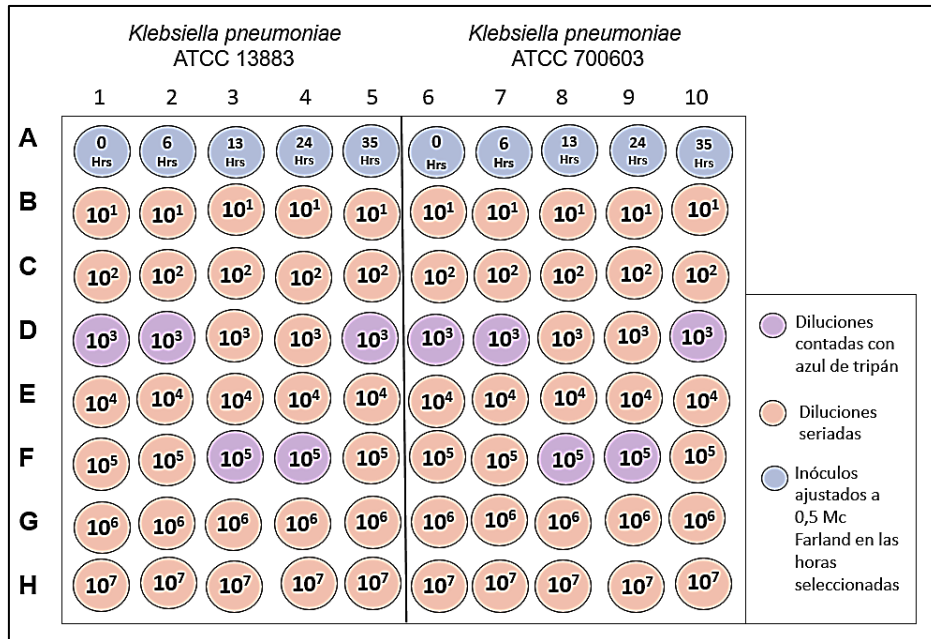


FIGURA 6. Distribución de la placa para el ensayo con azul de tripán

Al momento de utilizar la cámara de Neubauer en el microscopio, se realizó una dilución a la mitad, tomando 10 µl de la dilución realizada con 10 µl del azul de tripán y en la cámara únicamente se colocaban 10 µl de esa suspensión para hacer el conteo manual en el microscopio con el objetivo de 40x. Se contaron las bacterias vivas, bacterias muertas y número total de bacterias encontradas en los 5 cuadros recomendados para realizar el conteo (50); para determinar la población presente en cada inóculo se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$UFC\ total = \frac{Promedio\ del\ conteo\ total * 2 * dilución\ utilizada\ en\ el\ inóculo}{4 \times 10^{-6}}$$

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{(\text{Promedio del conteo total} - \text{promedio de bacterias no viables})}{\text{Promedio del conteo total}} * 100$$

$$\% \text{ mortalidad} = \frac{\text{Promedio de bacterias no viables}}{\text{Promedio del conteo total}} * 100$$

### **3.1.10. Determinación de CIM con ciprofloxacina**

La ciprofloxacina se adquirió comercialmente a una concentración de 10 mg/ml en solución inyectable. Luego se realizaron los cálculos necesarios para obtener soluciones de antibiótico a una concentración de 32 µg/ml y 16 µg/ml que según estudios anteriores realizados en el grupo de investigación es la concentración suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano.

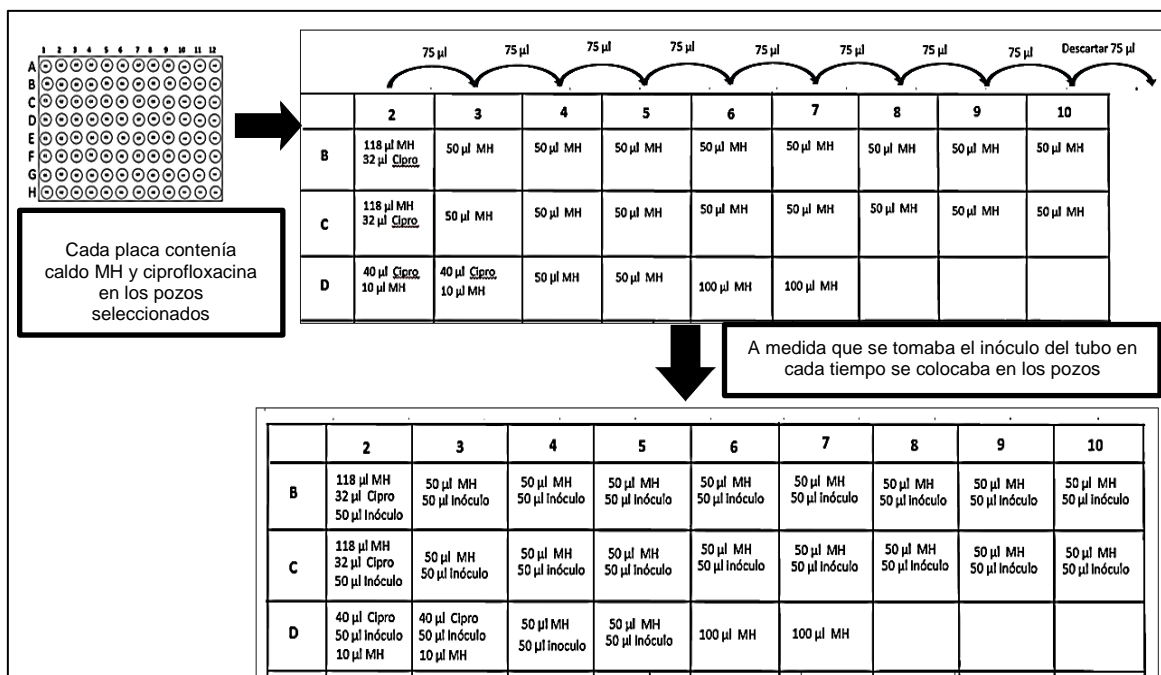
Este estudio se realizó por triplicado para cada inóculo en ambas cepas. En el ensayo donde se permitió el desarrollo bacteriano en placa se utilizó una concentración inicial de ciprofloxacina de 32 µg/ml y se realizaron diluciones seriadas a la mitad con 100µl, teniendo en cuenta los respectivos controles: positivo (con el antibiótico), negativo (sin el antibiótico) así como también control del medio (MH). Con el fin de obtener mayor volumen de inóculo inicial la suspensión bacteriana fue ajustada a 0.5 Mc Farland en un tubo de 45 ml con caldo MH. Para la siembra de las placas se tomaron de este tubo 50 µl requeridos en cada pozo desde la hora 0 y a medida que se cumplían las 0, 6,13 y 24 horas de desarrollo bacteriano en cada pozo seleccionado se adicionaba la ciprofloxacina para luego realizar las diluciones seriadas como lo ilustra la figura 7. Las placas una vez eran sembradas se incubaron de 18-24 horas y se midió su absorbancia en el lector de placas.



	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>B</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
<b>C</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
<b>D</b>	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			

**FIGURA 7.** Esquema de los pozos utilizados en el ensayo para determinar CIM en placa. En la fila D se observan los pozos correspondientes a los controles utilizados en los cuales no se realizaron diluciones. En la fila B y C se ilustran las diluciones seriadas, ensayo que fue realizado por duplicado para mayor reproducibilidad.

Para determinar el efecto en la CIM al permitir el crecimiento y desarrollo bacteriano en tubo se utilizó una concentración inicial de 16 µg/ml de ciprofloxacina. Las placas fueron incubadas desde la hora 0 con el caldo MH y la ciprofloxacina depositados en los respectivos pozos y se realizaron las diluciones seriadas del antibiótico antes de colocar los 50 µl de inóculo en cada pozo. Con el fin de obtener mayor volumen de inóculo inicial la suspensión bacteriana fue ajustada a 0,5 Mc Farland en un tubo de 45 ml con caldo MH desde la hora 0 y así cuando el inóculo llevara 0, 3 ,6 ,13 y 24 horas de desarrollo bacteriano poder tomar el volumen requerido de este mismo tubo ya que se agitaba para homogeneizar la suspensión y se agregaban los microlitros de inóculo a cada pozo. Luego de finalizar la siembra en cada placa se incubaron de 18-24 horas y se midió su absorbancia en el lector de placas. En la figura 8 se muestra la metodología utilizada para este ensayo en tubo.



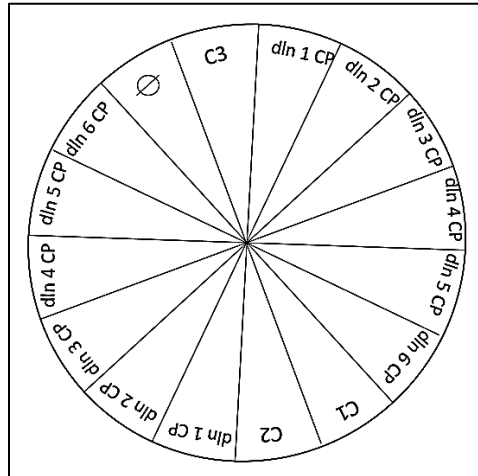
**FIGURA 8.** Esquema de los pozos utilizados para determinar CIM con el desarrollo bacteriano en tubo. En la fila D se observan los pozos correspondientes a los controles utilizados en donde no se realizaron diluciones. En la fila B y C se ilustran las diluciones seriadas, ensayo que fue realizado por duplicado para mayor reproducibilidad.

### 3.1.11. Determinación de la CBM con la ciprofloxacina

Este ensayo fue realizado como estudio complementario a la determinación de la CIM, motivo por el cual para este caso se tuvo en cuenta la lectura resultante de la placa de la CIM de cada inóculo luego de haberse incubado de 18 a 24 horas para observar según la turbidez emitida en cada pozo en cuál dilución ocurría la CIM y en donde posiblemente estaba la CBM.

Luego de esto, se procedió a sembrar en las cajas de agar MH por agotamiento los pozos desde donde se observó disminución de la turbidez entre una dilución y la siguiente. En cada caja de petri también se sembró por agotamiento el control positivo con ciprofloxacina (C1), control negativo sin el antibiótico (C2), control del caldo MH (C3) y control del agar MH utilizado (Ø), como se ilustra en la figura 9.

Estas cajas se incubaron de 18-24 horas en aerobiosis a 35-37 °C y luego se realizó la lectura observando crecimiento o inhibición en cada concentración de ciprofloxacina utilizada.

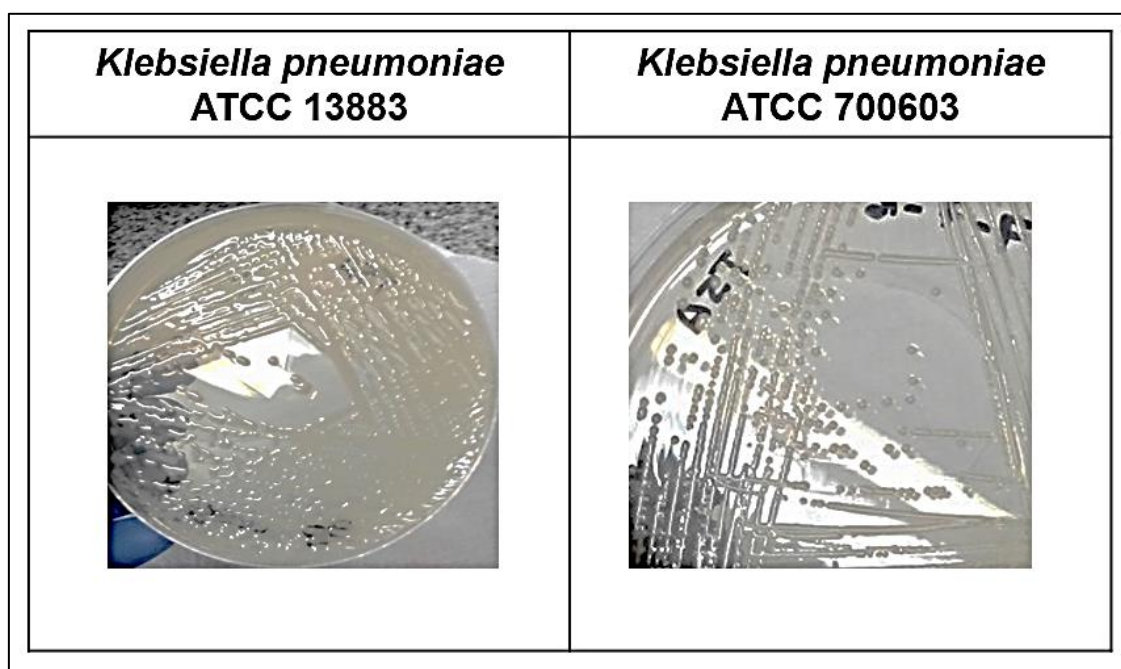


**Figura 9.** Distribución de la caja de petri para determinación de CBM

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS ATCC

En ambas cepas se observó crecimiento en el agar TSA, visualizando colonias con características de único crecimiento morfológico de aspecto mucoso, brillantes y color crema compatibles con las características reportadas para *Klebsiella pneumoniae*, como se ilustra en la figura 10.

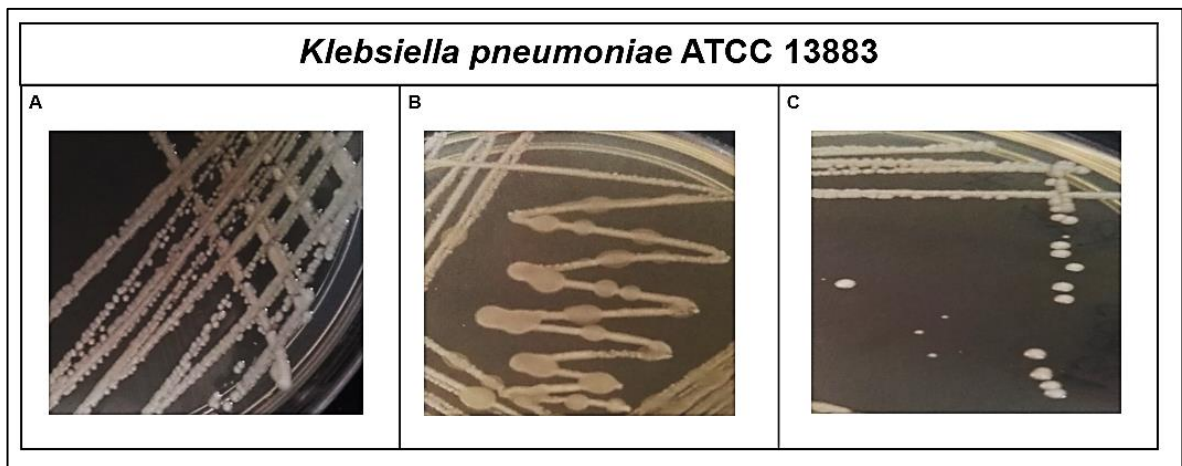


**FIGURA 10.** Activación de las cepas de trabajo ATCC

### 4.2. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS COLONIAS

#### 4.2.1. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883

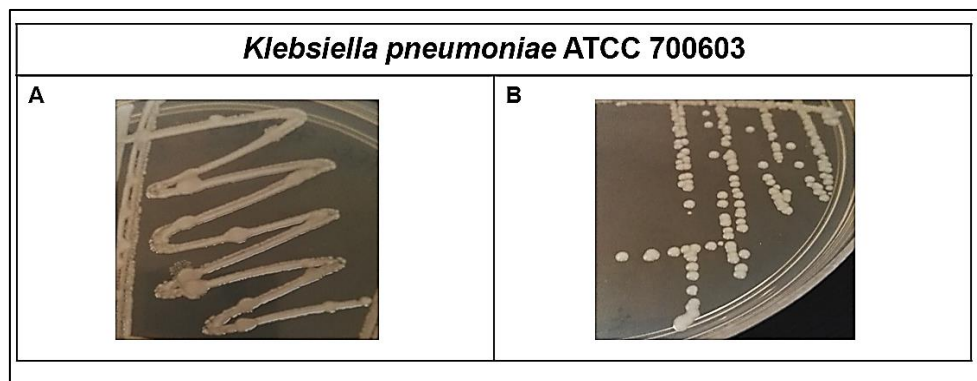
Al realizar los pases correspondientes, se observaron colonias redondas, brillantes y de tamaño variable en las UFC, la figura 11 ilustra cada pase realizado.



**FIGURA 11.** Visualización macroscópica de las colonias de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. **A:** Primer pase. Colonias de tamaño mediano, redondas, color crema y brillantes. **B:** Segundo pase. Colonias de tamaño variable, brillantes, de aspecto mucoso y color crema. **C:** Tercer pase. Colonias de tamaño mediano, brillantes, redondas y de color similar a las mencionadas anteriormente.

#### 4.2.2. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

En esta cepa se observaron colonias redondas, brillantes y color crema de tamaño mediano en la mayoría en las UFC, la figura 12 ilustra cada pase realizado.



**FIGURA 12.** Pases realizados para obtener colonias aisladas para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. **A:** Primer pase. Se observan colonias de color crema y mucosas. **B:** Segundo pase. Se observan colonias brillantes y ligeramente elevadas, de aspecto mucoso y color crema.

### 4.3. COLORACIÓN DE GRAM

Se observaron bacilos Gram negativos cortos para ambas cepas bacterianas de *Klebsiella pneumoniae* como se ilustra en la figura 13.

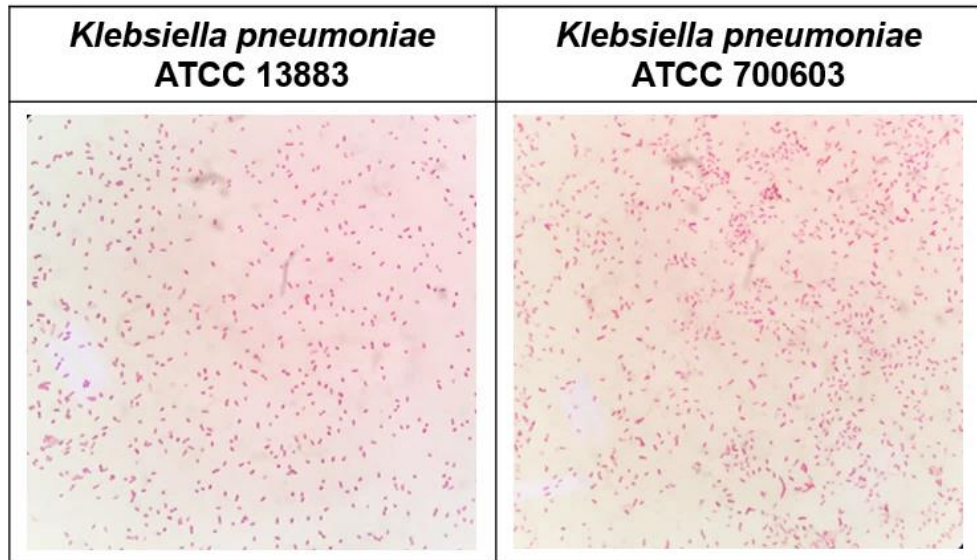


FIGURA 13. Coloración de Gram para las dos cepas en estudio

### 4.4. CRIOPRESERVACIÓN DE CEPAS ATCC

Se realizó la criopreservación en cryobank correspondiente a cada cepa bacteriana debidamente marcada, como se observa en la figura 14.



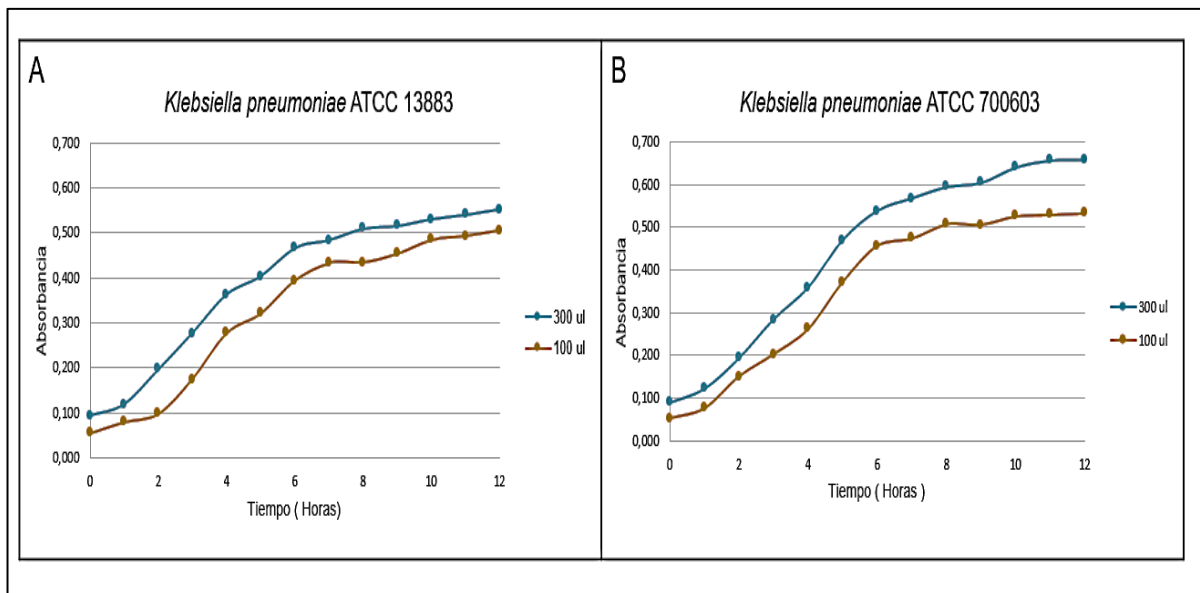
FIGURA 14. Criopreservación de cada cepa

## **4.5. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN TUBO**

### **4.5.1. Ensayo utilizando 100 o 300 µl de inóculo durante 12 horas de incubación**

En este ensayo, el objetivo era conocer si el volumen del inóculo afecta la cinética de crecimiento de cada cepa, en cuanto a la duración de la fase de latencia y exponencial. Para esto se graficaron los valores obtenidos de absorbancia en función del tiempo.

En la figura 15 se observa que *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 alcanza mayores valores de absorbancia que *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883; además, se evidencia que el volumen de inóculo utilizado sí afecta el valor de la absorbancia, pero que el comportamiento de la bacteria es similar en referencia a cada una de las fases de crecimiento. Cabe mencionar que en el control de medio MH no se observó crecimiento ni contaminación durante las lecturas realizadas en el periodo del ensayo.



**FIGURA 15.** Efecto del volumen de inóculo en la cinética de crecimiento en tubo durante 12 horas. Cada punto graficado corresponde a la media de las lecturas realizadas en los tres pozos.

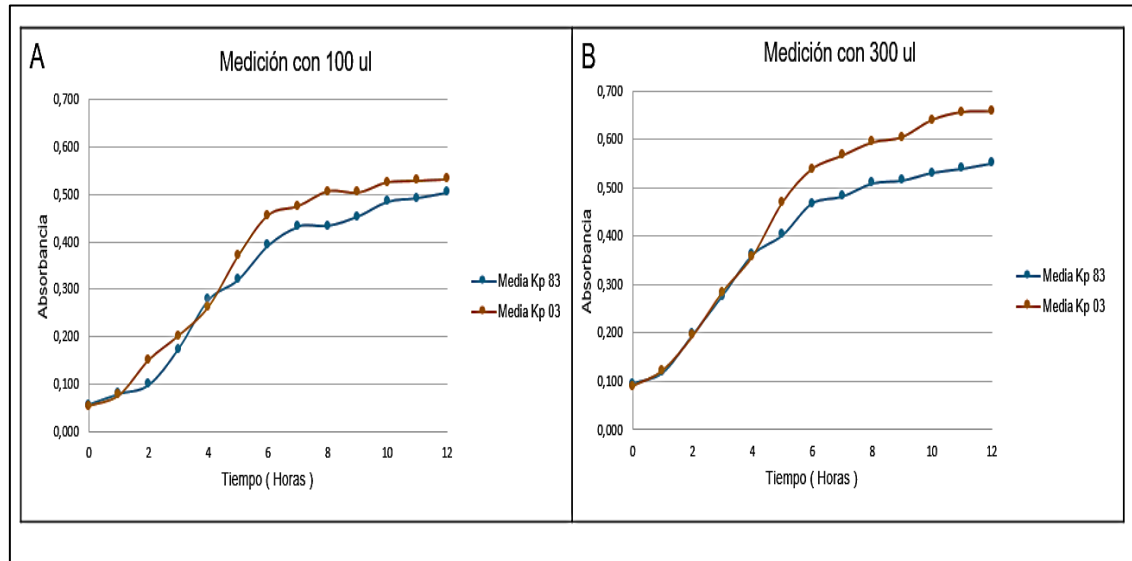
#### 4.5.2. Ensayo utilizando 100 o 300 µl de inóculo durante 12 horas de incubación, para determinar el tiempo de la fase de latencia y exponencial de cada cepa

En este caso, con el fin de conocer el momento en el cual iniciaba y terminaba la fase de latencia y la fase exponencial, se tomaron los mismos datos del ensayo anterior y se graficó la media de las absorbancias obtenidas cada hora para cada cepa como se ilustra en la figura 16. Se puede observar que *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 alcanza mayores absorbancias que *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Sin embargo, el comportamiento hora tras hora es similar entre ambas cepas, así que posiblemente su fase de latencia y exponencial oscile dentro del mismo periodo de tiempo.

En la figura 16 se observa que el resultado obtenido en el ensayo para ambas cepas en cuanto al tiempo aproximado de la fase de latencia es entre la hora 0 y la hora 1 o 2, y la fase exponencial para ambas cepas ocurre entre la hora 2 y la



hora 7 u 8. Por lo cual se puede ver que la duración en las fases analizadas es similar independientemente del volumen de inóculo empleado.

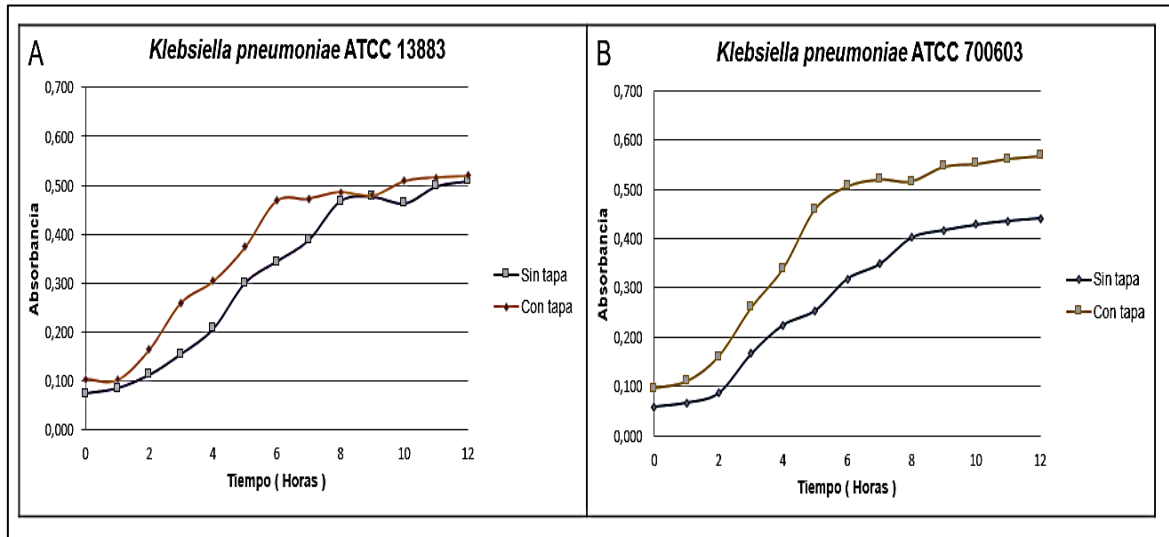


**FIGURA 16.** Ensayo durante 12 horas con 100 o 300  $\mu$ l para establecer el tiempo de la fase de latencia y exponencial. Cada punto graficado corresponde a la media de las lecturas realizadas en los tres pozos.

#### 4.5.3. Cinética de crecimiento en tubo realizando la lectura de la placa con y sin tapa

En este ensayo se realizó una variación, porque al momento de leer la absorbancia se midió con y sin la tapa de la placa de 96 pozos. Posteriormente se registraron las absorbancias de manera independiente con el fin de graficar y observar si la tapa podría generar alguna interferencia en la medición. Los resultados obtenidos se graficaron como se ilustra en la figura 17 y se observó que sí hay una notoria diferencia entre medir con y sin tapa; porque al realizar la lectura con tapa se aprecia que ambas cepas de *Klebsiella pneumoniae* alcanzan una mayor absorbancia en los valores hora tras hora y además se observa que la fase exponencial inicia en la primera hora y finaliza a las 6 horas, es decir más

pronto que cuando se realiza la medición sin tapa en donde la fase exponencial inicia a las 2 horas y finaliza hacia las 8 horas de incubación.



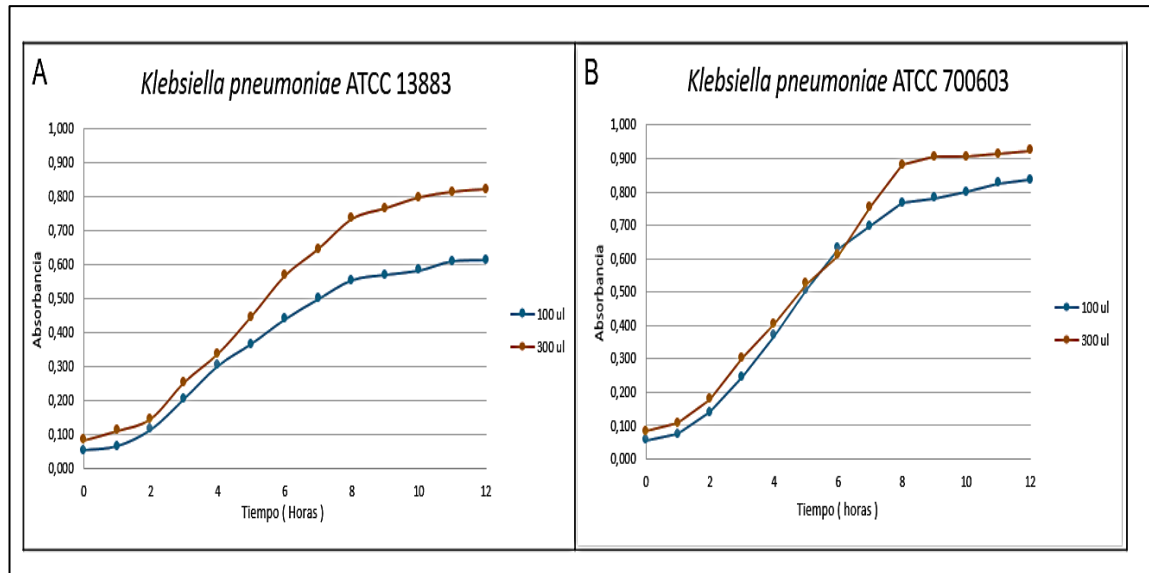
**FIGURA 17.** Ensayo en tubo leyendo la placa con y sin tapa para ambas cepas durante 12 horas. Cada punto graficado corresponde a la media de las lecturas realizadas en los tres pozos.

#### 4.6. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN PLACA

##### 4.6.1. Ensayo utilizando 100 o 300 µl de inóculo durante 12 horas de incubación en placa

Tal y como se realizó con el ensayo en tubo descrito en el numeral 4.5.1. , el primer ensayo consistió en saber si el volumen del inóculo tenía efecto en la lectura de absorbancia y en el comportamiento de las cepas a lo largo de las fases de crecimiento. Al realizar la lectura de la placa cada hora durante 12 horas consecutivas se obtuvo los valores de absorbancia ilustradas en la figura 18, en donde se muestra en cada punto la media obtenida de los 3 pozos medidos cada hora y se aprecia que el volumen del inóculo sí arroja absorbancias diferentes pero el comportamiento en ambas cepas en cuanto a su crecimiento es similar.

Es importante mencionar que *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 alcanza mayores absorbancias que *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 al igual que en el ensayo en tubo; sin embargo no se afecta el comportamiento general de las cepas al modificar el volumen del inóculo, motivo por el cual se decidió realizar los siguientes ensayos únicamente con 300 µl.

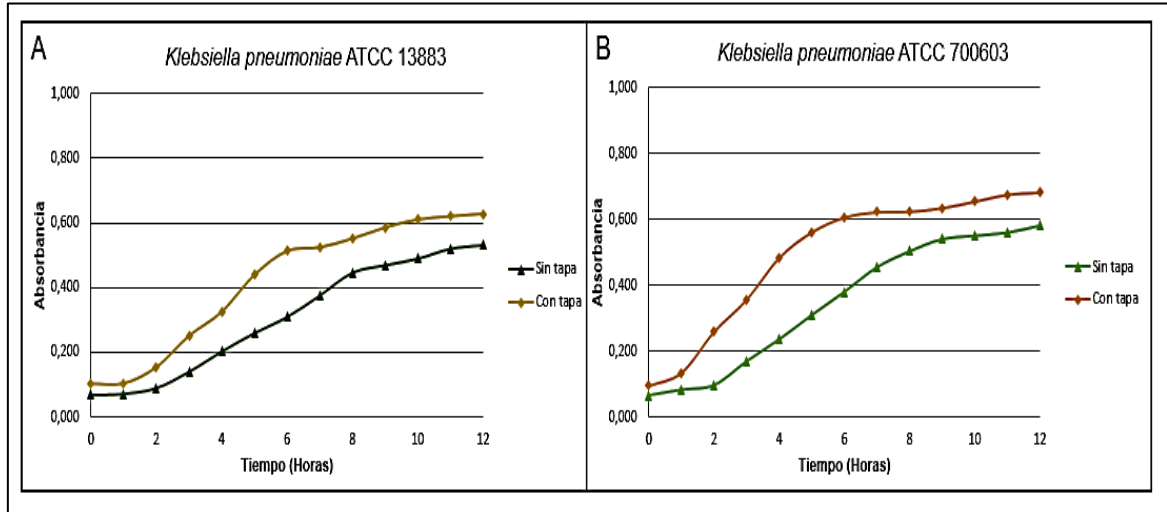


**FIGURA 18.** Efecto del volumen de inóculo en la cinética de crecimiento en placa durante 12 horas. Cada punto graficado corresponde a la media de tres lecturas.

#### 4.6.2. Variación leyendo la placa con y sin tapa

Posteriormente, se realizó una variación en la lectura, ya que se leía la placa con tapa y sin tapa con el fin de observar si había algún cambio en los valores de absorbancia obtenidos. En la figura 19, se aprecia que ambas cepas alcanzan una absorbancia mayor cuando la lectura se realiza con tapa y que además el inicio y terminación de la fase exponencial también varía, similar a lo que ocurrió al realizar el ensayo en el tubo. Es decir que el tiempo en el cual ocurre el inicio y terminación de la fase exponencial se puede ver afectado sólo con el hecho de realizar la lectura de la placa con y sin tapa. Motivo por el cual se estableció que

en los ensayos a partir de este momento se iba a realizar la lectura de la placa sin tapa.



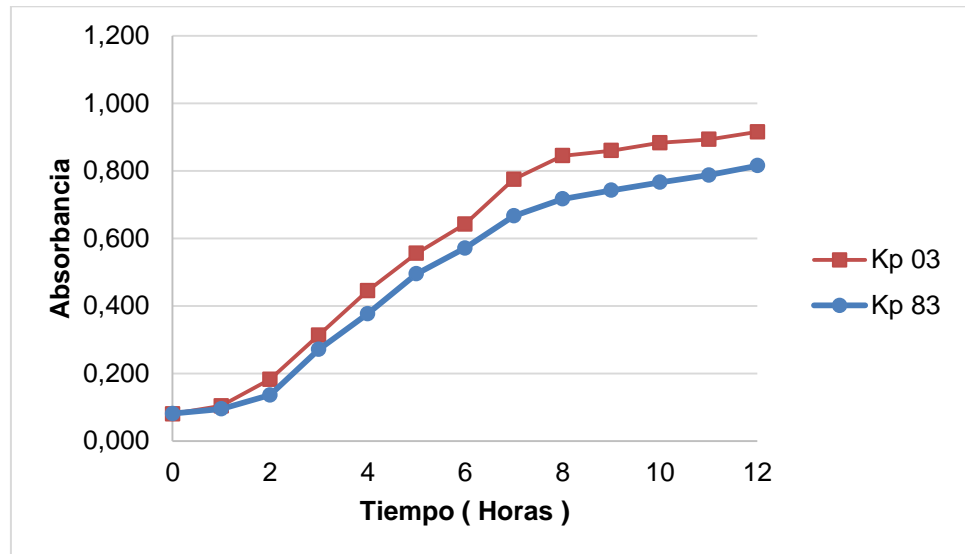
**FIGURA 19.** Lectura con y sin tapa para ambas cepas incubadas en placa durante 12 horas. Cada punto graficado corresponde a la media de tres lecturas

#### 4.6.3. Cinética de crecimiento durante 12 horas de incubación en placa, para determinar el tiempo de la fase de latencia y exponencial de cada cepa

El objetivo fue observar el comportamiento para cada cepa durante 12 horas consecutivas para iniciar la caracterización de la fase de latencia y exponencial al realizar la medición en la placa de 96 pozos; de las absorbancia resultantes en la lectura de cada hora se obtuvo un promedio de los datos y luego fueron graficados en la figura 20. Teniendo en cuenta que no se observó contaminación en el medio MH que se utilizó como control durante el mismo periodo de tiempo que se realizaron las lecturas hora tras hora.

Se observó un comportamiento similar en ambas cepas. La fase de latencia transcurre de la hora 0 a la hora 2 y la fase exponencial inicia sobre las 2 horas hasta aproximadamente las 8 horas. Nuevamente se observa que *Klebsiella*

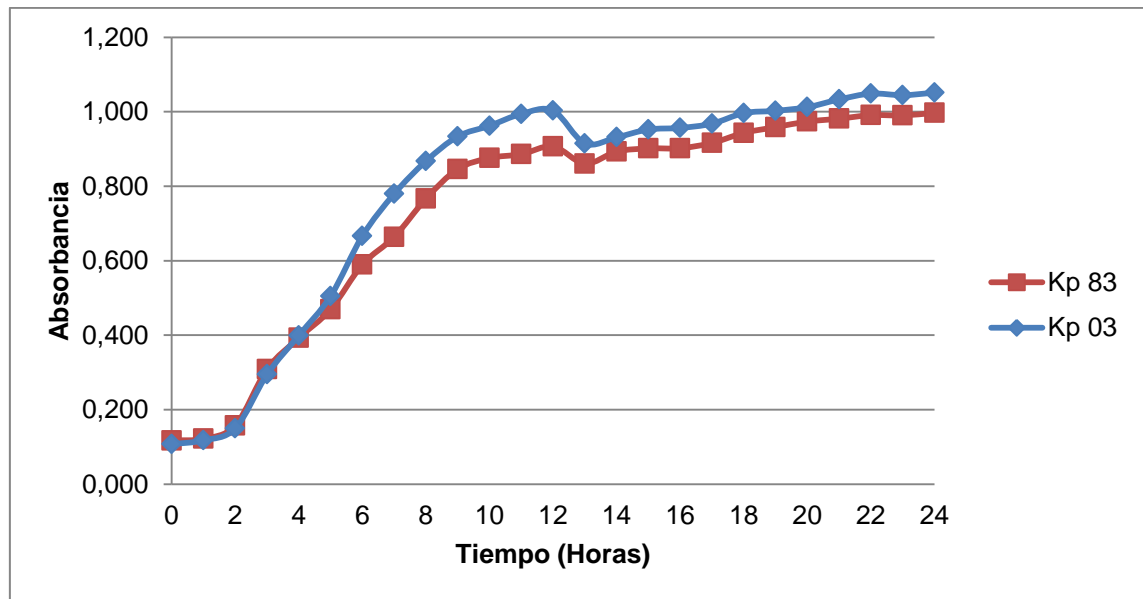
*pneumoniae* ATCC 700603 alcanza mayores absorbancias que *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.



**Figura 20.** Cinética de crecimiento durante 12 horas para ambas cepas bacterianas en placa. Cada punto graficado corresponde a la media de tres lecturas

#### 4.6.4. Cinética de crecimiento durante 24 horas de incubación en placa

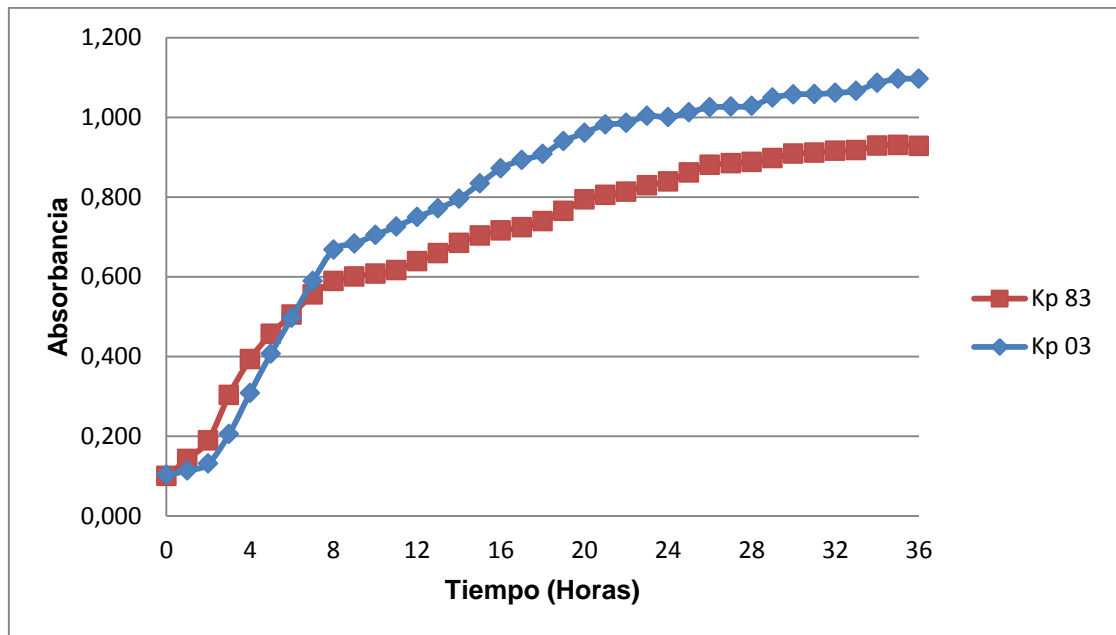
El objetivo de este ensayo era conocer el comportamiento desde la hora 0 hasta la hora 24, y así saber la duración aproximada de la fase estacionaria para cada cepa, las absorbancias obtenidas fueron promediadas y graficadas en la figura 21. Se observó que la fase estacionaria tiene una duración de 12 horas o más, con un incremento mínimo hora tras hora, en el valor de la absorbancia.



**Figura 21.** Cinética de crecimiento durante 24 horas para ambas cepas bacterianas en placa. Cada punto graficado corresponde a la media de tres lecturas

#### 4.6.5. Cinética de crecimiento durante 36 horas de incubación en placa

En este ensayo, se utilizó un mismo inóculo medido durante 36 horas con el fin de observar mejor el comportamiento de la bacteria y si era posible identificar el momento en el cual la bacteria atravesaba cada una de las cuatro fases de crecimiento bacteriano. Como se ilustra en la figura 22, los resultados fueron similares a los presentados anteriormente al realizar la cinética durante 12 y 24 horas en donde se observó que la fase de latencia ocurre entre las 0 y las 2 horas de incubación; la fase exponencial inicia a las 2 horas y finaliza aproximadamente a las 8 horas. A partir de ese momento ocurre la fase estacionaria, pero a partir de ese periodo de tiempo cada hora continúa aumentando un poco más la absorbancia de cada cepa hasta las 36 horas; razón por la cual no es posible reconocer donde finaliza la fase estacionaria y da inicio a la fase de muerte.



**FIGURA 22.** Cinética de crecimiento durante 36 horas de incubación para cada cepa en placa. Cada punto graficado corresponde a la media de tres lecturas.

#### 4.7. VIABILIDAD BACTERIANA

Dado que no era posible por medio de la técnica de turbidimetría establecer en qué momento ocurría la fase de muerte ni tampoco establecer un estimado de la población bacteriana presente en el inóculo, se decidió realizar técnicas de viabilidad como el plaqueo por conteo manual en agar plate count y el azul de tripán para conteo manual microscópico. Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos anteriores realizados en el grupo de investigación, se observó que era necesario realizar diluciones seriadas con solución salina al 0,9% para obtener un número de colonias contables.

##### 4.7.1. Ensayo preliminar

Inicialmente, se desarrolló un ensayo cuyo objetivo era determinar si el volumen de inóculo utilizado podría afectar en gran escala el conteo de UFC en las técnicas

de viabilidad. Para esto se utilizaron inóculos de 0 horas de incubación ajustados a 0,5 Mc Farland a volúmenes de 100, 200 y 300  $\mu$ l.

Al realizar el conteo manual de las UFC de cada volumen utilizado se comparó si existía gran diferencia entre tomar diferentes volúmenes de inóculo bacteriano a pesar de ajustarlo inicialmente a la misma concentración. Los resultados fueron registrados en la tabla 2. Se observó que el volumen no afecta en gran medida las UFC presentes, siempre y cuando la concentración del inóculo inicial se ajuste a 0,5 Mc Farland. Entonces, en los ensayos de viabilidad bacteriana se pueden utilizar inóculos tanto de 100, 200 o 300  $\mu$ l y los resultados no se verán alterados en gran magnitud.

**TABLA 2.** Conteo manual de UFC a diferentes volúmenes de inóculo. *Kp 83* hace referencia a la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Kp 03* hace referencia a la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Volumen	<i>Kp 83</i>	<i>Kp 03</i>	Dilución	UFC/ml <i>Kp 83</i>	UFC/ml <i>Kp 03</i>
300 $\mu$ l	110	353	$10^6$	$3,6 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$
200 $\mu$ l	99	339	$10^6$	$4,9 \times 10^8$	$1,6 \times 10^9$
100 $\mu$ l	75	308	$10^6$	$7,5 \times 10^8$	$3,0 \times 10^9$

#### 4.7.2. Ensayo de plaqueo bacteriano

Este ensayo se realizó con el fin de determinar la población bacteriana en las diferentes fases de la cinética de crecimiento bacteriano para ambas cepas. Basado en los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento se identificaron los tiempos donde ocurre un cambio en el crecimiento bacteriano y por consiguiente es posible que su población viable sea dependiente de la fase en la



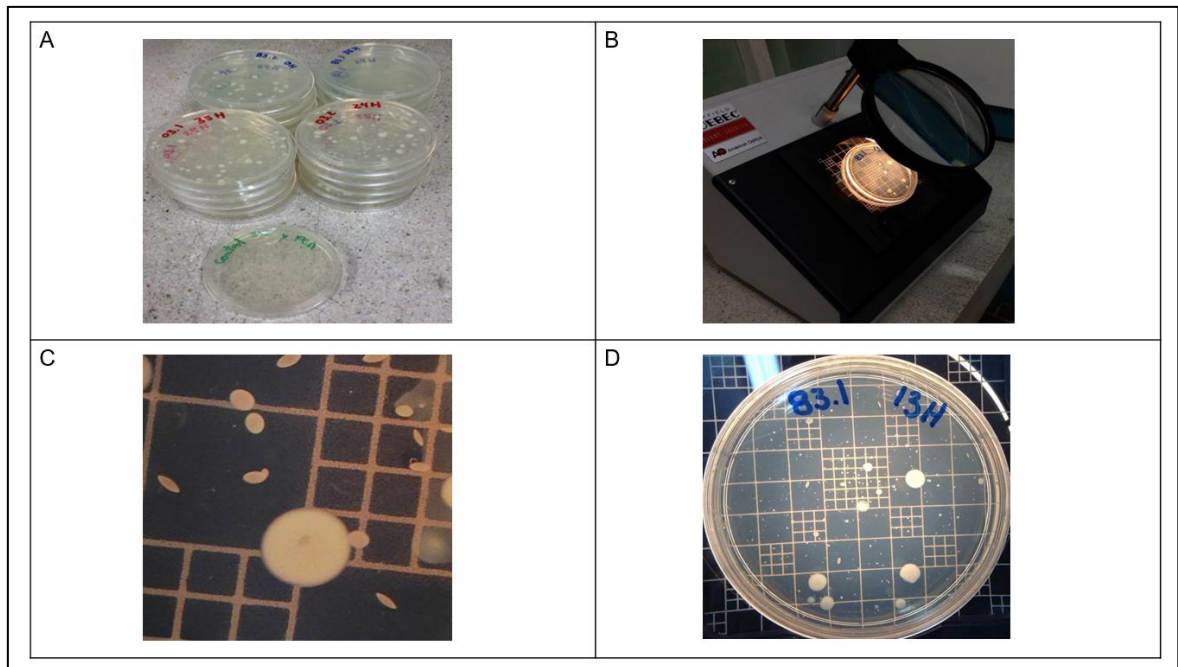
que se encuentre. Los tiempos establecidos para obtener los inóculos se muestran en la tabla 3.

**TABLA 3.** Tiempos utilizados para la obtención de los inóculos en las técnicas de viabilidad

Tiempo en horas	Fase de crecimiento
0 Horas	Latencia
6 Horas	Exponencial
13 Horas	Inicio de la estacionaria
24 Horas	Durante la estacionaria

Aunque por turbidimetría no fue posible determinar el momento en el cual se encontraba en la fase de muerte, se estableció un tiempo de **35 horas** para observar si se encontraba en esta fase por medio de las técnicas de viabilidad.

En la figura 23 A se observan todas las cajas que fueron contadas manualmente, debidamente marcadas y el control de medio plate count y de solución salina que no se encontraba contaminado; en 23 B se observa el contador de colonias utilizado para el conteo manual y facilitar la visualización de las UFC; en 23 C, se observan las UFC de diferentes tamaños que fueron encontradas en algunas cajas y por último en 23 D se observa una de las cajas que fue contada para este ensayo, mostrando la forma como se veían las UFC para realizar el conteo.



**FIGURA 23.** Ensayo de plaqueo bacteriano

Los resultados del conteo de cada placa para ambas bacterias fueron tabulados en la tabla 4, y se determinó la población bacteriana presente en cada inóculo seleccionado.

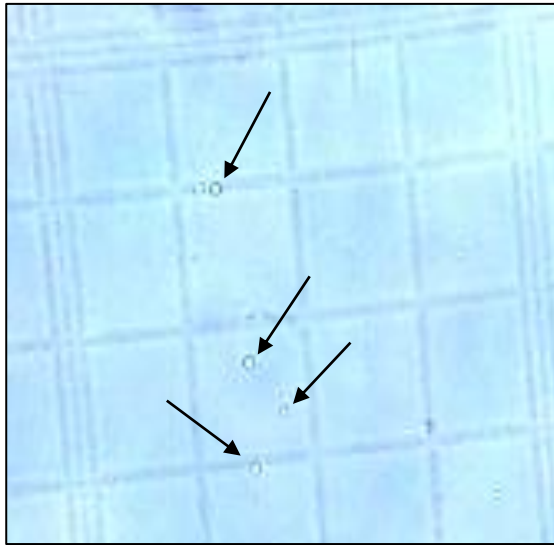
En esta tabla, se observó que *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 tuvo más UFC al conteo manual, lo cual se ve reflejado en el resultado final de UFC/ml. Con las diluciones realizadas se obtuvo UFC contables en todos los inóculos y en ambas cepas se aprecia que la población bacteriana es máxima especialmente en las 13 y 24 horas, lo cual hace referencia a la fase estacionaria. Motivo por el cual fue necesario realizar mayores diluciones seriadas en estos inóculos. Cabe mencionar que los resultados correspondientes al duplicado de este ensayo fueron similares.

**TABLA 4.** Plaqueo bacteriano. *Kp 83* hace referencia a la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Kp 03* hace referencia a la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Abs. Inicial hace referencia a la absorbancia inicial que se obtuvo en el inóculo que se utilizó para el conteo de las UFC. UFC se refiere al conteo manual de cada caja de petri incubada.

Cepa	Dilución	Abs. inicial	Inóculo utilizado	UFC	UFC/ ml
<i>Kp 83</i>	1 x 10 <sup>5</sup>	0,081	0 Horas	175	1,7 x 10 <sup>8</sup>
<i>Kp 83</i>	1 x 10 <sup>5</sup>	0,08	6 Horas	316	3,1 x 10 <sup>8</sup>
<i>Kp 83</i>	1 x 10 <sup>7</sup>	0,082	13 Horas	270	2,7 x 10 <sup>10</sup>
<i>Kp 83</i>	1 x 10 <sup>7</sup>	0,084	24 Horas	247	2,4 x 10 <sup>10</sup>
<i>Kp 83</i>	1 x 10 <sup>5</sup>	0,085	35 Horas	156	1,5 x 10 <sup>8</sup>
<i>Kp 03</i>	1 x 10 <sup>5</sup>	0,081	0 Horas	185	1,8 x 10 <sup>8</sup>
<i>Kp 03</i>	1 x 10 <sup>5</sup>	0,083	6 Horas	416	4,1 x 10 <sup>8</sup>
<i>Kp 03</i>	1 x 10 <sup>7</sup>	0,08	13 Horas	365	3,6 x 10 <sup>10</sup>
<i>Kp 03</i>	1 x 10 <sup>7</sup>	0,081	24 Horas	306	3 x 10 <sup>10</sup>
<i>Kp 03</i>	1 x 10 <sup>5</sup>	0,08	35 Horas	282	2,8 x 10 <sup>8</sup>

#### 4.7.3. Ensayo de viabilidad con azul de tripán

En cada cuadrante seleccionado de la cámara de Neubauer se realizó el conteo bacteriano de cada inóculo según los tiempos establecidos en la tabla 3. En la figura 24 se muestra un ejemplo de la observación microscópica para realizar el conteo manual.



**FIGURA 24.** Visualización microscópica del cuadrante en 40x con azul de tripán. Las flechas señalan las bacterias vivas con su membrana íntegra, transparentes y redondas.

Posterior al conteo manual, se tabularon los datos para cada cepa con los porcentajes de viabilidad y porcentajes de mortalidad para cada inóculo como se ilustra en la tabla 5. En esta tabla, se observa que los porcentajes de mortalidad aumentan a medida que los inóculos llevaban más horas desarrollándose, es decir que el inóculo de 35 horas fue el que presentó mayor porcentaje de mortalidad para ambas cepas. Además se observó que *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 tuvo más UFC totales pero su porcentaje de mortalidad fue mayor en el inóculo de 0,6 ,13 y 24 horas a comparación de los valores de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.

Cabe mencionar que los resultados correspondientes al duplicado de este ensayo fueron similares y que se realizó control de la solución salina en donde no hubo contaminación.

**TABLA 5.** Resultados del conteo manual con azul de tripán

Inóculo	% Viabilidad	% Mortalidad	UFC/ml
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883</b>			
<b>0 Horas</b>	100	0	1,4 x 10 <sup>9</sup>
<b>6 Horas</b>	97,2	2,7	1,1 x 10 <sup>10</sup>
<b>13 Horas</b>	93,1	6,8	5,8 x 10 <sup>11</sup>
<b>24 Horas</b>	89,3	10,6	4,7 x 10 <sup>11</sup>
<b>35 Horas</b>	75,6	24,3	7,8 x 10 <sup>9</sup>
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603</b>			
<b>0 Horas</b>	96,8	3,1	3,2 x 10 <sup>9</sup>
<b>6 Horas</b>	95,4	4,5	1,3 x 10 <sup>10</sup>
<b>13 Horas</b>	91,8	8,1	7,4 x 10 <sup>11</sup>
<b>24 Horas</b>	88,0	11,9	6,7 x 10 <sup>11</sup>
<b>35 Horas</b>	83,0	17,0	1,0 x 10 <sup>10</sup>

#### 4.8. DETERMINACIÓN DE LA CIM UTILIZANDO CIPROFLOXACINA

##### 4.8.1. Determinación de la CIM en placa

La concentración inhibitoria mínima de ciprofloxacina en cada inóculo para ambas cepas se reporta en la tabla 6. Según los resultados, se aprecia que *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 necesitó mayores concentraciones de ciprofloxacina para inhibir el crecimiento bacteriano. Además, se evidenció que para ambas cepas en cada inóculo se estableció un CIM distinto, posiblemente relacionado con el metabolismo propio de cada cepa y con la población viable presente en cada inóculo estudiado. Se observó que especialmente en los inóculos de 6 y 13

horas fue necesario utilizar mayor concentración de la ciprofloxacina para inhibir su crecimiento, es decir durante la fase exponencial e inicio de la fase estacionaria.

Cabe aclarar que los controles utilizados no se encontraron contaminados y que en las lecturas del lector de placas se observó que las absorbancias de una misma placa leída desde la hora 12 hasta la hora 24 eran similares, es decir que la inhibición bacteriana ocurría en un plazo no mayor a 12 horas.

**TABLA 6.** Determinación de la CIM de ciprofloxacina en placa para cada cepa evaluada

<b>Inóculo</b>	<b>CIM</b>
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883</b>	
<b>0 Horas</b>	1 µg/ml
<b>6 Horas</b>	16 µg/ml
<b>13 Horas</b>	16 µg/ml
<b>24 Horas</b>	4 µg/ml
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603</b>	
<b>0 Horas</b>	2 µg/ml
<b>6 Horas</b>	16 µg/ml
<b>13 Horas</b>	32 µg/ml
<b>24 Horas</b>	8 µg/ml

#### **4.8.2. Determinación de la CIM en tubo**

En la tabla 7, se muestran los resultados de la concentración mínima de ciprofloxacina para inhibir el crecimiento de ambas cepas. Se evidenció que en general se necesitó menos concentración de antibiótico para inhibir la población bacteriana en ambas cepas a diferencia de la concentración de ciprofloxacina

utilizada en el ensayo realizado en la placa. También se pudo ver que a las 3 horas el comportamiento es coherente para encontrarse al inicio de la fase exponencial; en ambas cepas, se observa un comportamiento similar desde las 6 horas hasta las 24 horas, es decir que desde la fase exponencial hasta la fase estacionaria los valores de la CIM fueron similares.

**TABLA 7.** Determinación de la CIM de ciprofloxacina en tubo para cada cepa evaluada

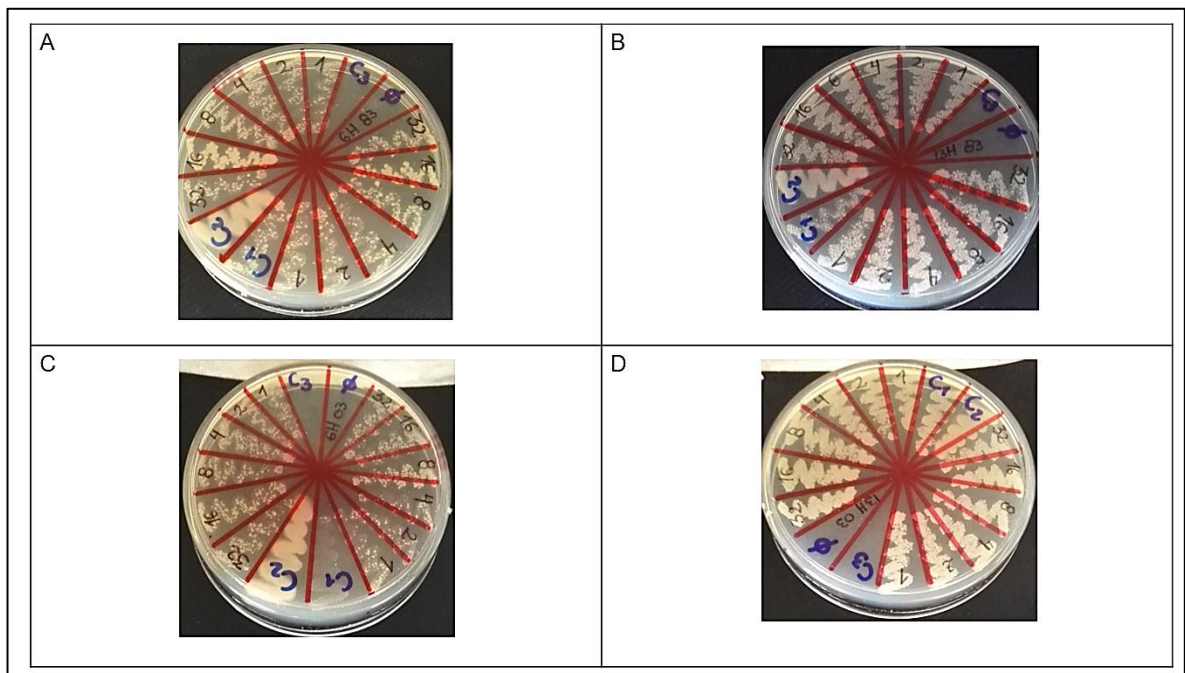
Inóculo	CIM
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883</b>	
<b>0 Horas</b>	4 µg/ml
<b>3 Horas</b>	2 µg/ml
<b>6 Horas</b>	8 µg/ml
<b>13 Horas</b>	8 µg/ml
<b>24 Horas</b>	8 µg/ml
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603</b>	
<b>0 Horas</b>	4 µg/ml
<b>3 Horas</b>	4 µg/ml
<b>6 Horas</b>	8 µg/ml
<b>13 Horas</b>	8 µg/ml
<b>24 Horas</b>	8 µg/ml

#### 4.9. DETERMINACIÓN DE LA CBM UTILIZANDO CIPROFLOXACINA

##### 4.9.1. Determinación de la CBM en placa

En la figura 25, se observan las fotos correspondientes a los inóculos de 6 y 13 horas para ambas cepas. En A y B se aprecia crecimiento desde la concentración de 1 µg/ml hasta 32 µg/ml de ciprofloxacina. Se evidencia mayor crecimiento en el

inóculo de 13 horas, tanto así que hay crecimiento en C1, correspondiente al control con ciprofloxacina. En C y D se muestra abundante crecimiento desde la mayor concentración de ciprofloxacina utilizada y en el control C1; el crecimiento en el control C1 puede indicar que en este inóculo era necesaria una mayor concentración de antibiótico para inhibir el crecimiento bacteriano. En ninguna placa se observó contaminación del medio utilizado.



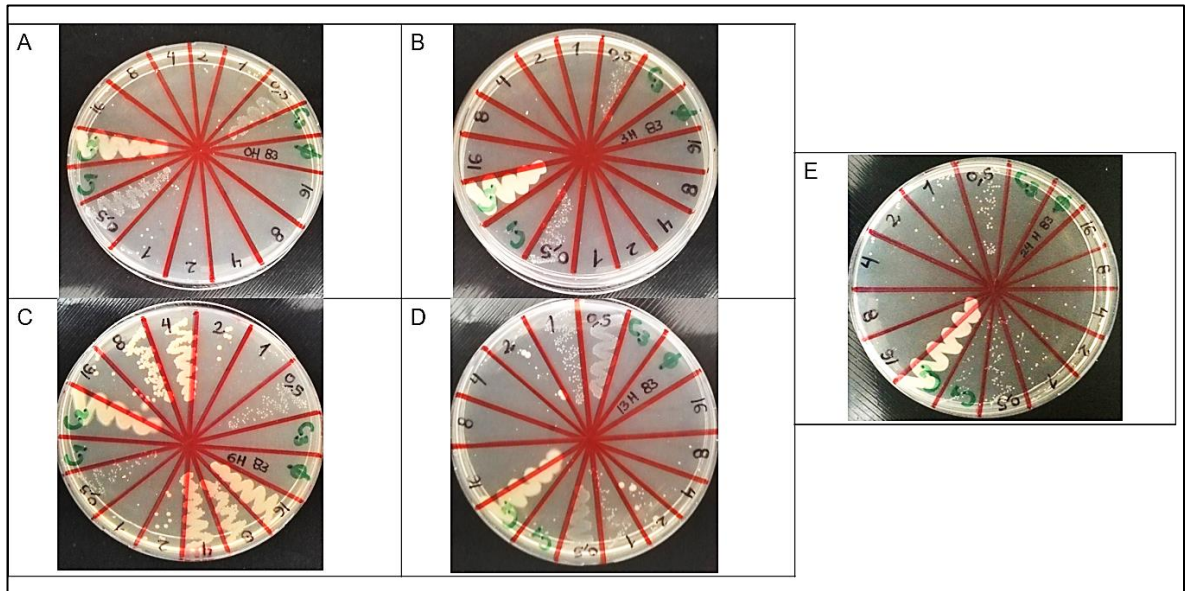
**FIGURA 25.** CBM de los inóculos de 6 y 13 horas. **A y B:** Inóculos de 6 y 13 horas respectivamente para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, **C y D:** Inóculos de 6 y 13 horas respectivamente para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

#### 4.9.2. Determinación de la CBM en tubo

En la figura 26, se muestra la CBM obtenida para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 en cada uno de los inóculos evaluados, se observó que en el inóculo de 6 horas es donde crece de forma más abundante la cepa, es decir cuando la bacteria se encuentra en la fase exponencial, es importante mencionar que

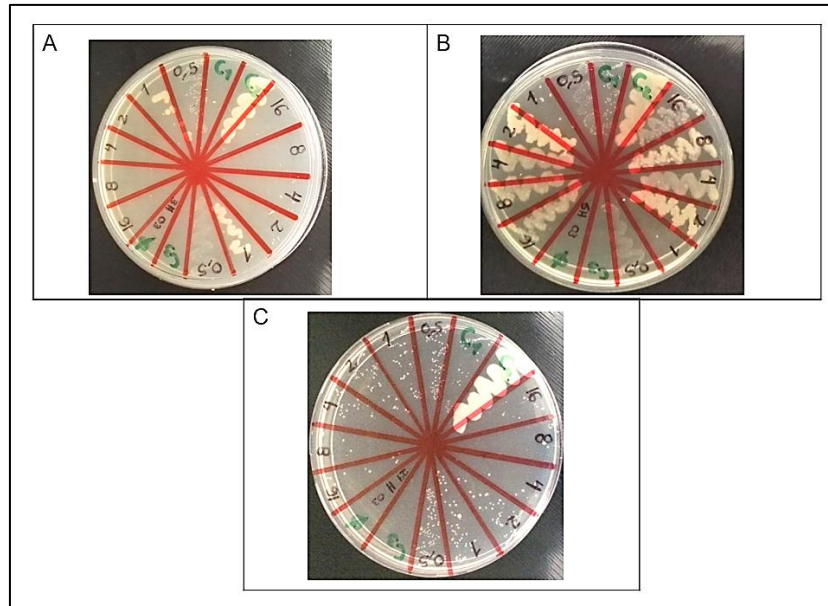


conforme a lo esperado; en C3 correspondiente al control del agar MH no se obtuvo crecimiento.



**FIGURA 26.** Resultado de CBM para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. **A:** Inóculo de 0 horas. 4 µg/ml **B:** Inóculo de 3 horas. 1 µg/ml **C:** Inóculo de 6 horas. >16 µg/ml. **D:** Inóculo de 13 horas. 16 µg/ml **E:** Inóculo de 24 horas. 16 µg/ml

En la figura 27, se muestran algunos CBM obtenidos para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. En la figura 27 B se observó que la bacteria creció abundantemente, tanto así que la CBM requerida corresponde a una concentración > 16 µg/ml, incluso se evidenció crecimiento en C1, correspondiente al control con la ciprofloxacina. En 27 C se observó que aunque el crecimiento no era tan abundante como en 27 B aun así el CBM observado en estos inóculos sigue siendo una concentración de ciprofloxacina > 16 µg/.



**FIGURA 27.** CBM obtenidos para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. **A:** Inóculo de 0 horas: 4  $\mu\text{g/ml}$ . **B:** Inóculo de 6 horas: > 16  $\mu\text{g/ml}$ . **C:** Inóculo de 24 horas: > 16  $\mu\text{g/ml}$

## 5. DISCUSIÓN

En la activación de las cepas estudiadas, se observó diferencia; ya que *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 tenía un aspecto más mucoso que *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, a pesar de que esta última posiblemente sea más patógena por la resistencia a antibióticos ya conocida (43). De esta forma se sugiere que las características en la morfología macroscópica no necesariamente están relacionadas con la susceptibilidad antimicrobiana. Acorde con lo reportado en la literatura (62) , al obtener colonias aisladas para la identificación macroscópica se observaron colonias de tamaño mediano y aspecto brillante en las cepas estudiadas de *Klebsiella pneumoniae*.

Para este trabajo se utilizó la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 con el fin de realizar ensayos *in vitro* de susceptibilidad antimicrobiana en cada fase de la cinética de crecimiento bacteriano y de esta manera encontrar posibles diferencias en la determinación de la CIM y CBM. Lo cual coincide con la recomendación de la norma CLSI M100 para análisis *in vitro* de susceptibilidad bacteriana en donde sugieren utilizar dicha cepa para estudios de esta índole (13,16). En el estudio de Aura Lucía Leal y colaboradores (63) también se utilizó esta cepa para control de calidad de susceptibilidad antimicrobiana con el fin de analizar aislamientos productores de BLEE provenientes de pacientes con infecciones urinarias. La cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 utilizada en este trabajo se caracteriza por ser productora de BLEE, lo cual es coherente con lo reportado por Simona Bratu y colaboradores (18), en donde esta cepa fue usada como control para comparar sus aislados clínicos con producción de BLEE con la cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ya que posee la expresión del gen SHV, también encontrado en sus aislamientos.

En este trabajo se ajustaron todos los inóculos a la escala de 0,5 Mc Farland para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, es decir, la concentración aproximada por inóculo inicial era de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ ml (16), utilizando solución salina o caldo MH para los ensayos realizados; lo cual es acorde a lo enunciado por el manual antimicrobiano para pruebas de susceptibilidad de la CLSI para determinaciones *in vitro* de susceptibilidad antimicrobiana (13) . Adicional a esto, también se trabajó con una longitud de onda de 620 nm para todos los ensayos, parámetro que también fue utilizado en el estudio de María Alejandra León y colaboradores (47) para pruebas de susceptibilidad con la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

En el presente trabajo se observó que el aumento de población bacteriana ocurría en cuestión de minutos, razón por la cual el inóculo era ajustado a escala de 0,5 Mc Farland e inmediatamente se procedía al montaje del ensayo en el menor tiempo posible porque las bacterias al encontrarse en el caldo MH contaban con nutrientes necesarios para continuar con su desarrollo y eso podía aumentar la población bacteriana viable y generar variabilidad en los resultados. En contraste con lo mencionado por Irith Wiegand y colaboradores (64), ya que ellos afirman que una vez se ajuste la suspensión bacteriana, se puede realizar el montaje del estudio dentro de los siguientes 30 minutos para evitar cambios en el número de población bacteriana. Otro aspecto en el cual no se observó coherencia entre los resultados de este trabajo y lo reportado en la literatura es que, para este estudio, el ajuste del inóculo se realizaba tomando con el asa metálica la bacteria necesaria para alcanzar la concentración correspondiente a la escala de 0,5 Mc Farland y desde el primer momento que se empezaba a incubar se contaba como tiempo 0. Mientras que según la CLSI se sugiere que para el ajuste del inóculo se deben tomar 3 UFC de una cepa fresca y luego colocarla en una suspensión con caldo MH e incubar hasta que se obtenga la fase deseada (13) ; no se realizó de esta forma porque si se incuban las UFC frescas hasta que se obtenga dicha

turbidez entonces no sería posible tener claridad acerca de la fase en la cual se está trabajando a menos que con anterioridad se haya caracterizado la cinética de crecimiento de la bacteria.

Para la determinación de la cinética bacteriana con *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 se utilizó la técnica de turbidimetría con el fin de observar el crecimiento hora tras hora por medio de los valores de absorbancia al realizar las lecturas en las placas , lo cual coincide con lo reportado por Elier Riverón Rodríguez y colaboradores (44) quienes mencionan que la medición por turbidez no es una técnica de reciente uso en microbiología, sino que ha sido utilizada desde hace algunas décadas para estudios de crecimiento bacteriano. De otra parte, en el presente trabajo empleando esta técnica, no fue posible apreciar la fase de muerte pero si las fases de latencia, exponencial y estacionaria, lo cual es coherente con lo enunciado por este mismo autor. Lo anterior, posiblemente atribuido a que las bacterias muertas y los desechos propios del metabolismo permanecen suspendidos en el medio manteniendo así la turbidez y por eso se dificulta la posibilidad de establecer esta última fase del crecimiento bacteriano.

Dentro de los resultados obtenidos en los ensayos de cinética de crecimiento bacteriano se observó que la fase exponencial se encontraba entre las 2 y las 8 horas de desarrollo bacteriano, lo cual coincide con lo mencionado en las normas de la CLSI (13) en donde argumentan que la fase exponencial se usa en la mayoría de estudios de susceptibilidad antimicrobiana debido a que no excede las 10 horas de incubación para alcanzar dicha fase. Lo anterior, se relaciona con el estudio de Luis Guillermo Ramírez Mérida y colaboradores (46), en donde se utilizó un inóculo de *Listeria monocytogenes* usando una suspensión bacteriana ajustada a escala de 0,5 Mc Farland únicamente en fase exponencial para realizar la determinación de CIM y CBM. Otro estudio, en el cual no se reporta la

utilización de la cinética de crecimiento propia de cada bacteria, es el de Cecilia Beltrán Cifuentes y colaboradores (12) quienes utilizaron cepas ATCC de microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium* para realizar la determinación de CIM; sin embargo, al momento de realizar esta medición inocularon cada cepa en tubos con caldo MH y todos contenían una concentración microbiana de  $10^6$  UFC/ml para seguidamente ser incubados durante 24 horas y realizar dicha determinación. Lo anterior, se complementa con otros estudios, en los cuales no se especifican los parámetros a tener en cuenta para caracterizar el microorganismo, sino que hacen referencia a que se guiaron por las normas de la CLSI o EUCAST. (29,37,63,65–68) y en dichas normas no se sugiere realizar la caracterización de cada fase de la cinética para el microorganismo en cuestión (16,69). Estos difieren en la determinación de CIM y CBM realizada en el presente trabajo, ya que para este caso se tuvieron en cuenta las cuatro fases de la cinética de crecimiento bacteriano para la determinación de CIM y CBM.

El hecho de que no sea habitual realizar la caracterización de la cinética de crecimiento bacteriano antes de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana puede estar relacionado con el hecho de que actualmente se utilizan nuevas estrategias para la determinación de la susceptibilidad *in vitro*, como por ejemplo el Vitek, que permite la identificación del microorganismo y su sensibilidad a los antimicrobianos en un tiempo no mayor a 24 horas. Es así como actualmente se reporta su utilización no solamente en Europa (70), sino también en Latinoamérica en países como Argentina (29) y Colombia (37).

Como no fue posible identificar la fase de muerte en la cinética de crecimiento bacteriano, se realizaron técnicas de viabilidad que permitieran conocer la población viable presente en cada inóculo. Dentro de las técnicas usadas en este trabajo se utilizó la cámara de Neubauer y el colorante de azul de tripán para el

conteo manual; siendo esta utilizada principalmente para estudios con células eucariotas (71), microalgas (72), o para el recuento de leucocitos (73). Sin embargo, teniendo en cuenta que la membrana de las células eucariotas es similar a la pared de las células procariotas en cuanto a componentes como la bicapa de fosfolípidos y proteínas; conociendo que el principio del azul de tripán es teñir las membranas de las células muertas, fue posible también realizar el conteo de las bacterias porque también tiñe la pared bacteriana por la afinidad con dichos componentes presentes tanto en la membrana de las células eucariotas como en la pared de las células procariotas (74).

En este trabajo se decidió utilizar la ciprofloxacina como molécula antimicrobiana modelo, ya que en estudios como el de Álvaro Hoyos Orrego (27) fue útil este antibiótico para contrarrestar la infección causada por *Klebsiella pneumoniae* y aunque algunos aislamientos presentaron multirresistencia a antibióticos como imipenem y amikacina, el 100% de ellos presentaron sensibilidad a la ciprofloxacina. Esta investigación se correlaciona con el estudio realizado por Lilia Benavides y colaboradores (75), donde mencionan que la ciprofloxacina se encuentra dentro de los antibióticos más frecuentemente utilizados, lo cual a su vez es coherente con el presente estudio ya que se apreció buena susceptibilidad bacteriana en las concentraciones de CIM y CBM.

Determinaciones como la CIM y CBM son herramientas fundamentales al momento de evaluar susceptibilidad antimicrobiana, lo cual es acorde a lo mencionado por Gertrudis Quintana y colaboradores en el año 2012, en donde también utilizaron la molécula de ciprofloxacina y afirman que este tipo de determinaciones se ha establecido como *gold standard* frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana (10). Para la determinación de CIM y CBM en este caso se utilizaron placas de 96 pozos y control positivo, negativo y del medio; así mismo se utilizaron concentraciones para determinar la CIM y CBM

desde 32µg/ml hasta 0,125µg/ml de ciprofloxacina; parámetros coherentes con lo sugerido en las guías de la CLSI y EUCAST para determinación de la CIM (13,69).

Tal como en los ensayos de cinética de crecimiento y viabilidad bacteriana, los inóculos utilizados para la determinación de CIM y CBM fueron ajustados a 0,5 Mc Farland; lo cual coincide con lo mencionado por Irith Wiegand y colaboradores (64), en donde también realizaron determinación de CIM y ajustaron el inóculo de la misma forma; ellos aseguran que si se utiliza una suspensión con mayor cantidad de inóculo bacteriano puede producir un aumento en los valores de CIM, especialmente si la bacteriana en estudio produce alguna enzima capaz de destruir la molécula que se está evaluando.

En el presente estudio, para la mayoría de inóculos evaluados en la determinación de CIM y CBM se requirió una concentración de ciprofloxacina mayor a la reportada por Ana González y colaboradores (76) para contrarrestar la infección, ya que ellos utilizaron la ciprofloxacina para su estudio a una concentración de 5 µg/ml y observaron una resistencia a quinolonas cercana al 88,8% en las cepas aisladas. Lo cual difiere con el estudio realizado por Patricia Díaz y colaboradores (68), en el cual la mayoría de las cepas KPC analizadas fueron resistentes a gentamicina, pero la ciprofloxacina fue el antibiótico con mayor actividad antibacteriana; encontrando un CIM para este antibiótico < 1µg/ml, mientras que para este trabajo se trabajó con concentraciones entre 0,5 y 32 µg/ml . En la presente investigación se encontró que la medición de CIM en general fue distinta en cada fase; aunque también pueden influir aspectos propios del ensayo, tal como lo enuncian las normas EUCAST (69), en donde mencionan que los ensayos de susceptibilidad tienen variabilidad inherente; bien sea por aspectos técnicos como por ejemplo cuando diferentes personas realizan la misma prueba, la forma como se leen los resultados, diferencias propias del microorganismo y en cómo se fabrican todos los insumos utilizados, las diferencias entre los productos de cada



fabricante, el lote de cada medio de cultivo preparado, la estabilidad de la temperatura de las incubadoras, entre otros aspectos de relevancia, que pueden generar cambios en los resultados. Por lo cual, se sugiere la estandarización de estas determinaciones *in vitro* en cada lugar acompañado de las buenas prácticas de laboratorio para que estas variaciones puedan ser reducidas y se obtengan resultados coherentes con la realidad del comportamiento de la cepa estudiada.

En la presente investigación no se encontraron normas nacionales específicas acerca de la manera adecuada para realizar determinaciones de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* en Colombia; lo cual coincide con lo mencionado por Martha Cecilia Beltrán Cifuentes y colaboradores (12) en donde afirman que en nuestro país no hay una Farmacopea Nacional ni tampoco unas normas oficialmente aceptadas para la determinación de CIM, entonces se recurre a las normas internacionales que han sido aceptadas en otros países, como lo son la CLSI y EUCAST que posiblemente no sean idóneas para guiar los problemas de salud pública propios de la población colombiana.

En los resultados de este trabajo, se evidenció que la CIM y CBM de ciprofloxacina eran mayores en la fase estacionaria a fin de inhibir el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*, posiblemente atribuible a que en los ensayos de viabilidad en la fase estacionaria también se encontró mayor cantidad de población bacteriana viable. Lo cual coincide con lo enunciado por Jeff Anderl y colaboradores (77), en donde afirman que para cepas de *Klebsiella pneumoniae* es recomendable utilizar la fase estacionaria porque en este momento la bacteria crece lentamente o no crece; al realizar los ensayos necesarios concluyeron que en esta fase, contrario a lo esperado, la bacteria fue menos susceptible a la muerte por antibióticos y mostró mayores absorbancias, lo cual puede estar relacionado con las bacterias muertas y productos del metabolismo pero también con la posible presencia de una nueva generación bacteriana.

## 6. CONCLUSIONES

- Se confirmó que las cepas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 se caracterizan morfológicamente por su aspecto mucoso, brillante y de tamaño mediano acorde con lo descrito en la literatura para este microorganismo.
- En las cinéticas de crecimiento bacteriano fue posible identificar las fases de latencia, exponencial y estacionaria para ambas cepas en estudio y por medio de las técnicas de viabilidad se pudo determinar que en el inóculo correspondiente a las 13 horas de desarrollo bacteriano se obtuvo la mayor población bacteriana viable.
- De acuerdo a las técnicas de viabilidad en la fase donde hubo menos población bacteriana viable fue en la fase de latencia, mientras que en la fase exponencial y estacionaria fue donde se obtuvo mayor población viable para ambas cepas en estudio.
- Se estableció mediante la determinación de CIM y CBM de ciprofloxacina que la susceptibilidad de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 a este antibiótico varía según la fase de crecimiento bacteriano en donde se realice el estudio observando mayor efecto en la fase de latencia y así mismo ocurre variación cuando el desarrollo bacteriano se lleva a cabo en tubo o en placa.
- La susceptibilidad de las cepas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 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 porque es donde se necesita mayor concentración del antibiótico

## 7. REFERENCIAS

1. OMS. Carga mundial de infecciones asociadas a la atención sanitaria [Internet]. WHO. World Health Organization; 2013 [cited 2017 Aug 7]. Available from: [http://www.who.int/gpsc/country\\_work/burden\\_hcai/es/#.WbG9kCq0Bxs](http://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/es/#.WbG9kCq0Bxs)
2. Cires M. La resistencia a los antimicrobianos, un problema mundial. Rev Cuba Med Gen Integr [Internet]. 2002 [cited 2017 Aug 10];18(2). Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-21252002000200012&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252002000200012&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
3. Organización mundial de la salud. Resistencia a los antimicrobianos: una amenaza mundial. Boletín de medicamentos esenciales [Internet]. 2000;10–36. Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s2250s/s2250s.pdf>
4. WHO. Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. World Health Organization [Internet]. 2014;383–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22247201> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2536104&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. Secretaria Distrital de Salud. Boletín epidemiológico distrital. Salud Cap [Internet]. 2016;25. Available from: [http://www.saludcapital.gov.co/DSP/Boletines epidemiologicos/2016/Boletín Epidemiológico Distrital Junio.pdf](http://www.saludcapital.gov.co/DSP/Boletines%20epidemiologicos/2016/Boletín%20Epidemiológico%20Distrital%20Junio.pdf)
6. Marr A, Gooderham W, Hancock R. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. Curr Opin Pharmacol [Internet]. 2006;6(5):468–72. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489206001299>

7. Correa E. Evaluación de péptidos sintéticos sobre bacterias, levaduras y mohos [Internet]. 2012. Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/9147/1/32295622.2012.pdf>
8. Bahar A, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2013;6(12):1543–65. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3873676/pdf/pharmaceuticals-06-01543.pdf>
9. Ramirez L, Marin D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Sci Tech*. 2009;(42):263–8.
10. Quintana G, Diaz M, Taboada W, Ortiz J. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Rev Medica Hered* [Internet]. 2012;16(1):39. Available from: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018-130X2005000100007](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2005000100007)
11. Paredes Guerrero D. Estudio del efecto antibacteriano de nanopartículas de plata sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* [Internet]. Universidad Industrial de Santander. 2011. Available from: <http://eprints.uanl.mx/2057/1/1080190951.pdf>
12. Cantillo M, Beltrán M. Actividad antibacteriana de los aceites obtenidos de *Ocimum basilicum* L. var. *cinammom*, *O. album*, *O. thrysiflorum*, para uso potencial en fitocosmética. *Rev Investig Andin*. 2013;15:800–8.
13. American Society for Microbiology. Manual of antimicrobial susceptibility testing. In: Organización Panamericana de la Salud. 2005. p. 63–6.
14. Pedrique de Aulacio M. Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (Antibiograma) [Internet]. 2002. p. 9. Available from: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/10\\_](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_)

Antibiograma.pdf

15. Hernández Cairo A, Perera Pintado A, Alberti A, Valdivia Alvarez Y, Alberdi L, Prats Capote A. Marcaje de ciprofloxacina con 99mTc para el diagnóstico de infección activa. *Rev CENIC Ciencias Biológicas*. 2005;36(2005).
16. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In: Supplement M100 [Internet]. 27th ed. Wayne; 2014. p. 132–9. Available from: <http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2017-M100-S27.pdf>
17. Martínez Buitrago E, Hernández C, Pallares C, Pacheco R, Hurtado K, Recalde M. Frecuencia de aislamientos microbiológicos y perfil de resistencia bacteriana en 13 clínicas y hospitales de alta complejidad en Santiago de Cali - Colombia. *Infectio* [Internet]. 2014;18(1):3–11. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392\(14\)70734-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392(14)70734-9)
18. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York city. *Arch Intern Med* [Internet]. 2006;165:1430–5. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/308345033\\_The\\_rapid\\_spread\\_of\\_carbapenem-resistant\\_Enterobacteriaceae](https://www.researchgate.net/publication/308345033_The_rapid_spread_of_carbapenem-resistant_Enterobacteriaceae)
19. Torres Manrique C. La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. 2012;15–21. Available from: <http://www.academiadefarmaciadearagon.es/docs/Documentos/Documento48.pdf>
20. Montesinos I, Campos S, Maria R. Estudio del primer brote por *Enterococcus faecium* van A en Canarias. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2010;28:430–4. Available from: <http://studylib.es/doc/6151585/estudio-del-primer-brote-por-enterococcus-faecium-vana-en...>
21. Schwaber M, Klarfeld S, Navon Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y.

- Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2008;52(3):1028–33. Available from: <http://aac.asm.org/content/52/3/1028.full.pdf>
22. Matsuo M, Oogai Y, Kato F, Sugai M, Komatsuzawa H. Growth-phase dependence of susceptibility to antimicrobial peptides in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* [Internet]. 2011;157(6):1786–97. Available from: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.044727-0#tab2>
  23. Soon R, Nation R, Harper M. Effect of colistin exposure and growth phase on the surface properties of live *Acinetobacter baumannii* cells examined by atomic force microscopy. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2011;29(10):1883–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3433558/>
  24. Fierro J. , Naranjo M. , Cabrera C. RJ. Caracterización epidemiológica de las infecciones asociadas a la atención en salud en una IPS privada. *Rev Fac Salud* [Internet]. 2015;7:29–34. Available from: <https://www.journalusco.edu.co/index.php/rfs/article/view/952/1847>
  25. Ministerio de salud y Protección Social. Reunión nacional de vigilancia y control en salud pública. 2011;(31):1–7.
  26. Leal A, Eslava Schmalbach J, Álvarez C, Buitrago G, Méndez M. Canales endémicos y marcadores de resistencia bacteriana, en instituciones de tercer nivel de Bogotá, Colombia. *Rev Salud Pública* [Internet]. 2006;8(1):59–70. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/262545383\\_Endemic\\_channels\\_and\\_bacterial\\_resistance\\_markers\\_in\\_third-level\\_hospitals\\_in\\_Bogota\\_Colombia](https://www.researchgate.net/publication/262545383_Endemic_channels_and_bacterial_resistance_markers_in_third-level_hospitals_in_Bogota_Colombia)
  27. Hoyos Orrego S, Rivera Rivera O, Hoyos Posada C, Mesa Restrepo C,

- Velásquez M. Características clínicas, epidemiológicas y de susceptibilidad a los antibióticos en casos de bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* en neonatos. *Rev Ces Med* [Internet]. 2007;21(2):31–9. Available from: [revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/download/25/18](http://revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/download/25/18)
28. Alexander G. Brote de *klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas en una unidad de cuidado coronario de bogotá. *Cienc y salud* [Internet]. 2015;7:3–10. Available from: <https://doi.org/10.22519/21455333.535>
  29. Montúfar Andrade E, Mesa Navas M, Aguilar Londoño C, Saldarriaga Acevedo C, Quiroga Echeverr A, Builes Montaña C, et al. Experiencia clínica con infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa, en una institución de enseñanza universitaria en Medellín, Colombia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;20(1):17–24.
  30. Corrales Ramírez L, Ávila de Navia S, Estupiñán Torres S. Enterobacterias. In: *Bacteriología teoría y práctica*. 1st ed. Bogotá, Colombia; 2013. p. 180–1.
  31. Orjuela O, Vélez A, Gallego C. Bacilos Gram negativos fermentadores de glucosa familias enterobacteriaceae y vibrionaceae. In: *Bacteriología aplicada Manual de procedimientos*. Bogotá, Colombia: Editorial Colegio Mayor de Cundinamarca; 2014. p. 91–8.
  32. Pereira L, Santos A. Interactions of *Klebsiella* Sp. with other intestinal flora. In: *Klebsiella infections: Epidemiology, pathogenesis and clinical outcomes*. 2013. p. 1–15.
  33. Echeverri Toro L, Castaño Correa J. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. *Iatreia* [Internet]. 2010;23:240–9. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/iat/v23n3/v23n3a06.pdf>
  34. Machado A, Murillo Muñoz M. Evaluación de sensibilidad antibiótica en urocultivos de pacientes en primer nivel de atención en salud de Pereira.



- Rev salud pública [Internet]. 2012;14(4):710–9. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0124-00642012000400014&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0124-00642012000400014&script=sci_abstract&tlng=es)
35. Hendricks D. Klebsiella. In: Holt JG et A, editor. Bergey's manual of determinative bacteriology [Internet]. 9°. 1994. p. 344. Available from: <https://www.biodiversitylibrary.org/ia/bergeysmanualofd1957amer#page/9/mode/1up>
  36. Lee C, Lee J, Park K, Jeon J, Kim Y, Cha C, et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017;7(Noviembre):1–3. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00483/full>
  37. Córdova E, Lespada M, Gómez N, Pasterán F, Oviedo V, Claudia R. Descripción clínica y epidemiológica de un brote nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC en Buenos Aires, Argentina. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(7):376–9.
  38. Secretaria De Salud De Bogotá. Boletín epidemiológico de infecciones Asociadas a la atención en salud. 2014;(1). Available from: [http://www.saludcapital.gov.co/DSP/Infecciones Asociadas a Atencion en Salud/Boletines/6. Boletín IAACS 2012.pdf](http://www.saludcapital.gov.co/DSP/Infecciones%20Asociadas%20a%20Atencion%20en%20Salud/Boletines/6.Bolet%C3%ADn%20IAACS%202012.pdf)
  39. Secretaria de salud de Bogotá. Boletín epidemiológico de infecciones asociadas a la atención en salud año 2013-2014. 2014.
  40. MDM científica. La importancia de las cepas ATCC [Internet]. *Medios de diagnóstico microbiológico*. 2013 [cited 2018 Jan 25]. Available from: <http://mdmcientifica.com/cepasatcc/>
  41. ISO. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. *ISO 17025:2005* [Internet]. 2005;2–3. Available from:

- [http://www.metrycal.com/Main/La\\_Norma\\_Internacional\\_ISO\\_IEC\\_17025.pdf](http://www.metrycal.com/Main/La_Norma_Internacional_ISO_IEC_17025.pdf)
42. ATCC. *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC ® 13883 <sup>TM</sup> [Internet]. [cited 2018 Jan 20]. Available from: <https://www.atcc.org/products/all/13883.aspx#generalinformation>
  43. ATCC. *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC ® 700603 <sup>TM</sup> [Internet]. [cited 2018 Jan 20]. Available from: <https://www.atcc.org/products/all/700603.aspx>
  44. Riverón Rodríguez E, Ramíez Frámata N, Herrera D, Barreras García G, Zayas Tamayo Á, Regueiro Gómez Á. Estudio de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* mediante el método de turbidez. *Rev CENIC Ciencias Biológicas* [Internet]. 2012;43(2):1–5. Available from: <http://revista.cnice.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB-2012-2-071-075.pdf>
  45. Olivieri R. Cinética de crecimiento microbiano [Internet]. Slideshare. 2012. Available from: <https://es.slideshare.net/patricioestrella/bacterias-13360799>
  46. Guillermo L, Mérida R, Salim A, Catinella R, Castillo L. Efecto bacteriostático y / o bactericida del extracto de gel de aloe vera sobre cultivos de *Listeria monocytogenes*. 2012;62(3). Available from: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222012000100011](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222012000100011)
  47. León Calvijo M, Leal Castro A, Almanzar Reina G, Rosas Pérez J, García Castañeda J, Rivera Monroy Z. Antibacterial activity of synthetic peptides derived from lactoferricin against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015;2015:2–4. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/453826/>
  48. Universidad de Navarra. Concepto y expresión matemático del crecimiento bacteriano. *Microbiol Clínica* [Internet]. 2009;2009:23–8. Available from:

<http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema02.pdf>

49. Plate count agar [Internet]. Madrid; 2009. Available from: <http://www.labm.com/products/plate-count-agar.asp>
50. Bastidas O. Conteo celular con cámara de Neubauer. Tech note Neubauer Chamb cell Count [Internet]. 2011;1–6. Available from: <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>
51. Laboratorio de Genomica Viral y Humana. Conteo celular y evaluación de viabilidad. Creat commons [Internet]. 2013;1–5. Available from: [http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell\\_counts\\_SPA.pdf](http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_counts_SPA.pdf)
52. Organización Mundial de la Salud. Prevención de las infecciones nosocomiales. In: Guía práctica [Internet]. 2nd ed. 2002. p. 6–9. Available from: [http://www.who.int/csr/resources/publications/ES\\_WHO\\_CDS\\_CSR\\_EPH\\_2002\\_12.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/ES_WHO_CDS_CSR_EPH_2002_12.pdf)
53. Reyes H, Navarro P. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos. Vol. 4, Boletín epidemiológico semanal . Organización Sanitas internacional. 2015.
54. Ministerio de Salud del Perú. Informe de la resistencia antimicrobiana en bacterias de origen Hospitalario [Internet]. Perú; 2012. Available from: [http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/Informe\\_Resistencia\\_2007.pdf](http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/Informe_Resistencia_2007.pdf)
55. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. Resistencia a los antibióticos. 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
56. Deresinski S, Schirmer P. Management of infections due to KPC-producing Klebsiella pneumoniae. Med Reports [Internet]. 2009;4:2–5. Available from: <http://www.f1000medicine.com/reports/10.3410/M1-79>

57. GREBO. Co-producciones de carbapenemasas un fenómeno en aumento y de difícil detección en el laboratorio de microbiología con pruebas fenotípicas. Boletín Inf [Internet]. 2016;8(2027):1–47. Available from: [http://www.grebo.org/documentos/Boletin\\_Informativo\\_2015\\_2016.pdf](http://www.grebo.org/documentos/Boletin_Informativo_2015_2016.pdf)
58. Echeverri Toro L, Rueda Z, Maya W, Agudelo Y, Ospina S. Klebsiella pneumoniae multirresistente, factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia. Rev Chil infectología [Internet]. 2012;29(2):175–82. Available from: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182012000200009](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182012000200009)
59. Seija V, Vignoli R. Principales grupos de antibióticos. In: Temas de bacteriología y virología Médica. 2006. p. 631–47.
60. Gamal S. Ciprofloxacin controlled-solid lipid nanoparticles: characterization, in vitro release, and antibacterial activity assessment. Biomed Res Int [Internet]. 2017;2017:1–2. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/2120734/>
61. Red nacional de la vigilancia de la resistencia bacteriana y de las infecciones asociadas al cuidado de la salud. Estado del arte de la resistencia bacteriana y la vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas al cuidado de la salud en Colombia [Internet]. República de Colombia; 2010. Available from: <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/IAAS/4>. Estado del arte de resistencia bacteriana.pdf
62. Washington W, Allen S, Janda W, Elmer K, Gary P, Schrenckenberger G. Enterobacteriaceae. In: Panamericana M, editor. Koneman diagnóstico microbiológico. 6th ed. 2006. p. 250–3.
63. Leal A, Cortés J, Arias G, Ovalle M, Saavedra S, Buitrago G, et al. Emergencia de fenotipos resistentes a cefalosporinas de tercera generación en Enterobacteriaceae causantes de infección del tracto urinario de inicio

- comunitario en hospitales de Colombia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2013;31(5):298–303. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2012.04.007>
64. Wiegand I, Hilpert K, Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* [Internet]. 2008;2(2):163–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/nprot.2007.521>
65. Ozbek Celik B, Mataraci Kara E, Yilmaz M. Effects of various antibiotics alone or in combination with doripenem against *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in an intensive care unit. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014;2014:1–6. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/397421/>
66. Saadi A, Garjees N, Rasool A. Antibiogram profile of septic meningitis among children in Duhok, Iraq. *Saudi Med J* [Internet]. 2017;38(5):517–20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5447213/?report=reader>
67. Rodríguez E, Saavedra S, Leal A, Álvarez C, Olarte N, Valderrama A, et al. Diseminación de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC-3 en hospitales de Bogotá durante un periodo de tres años. *Biomédica* [Internet]. 2014;34:224–31. Available from: [/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=&lang=pt](/scielo.php?script=sci_arttext&pid=&lang=pt)
68. Díaz P, Bello H, Domínguez M, Trabal N, Mella S, Zemelman R, et al. Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. *Rev méd Chile* [Internet]. 2004;132:1173–8. Available from: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872004001000003](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872004001000003)
69. Eucast. Standard Operating Procedure. MIC distributions and the setting of epidemiological. 2017;7–10.

70. López Urrutia L, de Frutos M, Oteo J, Eiros J. Brote por *Enterococcus faecium* ST17 resistente a glucopéptidos en una unidad de neonatología. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2017;1–2. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/319108385>
71. Cardona Maya W, Berdugo J, Cadavid A. Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer. *Actas Urol Esp* [Internet]. 2008;32(4):443–5. Available from: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0210-48062008000400010&script=sci\\_arttext](http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0210-48062008000400010&script=sci_arttext)
72. Arredondo B, Voltolina D. Concentración de recuento celular y tasa de crecimiento. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación la biomasa microalgas. 2007;(2007):17–27.
73. Flores Alfaro E, Parra Rojas I, Jiménez Acevedo A, Fernández Tilapa G. Pruebas presuntivas del análisis de orina en el diagnóstico de infección en vías urinarias entre diabéticos tipo 2. *Salud Publica Mex*. 2005;47(5):376–80.
74. Khan academy. Membrana plasmática [Internet]. 2018 [cited 2018 Feb 2]. Available from: <https://es.khanacademy.org/science/biology/structure-of-a-cell/prokaryotic-and-eukaryotic-cells/a/plasma-membrane-and-cytoplasm>
75. Lilia B, Aldama Ojeda A, Vázquez H. Vigilancia de los niveles de uso de antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México. *Salud Publica Mex* [Internet]. 2005;47(3):219–26. Available from: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342005000300005](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342005000300005)
76. González A, Nieves B. Resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en dos unidades de cuidados intensivos del Hospital Universitario de Los Andes Mérida , Venezuela, entre 2007 y 2009. *Médicas UIS* [Internet]. 2016;29(2):21–30. Available from:

<http://www.scielo.org.co/pdf/muis/v29n2/v29n2a03.pdf>

77. Anderl J, Roe F, Stewart P. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Am Soc Microbiol* [Internet]. 2003;47(4):1251–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC152508/>





