



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO

Informe final de investigación previo a la obtención del título de Licenciados en Ciencias
de la Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico

TRABAJO DE TITULACIÓN

Detección de resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico aisladas en el Río
Chambo. Noviembre 2018 - enero 2019

Autor(es): Jhonnatan Paúl Molina Ortiz
Josué Andrés Orozco Pilco

Tutora: PhD. Morella Guillén Ferraro

Riobamba - Ecuador

Año 2019

REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: Detección de resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico aisladas en el Río Chambo. Noviembre 2018 - enero 2019, presentado por Jhonnatan Paul Molina Ortiz y Josué Andrés Orozco Pilco, dirigido por PhD. Morella Lucia Guillen Ferraro, una vez escuchada la defensa oral y realizado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en el cual se ha constado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH. Para constancia de lo expuesto firman:

Mgs. Ximena Robalino
Presidente del Tribunal



.....
Firma

PhD. Liliana Araujo Baptista
Miembro del Tribunal



.....
Firma

Mgs. Yisela Ramos Campi
Miembro del Tribunal



.....
Firma

DECLARACIÓN EXPRESA DE TUTORÍA

Yo, Morella Lucia Guillen Ferraro docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de tutora del proyecto de investigación con el tema: “Detección de resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico aisladas en el Río Chambo. Noviembre 2018 - enero 2019”, propuesto por el Sr. Jhonnatan Paul Molina Ortiz y el Sr. Josué Andrés Orozco Pilco, egresados de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad de Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentran aptos para para la defensa pública del proyecto. Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad facultando a los interesados en hacer uso del presente para los trámites correspondientes.



PhD. Morella Lucia Guillen Ferraro

Docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico

AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN

“La responsabilidad del contenido de este proyecto de graduación, nos corresponde exclusivamente a: Jhonnatan Paul Molina Ortiz, Josué Andrés Orozco Pilco y Morella Guillen Ferraro y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.”



Jhonnatan Paul Molina Ortiz

0603924614



Josué Andrés Orozco Pilco

0604212191

AGRADECIMIENTO

Queremos expresar nuestra gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre nuestras vidas.

A nuestros padres y familiares por ser el soporte y guía en nuestras vidas.

Y de manera especial a los Docentes que nos guiaron durante el proceso de esta investigación con sus consejos y conocimientos: Morella Guillén, María del Carmen Cordovez, Ana Carolina Gonzales.

Josué y Jhonnatan

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi madre Eulalia por ser mi motivación para superarme cada día más, a mis hermanos que con sus palabras de aliento me incentivaron para que siguiera siempre adelante, siendo una persona perseverante y culmine con mis metas.

Jhonnatan Molina

Sin vuestro esfuerzo y sacrificio nada de esto sería posible.

Dedico este trabajo con mucho amor y cariño a mis padres Edison y Elsa por todo el esfuerzo que han hecho para llegar a este momento. A mis hermanos Erika y Jhoan por el apoyo incondicional. A mis amigos y familiares por sus palabras de motivación en todo momento.

Josué Orozco

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos	4
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	5
Aguas de riego	5
Aguas residuales	5
Río Chambo	5
Antimicrobiano	6
Bacterias de interés clínico	6
Enterobacterias	7
<i>Pseudomonas</i>	8
Tipo de mecanismos de acción de los antimicrobianos	9
Mecanismos de resistencia	10
Tipos de mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos	11
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA	13
Tipo de Investigación	13
Determinación de la población y muestra	13
Identificación del área de estudio y toma de muestras	13
Aislamiento de bacterias de interés clínico presentes en la muestra	14
Técnica de aislamiento de colonias	14
Medición de la resistencia antibiótica en bacterias aisladas	15
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
CONCLUSIONES	23
RECOMENDACIONES	24
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Antibiograma de Escherichia coli.....	20
Imagen 2. Antibiograma de Enterobacter aerogenes.....	20
Imagen 3. Resistencia a AMC	21
Imagen 4. Resistencia a FOX	21
Imagen 5. A) Toma de muestra en Cebadas. B) Toma de muestra en Chambo. C) Toma de muestra en Penipe. D) Toma de muestra en Cubijíes.....	
Imagen 6. Medición del pH.	
Imagen 7. Siembra de las muestras de agua en agar CLED.	
Imagen 8. A) Colonias pequeñas de color amarillo en agar CLED posterior a 24 horas de incubación a 37°C. B) Colonias fermentadoras de lactosa y no fermentadoras de lactosa....	
Imagen 9. A) Resiembra de las cepas en agar MacConkey para la obtención de cepas más puras y en un crecimiento óptimo para las pruebas de identificación. B) Siembra de las cepas puras en la batería de identificación.	
Imagen 10. Batería de identificación bacteriana de izquierda a derecha: agar Triple azúcar hierro (A/A, producción de gas), Lisina hierro agar (Desaminación negativa, descarboxilación positiva), citrato (negativo), SIM y urea (positiva).	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de especies de Pseudomonas de interés clínico.....	8
Tabla 2. Descripción de ubicación y altitud en cada estación de muestreo.....	14
Tabla 3. Datos de temperatura y pH obtenidos de las aguas del Río Chambo de acuerdo con cada estación de muestreo.....	16
Tabla 4. Bacterias de interés clínico aisladas del Río Chambo.	17
Tabla 5. Distribución de las bacterias de interés clínico según la estación geográfica de muestreo.	18
Tabla 6. Patrón de susceptibilidad y resistencia de las bacterias de interés clínico de la familia enterobacteriaceae.	19
Tabla 7. Patrón de susceptibilidad y resistencia de las demás bacterias gramnegativas que no pertenecen a la familia enterobacteriaceae.	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modo de acción de los principales agentes quimioterapéuticos antimicrobianos.	10
Figura 2. Ubicación de los puntos de muestreo en la subcuenca del Río Chambo.	

RESUMEN

Actualmente las bacterias resistentes a los antibióticos se han convertido en un problema mundial y sigue en crecimiento debido a la evolución de estos microorganismos y al ritmo lento que se está descubriendo nuevos antibióticos. Este estudio tiene como objetivo determinar la resistencia antimicrobiana de bacterias de interés clínico aisladas del Río Chambo, que permitió identificar bacterias perjudiciales para la salud humana y de difícil tratamiento antibiótico. El estudio es de tipo descriptivo, de corte transversal con un diseño de campo. Se inició con la recolección de muestras en seis puntos diferentes tomando en cuenta factores como temperatura del agua, del medio ambiente y pH. Para el aislamiento e identificación de los microorganismos se utilizó medios de cultivo como: agar CLED, Sangre, McConkey e interpretación de pruebas fisiológicas y bioquímicas para clasificarlas según su especie. Para la medición de la susceptibilidad o resistencia antimicrobiana se realizó la técnica de Kirby Bauer. El aislamiento e identificación muestran once bacterias patógenas gramnegativas: enterobacterias (81,8%) entre estas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* y *Pseudomonas* (18,2%) entre estas *Pseudomonas* sp. La mayoría de las bacterias fueron resistentes a las quinolonas y en menor proporción a las cefalosporinas, concluyendo que el Río Chambo está contaminado con bacterias de interés clínico resistentes a antibióticos de uso común.

PALABRAS CLAVES

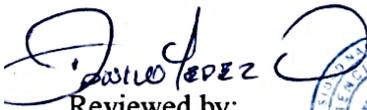
Resistencia antibiótica, Río Chambo, bacterias, antibióticos.

ABSTRACT

Currently antibiotic-resistant bacteria have become a global problem and continue to grow due to the evolution of these microorganisms and the slow pace that is discovering new antibiotics. The objective of this study was to determine the antimicrobial resistance of bacteria of clinical interest isolated from the Chambo River, which allowed the identification of bacteria harmful to human health and difficult to treat with antibiotics. The study is descriptive, cross-sectional with a field design. It began with the collection of samples in six different points taking into account factors such as water temperature, environment and pH. For the isolation and identification of microorganisms, culture media were used: CLED agar, Blood, McConkey and interpretation of physiological and biochemical tests to classify them according to their species. For the measurement of susceptibility or antimicrobial resistance, the Kirby Bauer technique was used. Isolation and identification evince eleven gram-negative pathogenic bacteria: Enterobacteria (81.8%) among these Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Enterobacter aerogenes, Citrobacter freundii and Pseudomonas (18.2%) among these Pseudomonas sp. The majority of the bacteria were resistant to the quinolones and in lesser proportion to the cephalosporins, concluding that the Chambo River is contaminated with bacteria of clinical interest resistant to commonly used antibiotics.

KEYWORDS

Antibiotic resistance, Chambo River, bacteria, antibiotics.


Reviewed by:
Danilo Yépez O.
English professor UNACH



INTRODUCCIÓN

El agua es uno de los elementos indispensables para la vida, así como para el resto de los seres vivos que se encuentran en este planeta, el cual se localiza en forma líquida, sólida y vapor, ya sea agua dulce o salada¹, si bien aproximadamente la superficie terrestre el 71% está cubierta de agua y solamente alrededor del 2% es potable dulce². A nivel mundial en el sector agrícola se utiliza algún río cercano como fuente de riego, para la hidratación de los cultivos.

Las enfermedades infecciosas siguen siendo, a principios del siglo XXI una de las causas más significativas de muerte en los humanos, aunque con la contribución relativa de medicamentos esta ha ido disminuyendo desde el siglo XIX. Los fármacos han salvado millones de vidas, pero además han supuesto una revolución en la medicina esto debido al desarrollo de nuevos antibióticos y su mal uso terapéutico. En la actualidad algunas infecciones causadas por bacterias resistentes a antimicrobianos que se encuentran en nuestro ambiente se relacionan a una mayor morbilidad y/o mortalidad³.

La resistencia antimicrobiana ha surgido como uno de los principales inconvenientes de la salud pública del siglo XXI, el cual amenaza la prevención efectiva y tratamiento de una escala cada vez mayor de infecciones provocado por bacterias, parásitos, virus y hongos ya susceptibles a los a los fármacos comunes⁴. Ante esta realidad la necesidad de evitar una crisis global de la continua evolución de estos microorganismos, por lo tanto, a partir de ahí surge un problema socioeconómico que abarca desde el desarrollo e implementación de nuevos antibióticos, limitando su uso frente a cepas bacterianas multirresistentes y de esta forma disminuyendo la efectividad del tratamiento farmacológico^{4,5}.

La relación entre los fármacos y el ecosistema acuático existe debido que las bacterias potencialmente patógenas se liberan constantemente en las aguas, muchas de ellas albergan genes de resistencia antimicrobiana que se insertan en plásmidos, transposones e integrones, los cuales pueden transportarse y propagarse entre diferentes grupos de bacterias que viven en el medio ambiente acuático, de tal manera siendo patógenas para el ser humano⁶.

Las bacterias resistentes a los antibióticos se liberan en las aguas principalmente a través de la orina o las heces y restos de componentes biológicos ya sean de humanos o animales, los cuales usan como ruta principal las aguas residuales siendo estos de zonas urbanas y rurales, probablemente constituyéndose en las mayores fuentes de contaminación bacteriana y de genes resistentes a antimicrobianos que se liberan en el medio ambiente⁶.

El agua desde la óptica productiva como fuente de hidratación en los cultivos juega un papel fundamental, pues el riego puede triplicar la producción de un terreno, por lo tanto, “la agricultura es inconcebible sin agua”⁷.

En la Constitución de la República del Ecuador en el capítulo segundo de los derechos al buen vivir establece en el artículo 12 “El derecho humano al agua es fundamental e irrenunciable” y el artículo 13 “Las personas y colectividades tienen derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos; perfectamente producidos a nivel local”⁸, conjuntamente con estos derechos el Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021 plantea en el objetivo 6, Desarrollar las capacidades productivas y del entorno para lograr la soberanía alimentaria y el Buen Vivir rural⁹.

En la actualidad no existen investigaciones desde el punto de vista de interés clínico que se haya analizado y determinado la presencia de resistencia antimicrobiana de la biodiversidad de bacterias presentes en el agua del Río Chambo, motivo suficiente para realizar esta investigación que brindará un aporte científico e informativo para la sociedad.

A nivel mundial, los datos de aguas contaminadas con presencia de bacterias de interés clínico con resistencia antimicrobiana no son exactos, pero, en distintos países que interactúan ya sea por el intercambio de personas, por la mercadería entre los países de diferentes o mismas regiones, indudablemente resultado del comportamiento del hombre, que ha provocado un aumento exponencial en la exposición de las bacterias, patógenas y no patógenas, a los antibióticos¹⁰. Un ejemplo es el aumento vertiginoso de la resistencia antimicrobiana en la historia evolutiva reciente de las enzimas capaces de inactivar los antibióticos beta-lactámicos, que actualmente ha dejado de ser únicamente un problema de la práctica clínica para convertirse en una amenaza global que afecta negativamente la economía y el desarrollo de los países¹⁰.

El aumento de contaminación en la mayoría de los ríos de América Latina entre 1990 y 2010 es alarmante, por lo que cientos de millones de personas están en riesgo de contraer enfermedades infecciosas que pueden ser letales, entre ellas cólera, según alerta la Organización de las Naciones Unidas¹¹.

En el Ecuador, se valoró la calidad del agua de diferentes ríos entre ellos el Machángara y Monjas, donde se encontraron una gran cantidad coliformes fecales¹². En Chimborazo uno de los estudios más actuales se realizó en las aguas del regadío del Río Chibunga lográndose aislar bacterias patógenas con resistencia antimicrobiana de interés clínico que son causantes de infecciones importantes¹².

En esta provincia el Río Chambo, principal afluente del Pastaza, está contaminado, lo confirma el estudio preliminar sobre la calidad de agua que realizaron los técnicos de la Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas (CESA) en Chimborazo. La información que recopilaron los especialistas se orientó en distintos parámetros: el análisis microbiológico, coliformes totales y fecales; el análisis químico de nitratos y fosfatos¹³.

A pesar de lo expuesto en este río no existe un estudio previo que demuestre la presencia de resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico que habitan las aguas de este río, motivo suficiente por el cual se estableció esta investigación. Luego de la identificación de las bacterias patógenas y su resistencia antimicrobiana, se puede alertar a las autoridades competentes sobre esta problemática, con el propósito de evitar infecciones en la población agrícola, de tal manera mejorando su estilo de cultivo y producción de alimentos.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar la resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico aisladas en el Río Chambo. Noviembre 2018 - enero 2019.

Objetivos específicos

1. Establecer seis diferentes puntos geográficos para la toma de muestra, así como la medición del pH, temperatura del agua y ambiente de los sectores agrícolas.
2. Aislar e identificar las bacterias de interés clínico obtenidas en los diferentes puntos geográficos del riego del Río Chambo.
3. Examinar la resistencia antibiótica de las bacterias patógenas identificadas en las aguas de riego del Río Chambo.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

Aguas de riego

El agua de riego es una aplicación artificial agua específica para suplir al suelo la humedad requerida por los cultivos. Este tipo de actividad deberá aplicarse en el tipo de suelo donde la lluvia no satisface las exigencias de hidratación al sector agrícola¹⁴.

Este es un factor para considerar en la agricultura, tanto dentro de los invernaderos como a campo abierto, sin embargo, dependiendo del origen de los posibles problemas de calidad en la producción de los cultivos se podría apreciar y determinar la aportación positiva de este tipo de implemento¹⁵.

El agua y el suelo son recursos importantes que contribuyen la producción alimentaria y de sus servicios ecosistémicos. En el caso de la agricultura el riego de tierras cultivadas abarca el 16% en el mundo, siendo ellos los que producen el 40% de los alimentos¹⁶.

Aguas residuales

Son aquellas aguas que por actividades humanas han sido modificadas sus características originales, por lo tanto, su calidad requiere un tratamiento previo antes de ser vertidas a un ambiente natural de agua o descargadas al sistema de alcantarillado¹⁷.

Las aguas residuales según su origen resultan de la combinación de residuos sólidos y líquidos los cuales son transportados por aguas provenientes de edificios, residencias, instituciones, junto con residuos de las industrias y de actividades agrícola¹⁸.

Diversas investigaciones han demostrado la contaminación bacteriana en vegetales debido al riego con aguas contaminadas con heces humanas o de animales, el uso de estiércol como abono orgánico, el desconocimiento de la manipulación tanto en el momento del cultivo, como el lavado de las verduras luego de la cosecha que en distintos casos utilizan agua de riego, lo que resulta perjudicial tanto para el productor como consumidor ya que están expuestos a diferentes microorganismos patógenos⁴⁰.

Río Chambo

La subcuenca del Río Chambo se encuentra ubicada en el centro del Ecuador, teniendo una superficie de 3580 km² y cubre un 54% de la superficie total de la provincia de Chimborazo, en esta zona se encuentra parte de los siete cantones de la provincia: Alausí, Riobamba, Chambo, Penipe, Guano, Colta y Guamote, donde se encuentran unos 33 ríos de tamaño variable según su ubicación geográfica y época del año. La

subcuenca pertenece a la provincia en un 98% abarcando los humedales y zonas naturales, como los páramos¹³.

En esta subcuenca no ha sido desarrollado ningún estudio para conocer la calidad la calidad del agua en toda su extensión, sin embargo, el equipo técnico de la Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas-Agrónomos y Veterinarios Sin Fronteras (CESA-AVSF) realizaron por primera vez estudios en 33 estaciones seleccionadas con dos muestres cada una. Como primeros indicadores de la calidad del agua se analizaron diversos parámetros tanto físicos, químicos y microbiológicos, evaluándose el oxígeno disuelto, pH, temperatura, PO₄, NO₃, turbidez, conductividad, salinidad, solidos totales disueltos, presencia de coliformes totales y *Escherichia coli* como principal indicador microbiológico de contaminación. Los resultados obtenidos de los distintos parámetros obtenidos confirman que los ríos Guano, Guate, Chibunga y Chambo se encuentran contaminados¹⁹.

Antimicrobiano

Son sustancias con capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano los cuales pueden ser utilizados en el tratamiento de enfermedades infecciosas²⁰.

Los antibióticos existen de diversas sustancias antimicrobianas y tienen origen biológico, por ejemplo, la penicilina el cual es producida por distintos mohos del género *Penicillium* y el prototipo de los antibióticos de cefalosporinas resultado de otros mohos. La mayor fuente natural de antibióticos es el género *Streptomyces*, cuyas bacterias son grampositivas que se hallan en sedimentos y suelos de agua dulce. La industria encargada en los procedimientos de la fermentación son los que producen antibióticos de forma masiva a través de diversas técnicas para la obtención de estos antimicrobianos²⁰.

Bacterias de interés clínico

La mayoría de las enfermedades transmitidas por el agua son causadas por microorganismos encontrados en agua dulce y salada, que generalmente son contaminadas por las heces humanas y animales. La manera más frecuente de contaminación es a través de la ingestión, ya sea por comer alimentos lavados con agua infectada o bebiéndola²¹.

En las regiones donde no hay saneamiento básico las enfermedades infecciosas pueden suceder debido a la contaminación del agua de ríos, lagos, arroyos y, en algunos casos,

inclusive del mar por desechos humanos y animales. El modo más común de contaminación del agua es a través de la descarga de aguas residuales sin tratamiento²¹. Bacterias tales como *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, pueden contaminar las aguas y los humanos que entran en contacto con ellas en lugares donde no hay saneamiento básico como playas, ríos y lagos que reciben aguas residuales no tratadas, produciendo cuadros diarreicos²¹.

Enterobacterias

Las enterobacterias son un grupo de bacilos gramnegativos de suma importancia clínica, se han descrito cincuenta géneros y cientos de especies y subespecies. Las enterobacterias son microorganismos ubicuos se encuentran en el suelo, agua, vegetación además forma parte microbiota de muchos animales, incluido el ser humano²².

Los microorganismos pertenecientes a esta familia tienen un diámetro de longitud de 2 - 4 µm convirtiéndolas unas de las más grandes de las bacterias. No forman esporas, fermentan la glucosa, reducen los nitratos a nitritos y son oxidasa negativa. Se proliferan con mucha facilidad en medios simples²³.

Escherichia coli

Escherichia coli son bacilos gramnegativos, motilidad positiva, fermentan la lactosa, producen coloraciones ácidas (color rosado) en agar MacConkey, producen indol y gas²³. *E.coli* está asociada a patologías que incluyen gastroenteritis e infecciones extraintestinales, infecciones del tracto urinario en su gran mayoría, meningitis, sepsis entre otras²².

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae es una bacteria de forma bacilar, gramnegativa a la tinción de Gram, anaerobia facultativa, motilidad negativa y generalmente encapsulada, se encuentra ampliamente esparcida en el ambiente, y presente de manera especial en las superficies mucosas de mamíferos; en los seres humanos coloniza la nasofaringe, el tracto gastrointestinal²⁴ y se encuentran en infecciones del tracto urinario, bacteriemia con lesiones focales entre otras²⁵.

Citrobacter

Son un grupo de bacilos gramnegativos, productores de gas y H₂S. Las cepas de *Citrobacter* pueden estar presentes en la flora intestinal normal de las personas y causar infecciones oportunistas, aunque es poco frecuente. Pese a los pocos reportes de tener un nexo con enfermedades diarreicas, la evidencia disponible a la fecha no indica que *Citrobacter* deba considerarse como patógeno entérico. *Citrobacter freundii* se ha asociado a patologías como meningitis neonatal y absceso cerebral²³.

Enterobacter

En el género *Enterobacter* tenemos a tres principales especies de importancia clínica ellos tenemos: *E. cloacae*, *E. aerogenes* y *E. zakazakii*. Estas bacterias son fermentadoras de lactosa, son móviles y pueden tener cápsulas que producen colonias mucoides. Normalmente se asocian a patologías como neumonía, infecciones del tracto urinario e infecciones de heridas y dispositivos²⁵.

Pseudomonas

Son bacilos gramnegativos delgados, aerobios, no fermentadores de lactosa y móviles. Existen un considerable grupo de especies de *Pseudomonas*, la más importante *Pseudomonas aeruginosa* debido a su patogenicidad, sin embargo, los otros tipos de *Pseudomonas* son de interés clínico, aunque rara vez causan enfermedad y con frecuencia se encuentran como contaminantes y como colonizadores de superficie²³. Han sido clasificados en fluorescente y no fluorescente según su homología de rRNA, la cual consiste en la identificación genotípica de acuerdo con el análisis del número de copias de operones ribosómicos en el genoma bacteriano, permaneciendo en cierto grado similar según la familia, género y especie³⁹ (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de especies de *Pseudomonas* de interés clínico.

Grupo de homología de rRNA y subgrupo	Género y especie
Grupo fluorescente	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	<i>Pseudomonas putida</i>
Grupo no fluorescente	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
	<i>Pseudomonas mendocinas</i>

Fuente: Jawetz *et al.* Microbiología médica 25 va edición, pág. 227.

Tipo de mecanismos de acción de los antimicrobianos

Los antimicrobianos actúan de diversas formas: por toxicidad selectiva, inhibiendo la síntesis y función de la membrana celular, inhibiendo la síntesis de proteínas o inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos²⁵.

▪ **Toxicidad selectiva**

La toxicidad selectiva depende del antimicrobiano ideal, lo que significa que el antibiótico es perjudicial para el microorganismo patógeno sin dañar al huésped. La toxicidad selectiva comúnmente es relativa y no absoluta, es decir, que un antibiótico debe presentar una concentración que tolere el huésped y a la vez nocivo para el microorganismo infeccioso²⁵.

▪ **Inhibición de la síntesis de la pared celular**

La pared celular bacteriana contiene un polímero complejo y el cual distinto desde el punto de vista químico, que es un peptidoglucano que consta de polisacáridos y un polipéptido con numerosos enlaces cruzados. Los polisacáridos normalmente contienen a los aminoglúcidos N-acetilglucosamina y ácido acetilmurámico, este último se halla únicamente en las bacterias. Los β -lactámicos son inhibidores selectivos de la síntesis de la pared celular bacteriana, por lo tanto, son activos contra las bacterias en proliferación. Esta inhibición es únicamente una de las diversas actividades de estos antibióticos, pero es la que mejor se conoce, siendo el paso inicial en la acción farmacológica en enlazar al antibiótico a los receptores celulares²⁵.

▪ **Inhibición de la función de la membrana celular**

La membrana celular de las bacterias tiene una estructura diferente ya que sirve como una barrera selectiva de permeabilidad y cuando es destruida tanto las macromoléculas e iones que se encuentran en el interior de las células salen provocando el daño y muerte de la célula. Es dañada con mucha facilidad por ciertos fármacos que interfieren específicamente con la biosíntesis de las membranas citoplasmáticas²⁵.

▪ **Inhibición de la síntesis de proteínas**

La síntesis proteica se presenta en los ribosomas siendo uno de los procesos más frecuentemente afectados por la acción de los antimicrobianos, y su inhibición selectiva es posible gracias a las diferencias estructurales en la composición química de las subunidades de los ribosomas bacterianos. Estos ribosomas están formados por dos subunidades 30S y 50S, que contienen ARN ribosómico y diversas proteínas llamadas S (small 30S) o L (large 50S). En esta estructura, se encuentran diferentes componentes que pueden ser lugares de unión para los antimicrobianos, por ejemplo, determinados

nucleótidos para las oxazolidinonas, algunas proteínas S para las tetraciclinas o proteínas L para el cloranfenicol, el mecanismo preciso de acción todavía se desconoce⁴¹.

▪ **Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos**

En la inhibición que existe en la síntesis de los ácidos nucleicos, el ácido fólico representa la principal vitamina, donde a través de una secuencia de pasos enzimáticos se forman los ácidos desoxirribonucleicos/ribonucleico. Algunas variedades de fármacos como las quinolonas, pirimetamina, rifampicina, sulfonamidas, trimetropim y trimetrexato actúan inhibiendo los ácidos nucleicos, ejemplo las quinolonas inhiben esta síntesis microbiana en el ADN bloqueando a la DNA girasa²⁵.

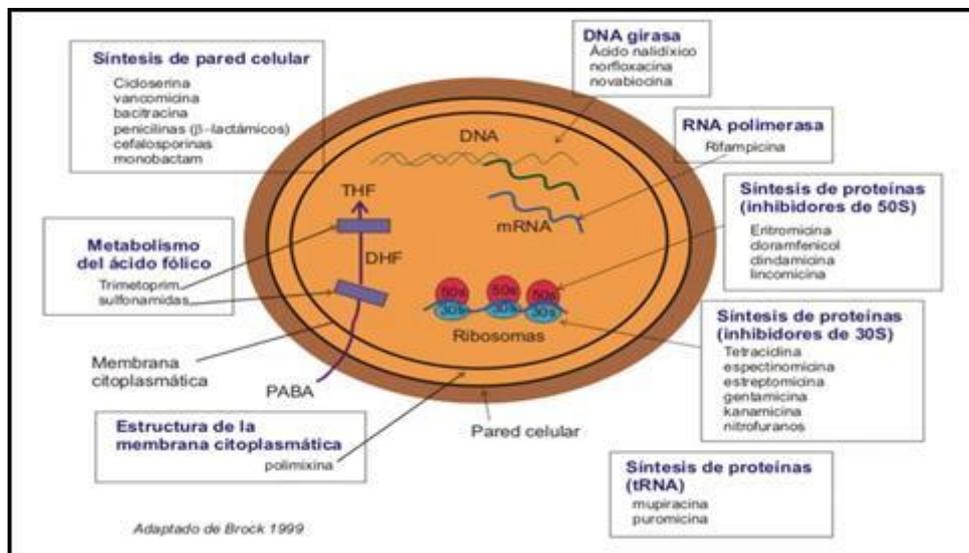


Figura 1. Modo de acción de los principales agentes quimioterapéuticos antimicrobianos.

Fuente: Madigan *et al.* Brock Biología de los microorganismos 12ª edición. Addison Wesley, 2009

Mecanismos de resistencia

La resistencia de las bacterias a los antibióticos es un problema que se ha complicado día tras día, más aún en los últimos años, pues como cualquier especie viviente, las bacterias tienen la capacidad de desarrollar diferentes mecanismos de defensa ante cualquier tipo de amenaza²⁶.

La relación entre el ecosistema acuático y los mecanismos de resistencia existe debido que las bacterias potencialmente patógenas se liberan constantemente en aguas residuales, las cuales muchas de ellas albergan genes de resistencia y a la vez estos se

insertan en reservorios móviles, permitiendo la propagación entre diferentes grupos de bacterias que viven en el medio ambiente acuático⁶.

La incidencia de bacterias resistentes a antibióticos en el medio acuático se ha incrementado como consecuencia de la utilización a gran escala de los antibióticos, se ha detectado en bacterias presentes en líquidos cloacales urbanos, en líquidos residuales hospitalarios, en aguas subterráneas, en ríos contaminados con descargas cloacales. Pocos estudios se han realizado con los efluentes conocidos como aguas grises a pesar de ser una de las formas clásicas de eliminación de aguas residuales en las grandes zonas periurbanas de Latinoamérica²⁷.

Según Camou *et al*¹⁰, la exposición a antibióticos no solo contribuye a la selección de mutantes resistentes, sino que además acelera las tasas de mutación y aparentemente no solo es su vertido al ambiente el que podrían ejercer presión selectiva para la proliferación de cepas resistentes, sino también la contaminación con metales pesados¹⁰.

Resistencia natural

La resistencia natural de ciertas cepas es un mecanismo permanente determinado por su genética y sin ninguna relación a la administración y dosificación de antibióticos. Entre algunos ejemplos se menciona los siguientes: *Proteus mirabilis* presenta una resistencia innata a las tetraciclinas debido a un proceso natural de expulsión del antibiótico, la causa se debe a la presencia de un lipopolisacárido que tiene función disminuir la afinidad de los antibióticos a su sitio blanco. *Klebsiella pneumoniae* posee una resistencia a las penicilinas debido a su producción natural de beta lactamasas²⁸.

Resistencia adquirida

La resistencia adquirida es una característica propia de una determinada especie de microorganismo que, siendo sensible a un antibiótico, esta condición cambia a bacteria resistente debido a una modificación genética ya sea por una mutación o la adquisición de genes de resistencia, a través plásmidos, transposones e integrones²⁸.

Tipos de mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos

La resistencia bacteriana puede presentarse de manera natural o intrínseca y adquirida, y debe ser analizada de diferentes formas²⁶. Dentro de los principales mecanismos de resistencia se encuentran:

- **Inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura química**

Los fenotipos de resistencia antimicrobiana por alteración destrucción de la estructura química es un proceso en donde las enzimas que destruyen esta estructura son conocidas como beta-lactamasas las cuales se especifican por hidrolizar el núcleo beta-lactámico separando el enlace amida, otra de las enzimas conocidas que catalizan la hidrólisis del anillo de lactosa del antibiótico es la eritromicina esterasa²⁸.

- **Bombas de expulsión del antibiótico del interior de la célula bacteriana**

Las bombas de expulsión operan transportando el antibiótico del espacio periplásmico hacia el exterior de la célula sin alteraciones, evitando así que llegue a su punto de acción antimicrobiana, estas bombas de expulsión que se encuentran en las bacterias son dependientes de energía, por tanto, logran comportarse como sistemas de eliminación de uno o más antibióticos, este sistema de mecanismo es comúnmente utilizado por las bacterias gramnegativas²⁶⁻²⁸.

- **Alteración en las barreras de permeabilidad**

Esta forma de resistencia se presenta debido a las alteraciones que se dan en los receptores de determinados antimicrobianos o se debe también a las modificaciones estructurales en la membrana de la célula bacteriana que influye en la permeabilidad, afectando en la capacidad de transporte activo a través de la pared celular²⁸.

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

Tipo de Investigación

Enfoque

Carácter cualitativo: se realizó una descripción de las variables de estudio con categorías de análisis, buscando determinar la existencia o ausencia de resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas aisladas del Río Chambo.

De Campo: se recolectaron las muestras de seis diferentes puntos geográficos del Río Chambo, se aislaron e identificaron las diferentes bacterias de interés clínico y su resistencia antimicrobiana.

Cuasi experimental: se manipularon las variables, es decir, se alteraron las condiciones existentes.

Descriptiva: se recolectó la información de manera conjunta sobre las variables de estudio, ya que, se describió la resistencia antimicrobiana de las bacterias patógenas presentes en las aguas de riego del Río Chambo.

Corte

Corte transversal: se ejecutó en un lugar determinado (caudal del Río Chambo) y tiempo específico, durante el período de noviembre 2018- enero 2019.

Determinación de la población y muestra

Población: 17 cepas bacterianas aisladas de las aguas del Río Chambo

Muestra: 11 bacterias patógenas aisladas.

Técnicas y procedimientos

Identificación del área de estudio y toma de muestras

En este trabajo se utilizó muestra de agua de seis puntos diferentes de riego del Río Chambo, que recorre de norte a sur una longitud de 144,49 km, en donde se topan unos 33 ríos de tamaño muy variable según la época del año y la ubicación geográfica entre los cuales tenemos el Río Guano, Chibunga entre otros. En recorrido de este río lo hace atravesando distintos cantones como Alausí, Guamote, Colta, Chambo, Riobamba, Penipe y Guano donde se establecieron diferentes puntos estratégicos de muestreo en cada uno de estos cantones de la provincia de Chimborazo¹³. (Ver Tabla N°2)

Toma de muestra

Antes de la toma de muestra, se identificaron los diferentes lugares, además de la altitud, temperatura del ambiente, temperatura del lugar y pH. Se utilizaron frascos estériles de plástico, llenándolos las $\frac{3}{4}$ partes del recipiente. Para realizar la toma de muestra se colocó el frasco en contra del caudal del agua de riego, se realizaron tres lavados previos con la misma agua antes de tomar la muestra final, posteriormente se tapó y asignó su respectiva codificación al recipiente. Cabe recalcar que el muestreo se realizó por duplicado. Las muestras obtenidas se transportaron con el sistema triple embalaje al Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud, UNACH donde se realizó el respectivo análisis microbiológico.

Tabla 2. Descripción de ubicación y altitud en cada estación de muestreo.

Puntos	Estación de muestreo	Ubicación	Altitud
Punto 1	San Antonio de Cebadas	A 200 m de la Vía Riobamba – Macas	2979
Punto 2	Cebadas	Entrada a Cebadas	2907
Punto 3	Licto	A 250 m de la Central Hidroeléctrica Alao.	2730
Punto 4	Chambo	Entrada a Chambo.	2569
Punto 5	Cubijés	Entrada a Cubijés.	2479
Punto 6	Penipe	Entrada de Penipe.	2361

Aislamiento de bacterias de interés clínico presentes en la muestra

Una vez transportadas las muestras al laboratorio se manipuló con el mayor de los cuidados para evitar una posible contaminación al momento del análisis, para ello se utilizó la cámara de flujo laminar que se desinfectó con alcohol al 70% y luz ultravioleta durante 20 minutos.

Técnica de aislamiento de colonias

El cultivo inicial se realizó en el agar cistina lactosa deficiente en electrolitos (CLED) mediante la técnica de arrastre o dispersión, posteriormente se incubó en posición invertida a 37°C durante 24 horas, en condiciones de aerobiosis y microaerofilia. Con el objetivo de aislar las colonias se realizó una resiembra para obtener colonias puras en el Agar Sangre, McConkey y se incubó a 37°C en posición invertida durante 24 horas.

Tinción de Gram

La tinción de Gram es de suma importancia para diferenciar las propiedades de la pared celular de las bacterias y su forma. Para la utilización de esta técnica de coloración se

colocó una gota de suero fisiológico y se realizó un frotis de la colonia pura con un palillo estéril. Se fijó la muestra con calor aproximadamente tres veces. Para el proceso de tinción se cubrió con cristal violeta por un minuto, se añadió lugol por un minuto, se decoloró con alcohol cetona durante 30 segundos aproximadamente y finalmente se añadió safranina por un minuto. Cabe recalcar que luego de la adición de cada reactivo, se procedió a enjuagar con agua. Se dejó secar la placa a temperatura ambiente y se realizó la observación con un microscopio óptico a 100x con aceite de inmersión

Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias aisladas

Para la identificación de las bacterias de interés clínico aisladas de las muestras de agua del riego del Río Chambo, se utilizaron diferentes pruebas entre ellas detección de enzimas (catalasa, oxidasa, ureasa y coagulasa), metabolismo de proteínas y carbohidratos (Triple azúcar hierro agar TSI, citrato, Lisina Hierro agar LIA, motilidad indol ácido sulfhídrico SIM).

Medición de la resistencia antibiótica en bacterias aisladas

Posterior a la identificación de la bacteria se evaluó la resistencia y sensibilidad a los diferentes antibióticos. Para aquello se utilizó la técnica de Kirby Bauer llamada también difusión en disco. Se utilizaron los siguientes discos amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), ceftazidima (CAZ), cefotaxime (CTX), cefepime (FEP), ciprofloxacina (CIP), ácido nalidíxico (W), imipenem (IPM), meropenem (MEM).

Para la realización de la técnica se preparó una dilución en NaCl 0,9% de cada colonia bacteriana aislada para compararla a 0,5 de turbidez con el patrón McFarland. Se embebió un hisopo en la suspensión bacteriana y se sembró en Müller Hinton cubriendo la mayor parte del espacio distribuido en un ángulo de 60°. Se colocaron los discos de sensibilidad con una pinza estéril a 15 mm del borde y 20 mm de distancia entre discos. Las placas se incubaron de forma invertida a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se realizó la lectura de los halos de susceptibilidad y resistencia según el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) 2018.

Procesamiento estadístico

Se realizó tablas descriptivas de los resultados obtenidos con frecuencia y porcentaje en la aplicación de hojas de cálculo que pertenece al sistema operativo Microsoft Office 2013.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se seleccionaron seis sitios estratégicos tomando como referencia la longitud del río y las zonas agrícolas de los distintos sectores para la toma de muestra de las aguas del Río Chambo. Los puntos elegidos fueron: San Antonio de Cebadas, Cebadas, Licto, Chambo, Cubijés y Penipe.

En la tabla 3 se detallan los datos de temperatura y pH de cada estación de muestreo, observando que la temperatura del agua en los distintos puntos de referencia oscila entre los 15°C y 17°C. El pH fue de 7 en la mayoría de los sitios de referencia, mientras que en Cebadas el pH fue de 8.

Tabla 3. Datos de temperatura y pH obtenidos de las aguas del Río Chambo de acuerdo con cada estación de muestreo.

TEMPERATURA

PUNTOS	LUGAR	AMBIENTE (°C)	AGUA (°C)	pH
Punto 1	San Antonio de cebadas	21	15	7
Punto 2	Cebadas	21	15	8
Punto 3	Licto	24	16	7
Punto 4	Chambo	22	16	7
Punto 5	Cubijés	22	17	7
Punto 6	Penipe	19	17	7

Los factores ambientales que influyen en el crecimiento bacteriano son los físicos y químicos, la variación de temperatura y pH pueden modificar la velocidad de crecimiento de las bacterias³⁰. Las bacterias que son patógenas para el humano crecen de manera eficaz a una temperatura próxima a los 37° C, las temperaturas bajas retardan el crecimiento de éstos, mientras que las altas temperaturas como los 65° C producen cambios en los microorganismos e incluso la destrucción de estos. El pH es un factor fisicoquímico que afecta el crecimiento bacteriano, el cual se considera que un entorno adecuado para el desarrollo de microorganismos debe ser un pH neutro^{12,31}, por lo tanto, las fuentes hídricas son susceptibles a la contaminación, como es el caso de las muestras

recolectadas para este estudio siendo el pH en la mayoría de las estaciones de muestreo neutro.

En la tabla 4 se evidencian las diferentes bacterias de interés clínico aisladas del Río Chambo, aislándose e identificándose 9 especies la familia enterobacteriaceae (81,8 %) y 2 especies de la familia pseudomonadaceae (18,2%), siendo todas ellas Gram negativas.

Tabla 4. Bacterias de interés clínico aisladas del Río Chambo.

Hallazgo bacteriano		Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Familia	Especie		
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i> (2)	9	81,8
	<i>Citrobacter freundii</i>		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
	<i>Enterobacter aerogenes</i> (4)		
	<i>Klebsiella oxytoca</i>		
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> spp (2)	2	18,2
TOTAL		11	100%

Arcos Pulido *et al*³² y Ríos Tobón *et al*³⁰, ratifican los resultados obtenidos ya que explican que los microorganismos patógenos que se encuentran comúnmente en aguas contaminadas son las bacterias entéricas, virus, parásitos como los protozoarios y helmintos. Entre las vías de contaminación en los humanos se incluyen los alimentos que se consumen crudos y han sido cultivadas con aguas de riego contaminadas. Las bacterias aisladas en este trabajo pertenecen en su mayoría a la familia Enterobacteriaceae, que forman parte del grupo de coliformes, su presencia indica contaminación reciente y su capacidad de multiplicarse fuera del intestino puede verse favorecida por condiciones ambientales de temperatura, pH y materia orgánica^{30,32}. Las *Pseudomonas* spp se encuentran comúnmente en el suelo y en el agua, algunas de sus especies son clasificadas como patógenas y patógenas oportunistas para el humano³².

En la tabla 5 se representa la distribución de las bacterias de interés clínico aisladas en cada uno de los puntos de muestreo, observándose que en el sector de Cebadas y Penipe

fueron encontradas 3 especies (27,2 %), mientras Chambo y Cubijés 2 especies (18,1 %) y Licto 2 especies (18,1 %).

Tabla 5. Distribución de las bacterias de interés clínico según la estación geográfica de muestreo.

Estación de muestreo	Bacterias patógenas							
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>C. freundii</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Punto 1. San Antonio de Cebadas							0	0
Punto 2. Cebadas			1	1		1	3	27,2
Punto 3. Licto						1	1	9,4
Punto 4. Chambo	1	1					2	18,1
Punto 5. Cubijés	1				1		2	18,1
Punto 6. Penipe				3			3	27,2
Total							11	100%

Cebadas y Penipe son los sectores donde se aisló mayor cantidad de especies bacterianas patógenas con un porcentaje 27,2%, seguido de Chambo y Cubijés 18,1%; datos que ratifican que en estas aguas habitan diversas especies de interés clínico que son patógenas para el ser humano.

Diferentes autores describen que en diversos puntos del río Chambo existe la presencia de coliformes fecales y *E. coli* como bacteria indicadora que demuestra la presencia de microorganismos, por tanto, indica contaminación en este río. La presencia de coliformes fecales presenta un mínimo cambio en ambas épocas del año tanto en lluviosa y secas, en algunos puntos no se presenta valores elevados en la presencia de coliformes esto debido tanto a actividades humanas y ganaderas que no se encuentren próximas al río ya que estos son causas al incremento microbiano, también describen

que la causa que no exista mayor presencia de coliformes fecales podría deberse a la inclusión de aguas limpias que promueven una dilución de la contaminación³³⁻³⁴.

En la tabla 6 se evidencia el patrón de susceptibilidad y resistencia de las bacterias aisladas de la familia enterobacteriaceae, *Enterobacter aerogenes* (cepa 2) presenta resistencia 3/8 antibióticos, *Enterobacter aerogenes* (cepa 1), *E. coli* (cepa 1), *Enterobacter aerogenes* (cepa 3) y *Enterobacter aerogenes* (cepa 4) son resistentes a dos antibióticos.

Tabla 6. Patrón de susceptibilidad y resistencia de las bacterias de interés clínico de la familia enterobacteriaceae.

Microorganismo	CTX	CAZ	AMC	FEP	CIP	NA	IPM	MEM	FOX
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	–
<i>Klebsiella oxytoca</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	–
<i>Enterobacter aerogenes</i> (cepa 1)	S	S	S	S	S	R	S	S	–
<i>Escherichia coli</i> (cepa 1)	S	S	S	S	S	R	S	S	–
<i>Escherichia coli</i> (cepa 2)	S	S	S	S	S	S	S	S	–
<i>Citrobacter freundii</i>	S	S	R*	S	S	S	S	S	–
<i>Enterobacter aerogenes</i> (cepa 2)	S	S	R	S	S	R	S	S	–
<i>Enterobacter aerogenes</i> (cepa 3)	S	S	S	S	S	R	S	S	–
<i>Enterobacter aerogenes</i> (cepa 4)	S	S	R	S	S	S	S	S	R

CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, CEP: cefepime, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidixico, IPM: imipenem, MEM: meropenem. FOX: cefoxitin, R*: Resistencia natural.

Los resultados obtenidos muestran que *Enterobacter aerogenes* (cepa 1), *Escherichia coli* (cepa 1), *Enterobacter aerogenes* (cepa 2), *Enterobacter aerogenes* (cepa 3) fenotípicamente muestran resistencia a las quinolonas. (**Imagen 1**), este mecanismo de resistencia se expresa con la resistencia de ácido nalidixico y sensibilidad por parte de

ciprofloxacina, lo que indica una posible una mutación en la zona llamada QRDR (Determinante de Resistencia a Quinolonas) del gen *gyrA* del ADN girasa, lo que produce una serie de proteínas para que ya no puedan ser ligadas a las quinolonas. Si el microorganismo presenta esta mutación las quinolonas son incapaces de inhibir la replicación del ADN lo que conlleva a una resistencia al antibiótico³⁶.



Imagen 1. Antibiograma de *Escherichia coli*

Otro resultado a destacar es que la bacteria *Enterobacter aerogenes* (cepa 2) además de mostrar resistencia a las quinolonas también posee una resistencia a los inhibidores de Betalactámicos (**Imagen 2**), el microorganismo produce una enzima llamada betalactamasa de tipo IRT que la hace resistente a aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas y un poco sensibilidad o resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico³⁷.

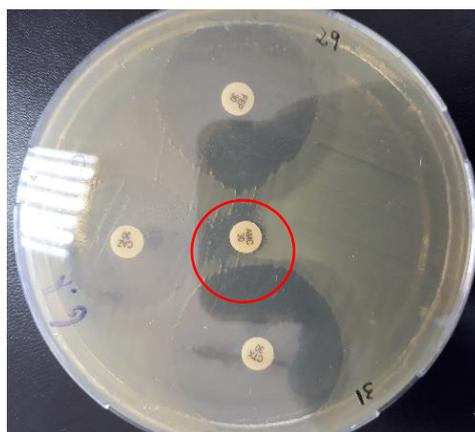


Imagen 2. Antibiograma de *Enterobacter aerogenes*.

Finalmente, otro resultado a tomar en cuenta es la resistencia de *Enterobacter aerogenes* (cepa 4) mediada por las betalactamasas de tipo AmpC, este mecanismo lo

podemos apreciar en el antibiograma con la resistencia a amoxicilina/clavulánico (**Imagen 3**) y ceftioxitin (**Imagen 4**). La AmpC es una betalactamasa de tipo I codificada por plásmido o en cromosoma. El gen AmpC concede resistencia a aminopenicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, cefamicinas y betalactámicos más inhibidores de betalactamasas³⁸.

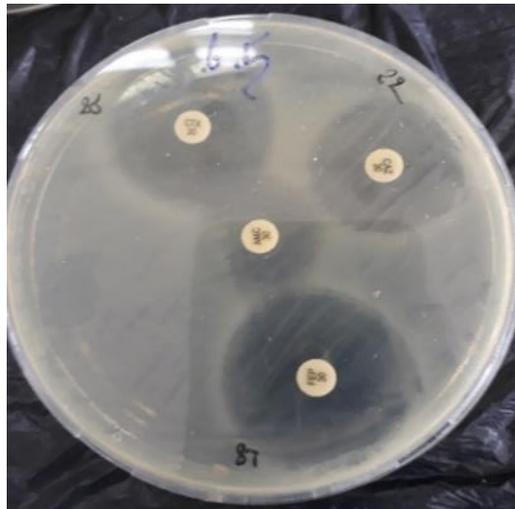


Imagen 3. Resistencia a AMC



Imagen 4. Resistencia a FOX

En la Tabla 7 se presenta el patrón de susceptibilidad y resistencia de las demás bacterias gramnegativas aisladas en los diferentes puntos de muestreo. Evidenciando que *Pseudomonas* spp no muestra ningún tipo de mecanismo resistencia a los antibióticos utilizados.

Tabla 7. Patrón de susceptibilidad y resistencia de las demás bacterias gramnegativas que no pertenecen a la familia enterobacteriaceae.

Microorganismo	CTX	CAZ	AMC	FEP	CIP	NA	IPM	MEM
<i>Pseudomonas</i> sp (punto 2)	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Pseudomonas</i> sp (punto 3)	S	S	S	S	S	S	S	S

CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, CEP: cefepime, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidixico, IPM: imipenem, MEM: meropenem.

Acorde con los resultados conseguidos, se encontró *Pseudomonas* spp en dos de los distintos puntos de riego del Río Chambo, los cuales no presentaron ningún tipo de mecanismo de resistencia a antibacterianos, sin embargo, estas bacterias han sido aisladas de aguas de riego y vegetales en investigaciones previas y se han visto comprometidas en distintas afecciones a la salud, incluyendo infecciones oportunistas, es por esto que la probabilidad de usar agua contaminada para los cultivos y el manejo de los mismos, podría incrementar la carga bacteriana y la propagación de estos patógenos³⁵.

CONCLUSIONES

1. Se establecieron seis puntos estratégicos para la toma de muestra a lo largo del Río Chambo tomando en cuenta la longitud del mismo y estos lugares fueron: San Antonio de Cebadas, Cebadas, Chambo, Licto, Cubijés y Penipe. Se evaluó la temperatura y pH en cada estación de muestreo y los resultados obtenidos mostraron una situación factible para su crecimiento.
2. Se aislaron e identificaron once bacterias patógenas procedentes de las diferentes estaciones de muestreo del Río Chambo, evidenciando que en Cebadas y Penipe se encontró un 27,2 % de bacterias patógenas aisladas, fueron identificadas mediante pruebas fisiológicas y bioquímicas para gramnegativas resultando: *Pseudomonas* spp y especies de enterobacterias como *E. coli* (2), *E. aerogenes* (4), *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *C. freundii*.
3. Los resultados de la resistencia antimicrobiana fenotípica de las cepas aisladas de interés clínico fue la presencia de resistencia a cefoxitin, ácido nalidíxico y amoxicilina/ácido clavulánico. Estos resultados nos llevan a confirmar que realmente existen bacterias de interés clínico resistentes a antibióticos de uso médico, que pueden ser la génesis de infecciones tanto de los agricultores como de la población que consume los vegetales cultivados con esas aguas.

RECOMENDACIONES

1. En el Río Chambo se encontró bacterias de interés clínico resistentes a antibióticos lo cual es preocupante para la sociedad. El Ministerio de Salud junto con el de Ambiente deben tomar medidas para mejorar la calidad del agua de este río.
2. Se recomienda concientizar a la población sobre tres aspectos fundamentales: informar sobre la contaminación encontrada en el Río Chambo, mejorar las prácticas sobre la eliminación de basura y por último realizar charlas sobre el correcto uso de los antibióticos.
3. Motivar más investigaciones de este tipo en diferentes ríos de nuestra provincia para confirmar nuestros resultados.
4. Replicar proyectos similares en lo que respecta a la resistencia bacteriana desde el punto de vista genotípico para obtener resultados mucho más precisos y variados en cuanto resistencia antimicrobiana en el Río Chambo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ecologiaverde.com [Internet]. España: Linktomeia; 2018 [actualizado 12 de abril de 2018; citado 18 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://www.ecologiaverde.com/importancia-del-agua-para-el-planeta-y-el-ser-humano-179.html>
2. diarioresponsable.com [Internet]. España: La RSE Global; 2017 [actualizado 24 de marzo 2017; citado 19 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://diarioresponsable.com/opinion/24610-el-agua-un-vital-liquido-para-la-vida>.
3. Alós J. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. [Internet]. 2015 [citado 19 de octubre de 2018]; 33(10): 693 Disponible en: DOI: 10.1016/j.eimc.2014.10.004
4. Trabit A, Crandon J, Nicolau D. Antimicrobial resistance: impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials. *Expert Opin. Pharmacother* [Internet]. 2014 [citado 27 de enero de 2019]; 16(2): 159-177. Disponible en: <https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1517/14656566.2015.993381>
5. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health* [Internet]. 2015 [citado 27 de enero de 2019]; 109(7): 309-318. Disponible en: <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>
6. Acevedo RL, Severiche CA, Jaimes JC. Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. *Producción + Limpia* [Internet]. 2015 [citado 22 de noviembre de 2018]; 10(2): 156. Disponible en: <http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/pl/article/view/906/629>
7. Eltelegrafo.com [Internet]. Ecuador: másQmenos; 2014 [actualizado 16 de junio de 2014; citado 22 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://www.elfelegrafo.com.ec/noticias/masqmenos/1/el-agua-siembra-riega-y-cosecha-desarrollo>
8. Constitución de la República del Ecuador 2008 [Internet]. Ediciones Legales, 2016 [citado 22 de noviembre de 2018]; p 4. Disponible en: <http://www.pucesi.edu.ec/webs/wp-content/uploads/2018/03/Constituci%C3%B3n-de-la-Republica-2008..pdf>
9. Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021-Toda una vida [Internet]. Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo - Senplades 2017 [citado 22 de noviembre de 2018]; p. 54-84. Disponible en: http://www.planificacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/10/PNBV-26-OCT-FINAL_0K.compressed1.pdf
10. Camou T, Zunino P, Hortal M. Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. *Rev Méd del Urug* [Internet]. 2017 [citado 22 de noviembre de 2018]; 33(4): 278-278. Disponible en: doi: 10.29193/RMU.34.3.6
11. Elpais.com [Internet]. España: 2016 [actualizado 2 de septiembre de 2016; citado 22 de noviembre de 2018]. Disponible en: https://elpais.com/elpais/2016/09/01/ciencia/1472719506_387465.html
12. Mur L, Marcillo K. Resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas aisladas del regadío del río Chibunga [Internet]. 2018 [citado 22 de enero de 2019]. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/5098>
13. Aportes a la planificación para la gestión integral de los recursos hídricos: Contribución del Comité de la Subcuenca del río Chambo [Internet]. 2015

- [citado 22 de noviembre de 2018]; p 30. Disponible en: <http://cesa.org.ec/wp-content/uploads/2018/07/aportes-a-la-planificacic3b3n-para-la-girrh-presentado-3.pdf>
14. Medina EK, Mancilla OR, Larios MM, Guevara RD, Olguín JI, Barreto OA. Calidad del agua para riego y suelos agrícolas en Tuxcacuesco, Jalisco. IDESIA [Internet]. 2016 [citado 22 de noviembre de 2018]; 34(6): 51-52. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/idesia/2016nahead/aop3516.pdf>
 15. Pérez CB, Ricardo MP. Calidad del agua de riego y su posible efecto en los rendimientos agrícolas en la Empresa de Cultivos Varios Sierra de Cubitas. Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias [Internet]. 2011 [citado 22 de noviembre de 2018]; 20(3): 19-20. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rcta/v20n3/rcta03311.pdf>
 16. Medina EK, Mancilla OR, Larios MM, Guevara RD, Olguín JI, Barreto OA. Calidad del agua para riego y suelos agrícolas en Tuxcacuesco, Jalisco. IDESIA [Internet]. 2016 [citado 22 de noviembre de 2018]; 34(6): 51-52. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/idesia/2016nahead/aop3516.pdf>
 17. Díaz E, Alavarado AR, Camacho KE. El tratamiento de agua residual doméstica para el desarrollo local sostenible: el caso de la técnica del sistema unitario de tratamiento de aguas, nutrientes y energía (SUTRANE) en San Miguel Almaya, México. Quivera [Internet]. 2012 [citado 22 de noviembre de 2018]; 14(1): 51. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/401/40123894005.pdf>
 18. Blazquez P, Montero C. Reutilización de agua en Bahía Blanca Plata 3era Cuenca. edUTecNe [Internet]. 2010. [citado 22 de noviembre de 2018]. Disponible en: http://www.edutecne.utn.edu.ar/agua/agua_reutilizacion.pdf
 19. Subcuencachambo.wordpress.com. [Internet]. Ecuador: 2015 [actualizado 6 de abril de 2015; citado 22 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://subcuencachambo.wordpress.com/diagnostico-de-la-subcuenca/>
 20. Kenneth J, Ryan, Ray G. Microbiología Médica. quinta edición; 2011
 21. mdsau.de.com/es [Internet]. Brasil: 2018 [actualizado 11 de agosto de 2018; citado 22 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://www.mdsau.de.com/es/2016/06/enfermedades-transmitidas-por-el-agua.html>
 22. Murray P, Ken R, Michael P. Microbiología Médica. 7ma edición. España, Elsevier 2014. p 258-260.
 23. Sherris. Microbiología Medica, 5ta edición, Mc Graw Hill. 2010. p 441-470
 24. Echeverri LM, Cataño JC. Klebsiella pneumoniae como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. Universidad de Antioquia. Iatreia [Internet]. 2010 [citado 12 de noviembre de 2018]; 23(3). Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180518994006>
 25. Jawetz, Melnick, Adelberg. Microbiología Médica. 25 edición, Mc Graw Hill. 2011. p 219, 339-341.
 26. Rojas G, Ulate L. Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. Revista médica de Costa Rica y Centroamérica LXXIII [Internet]. 2016; [citado 12 de febrero de 2018]; 621(73): 758. Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/621/art03.pdf>
 27. Núñez L, Tornello C, Moretton J. Bacterias resistentes a antibióticos en aguas grises como agentes de riesgo sanitario. Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science [Internet]. 2012 [citado 12 de febrero de 2018]; 7(1): 236. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/ambiagua/v7n1/v7n1a18.pdf>

28. Pérez HJ, Robles A. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica* [Internet]. 2013 [citado 12 de febrero de 2018]; 4(3). Disponible en: www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2013/md133i.pdf
29. Tafur J, Torres J, Villegas M. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. CIDEIM [Internet]. 2008 [citado 12 de febrero de 2018]; 12(3): 219. Disponible en: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apuacuba/mecanismos_de_resistencia_a_los_antibioticos_en_bacterias_gram_negativas.pdf
30. Ríos S, Agudelo R, Gutiérrez L. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Revista Facultad Nacional. Salud Pública* [Internet]. 2017 [citado 10 febrero de 2018]; 35(2):238-240. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v35n2/0120-386X-rfnsp-35-02-00236.pdf>
31. Madigan MT, Brock TD, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH (Daniel H, Stahl DA, et al. Brock. *Biología de los microorganismos* [Internet]. 14va edición. Pearson; 2015 [citado 10 de febrero de 2018]; 1132 p. Disponible en: http://www.ingebook.com/ib/NPcd/IB_BooksVis?cod_primaria=1000187&codigo_libro=5850
32. Arcos M, Ávila S, Estupiñán S, Gómez A. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *Nova - Publicación Científica* [Internet]. 2005 [citado 10 febrero de 2018]; 3(4):72. Disponible en: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/338-1615-1-PB.pdf>
33. Bautista V. Estudio de la calidad del agua de la cuenca del Río Chambo en época de estiaje. *dspace* [Internet]. 2014 [citado 10 febrero de 2018]; p 108. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/3221>
34. Jaque E, Potocí C. Evaluación del Índice de Calidad de Agua (ICA) de la microcuenca del Río Chibunga, en variaciones estacionales, provincia de Chimborazo – Ecuador, durante el periodo 2014. *dspace* [Internet]. 2015 [citado 10 febrero de 2018]; p 100. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4077>
35. Akinde S, Sunday A, Adeyemi F, Fakayode I, Oluwajide O, Adebunmi A, Oloke J, Adebooye C. Microbes in Irrigation Water and Fresh Vegetables: Potential Pathogenic Bacteria Assessment and Implications for Food Safety. *ABSA International* [Internet]. 2016 [citado 10 febrero de 2018]; 21(2):94 Disponible en: DOI: 10.1177/1535676016652231
36. Sánchez L, Acosta J. Mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) del gen *gyrA* de *Neisseria gonorrhoeae* presente en muestras clínicas de hombres que tienen sexo con hombres. *Revista Peruana de Biología* [Internet]. 2017 [citado 10 febrero de 2018]; 24(3):283-292 Disponible en: doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v24i3.13905>
37. Ferran J, Calvo J, Cantón, cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [Internet]. 2011 [citado 10 febrero de 2018]; 29(7). Disponible en: DOI: 10.1016/j.eimc.2011.03.011
38. Eslava C, Castellanos S, Pretto E, Sánchez V, Méndez I. Celulitis facial odontogénica severa infrecuente causada por *Citrobacter Freundii* productora de ampc en un paciente con diabetes mellitus 2. reporte de caso. *Revista Med* [Internet]. 2012 [citado 10 febrero de 2018]; 20(1). Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91025872004>
39. Bou G, Olmos A, García C, Sáez J, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y*

- Microbiología Clínica [Internet]. 2011 [citado 10 febrero de 2018]; 29(8). Disponible en: DOI: 10.1016/j.eimc.2011.03.012
40. Rivera M, Rodríguez C, López J. Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica [Internet]. 2009 [citado 10 febrero de 2018]; 26(1):47. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342009000100009
 41. Calvo J, Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. 2009 [citado 10 febrero de 2018]; 27(1). Disponible en: DOI: 10.1016/j.eimc.2008.11.001

ANEXOS

Anexo N° 2: Resultados de las pruebas fisiológicas y bioquímicas utilizadas para el aislamiento de las bacterias Gram negativas.

N°	Microorganismo	KIA	GAS	H ₂ S	URE	CIT	IND	MOT	LIS	PAD	OXI	MAE	PIG
1	<i>Escherichia coli</i>	A/A	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/A	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	
3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	A/A	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	
4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	A/A	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	
5	<i>Citrobacter freundii</i>	A/A	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	
6	<i>Pseudomonas spp</i>	K/K	-	-	-	-	-	+			+		-

KIA: agar hierro de Kliger; GAS: gas de glucosa; H₂S: sulfuro de hidrógeno; URE: ureasa; CIT: citrato; IND: indol; MOT: motilidad; LIS: lisina descarboxilasa; PAD: fenilalanina desaminasa; OXI: oxidasa; MAE: microaerofilia; PIG: producción de pioverdina.

Anexo N°3: Resultados del antibiograma realiza a las bacterias gramnegativas de interés clínico conjuntamente con su interpretación según la guía de internacional CLSI.

Microorganismo	CTX		AMC		CAZ		FEP		CIP		NA		IPM		MEM		FOX	
	mm	Int	mm	Int	mm	Int	mm	Int	mm	Int								
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31	S	24	S	27	S	31	S	31	S	28	S	30	S	29	S		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	31	S	26	S	30	S	31	S	39	S	31	S	33	S	35	S		
<i>Enterobacter aerogenes</i> (punto 2)	36	S	26	S	28	S	34	S	24	S	0	R	33	S	34	S		
<i>Escherichia coli</i> (punto 4)	32	S	15	I	27	S	31	S	26	S	0	R	16	R	28	S		
<i>Escherichia coli</i> (punto 5)	31	S	24	S	27	S	31	S	31	S	28	S	30	S	29	S		
<i>Citrobacter freundii</i>	26	S	10	*R	22	S	27	S	24	S	22	S	14	R	24	S		
<i>Enterobacter aerogenes</i> (punto 6.1)	31	S	0	R	25	S	29	S	25	S	0	R	25	S	27	S		
<i>Enterobacter aerogenes</i> (punto 6.2)	39	S	19	S	25	S	29	S	30	S	0	R	26	S	31	S		
<i>Enterobacter aerogenes</i> (punto 6.3)	28	S	0	R	22	S	28	S	27	S	21	S	20	S	25	S	0	R
<i>Pseudomonas</i> sp	26	S	23	S	19	I	21	I	27	S	24	S	29	S	28	S		
<i>Pseudomonas</i> sp	35	S	28	S	26	S	32	S	32	S	32	S	37	S	33	S		

CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime, AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, CEP: cefepime, CIP: ciprofloxacina, NA: ácido nalidixico, IPM: imipenem, MEM: meropenem.

Anexo N°4: Evidencias fotográficas



Imagen 5. A) Toma de muestra en Cebadas. B) Toma de muestra en Chambo. C) Toma de muestra en Penipe. D) Toma de muestra en Cubijés.

Fuente: Molina J, Orozco J, Proyecto “Detección de resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico aisladas en el Río Chambo. Noviembre 2018- enero 2019”

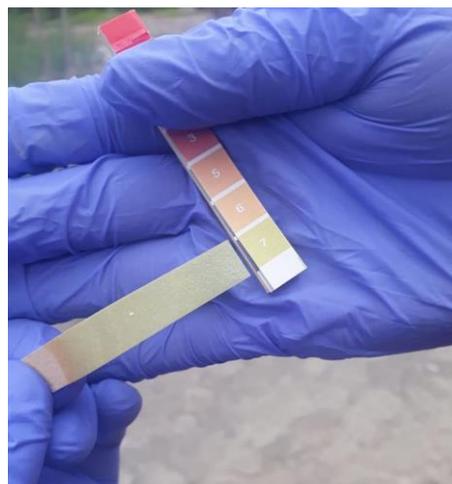


Imagen 6. Medición del pH.

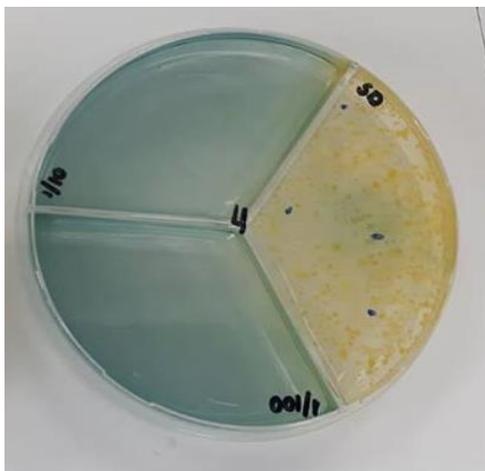
Fuente: Molina J, Orozco J, Proyecto “Detección de resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico aisladas en el Río Chambo. Noviembre 2018- enero 2019”



Imagen 7. Siembra de las muestras de agua en agar CLED.

Fuente: Molina J, Orozco J, Proyecto “Detección de resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico aisladas en el Río Chambo. Noviembre 2018- enero 2019”

A



B



Imagen 8. A) Colonias pequeñas de color amarillo en agar CLED posterior a 24 horas de incubación a 37°C. B) Colonias fermentadoras de lactosa y no fermentadoras de lactosa.

Fuente: Molina J, Orozco J, Proyecto “Detección de resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico aisladas en el Río Chambo. Noviembre 2018- enero 2019”

A**B**

Imagen 9. A) Resiembra de las cepas en agar MacConkey para la obtención de cepas más puras y en un crecimiento óptimo para las pruebas de identificación. **B)** Siembra de las cepas puras en la batería de identificación.

Fuente: Molina J, Orozco J, Proyecto “Detección de resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico aisladas en el Río Chambo. Noviembre 2018- enero 2019”



Imagen 10. Batería de identificación bacteriana de izquierda a derecha: agar Triple azúcar hierro (A/A, producción de gas), Lisina hierro agar (Desaminación negativa, descarboxilación positiva), citrato (negativo), SIM y urea (positiva).

Fuente: Molina J, Orozco J, Proyecto “Detección de resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico aisladas en el Río Chambo. Noviembre 2018- enero 2019”

Anexo N°5:

Aprobación del Título del Proyecto de Investigación



FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA SALUD
DECANATO

Riobamba, 20 de noviembre de 2018
Oficio No. 0343-RD-FCS-2018

Señores
OROZCO PILCO JOSUÉ ANDRÉS
MOLINA ORTIZ JHONNATAN PAÚL
ESTUDIANTES DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD - UNACH
En su despacho. -

De mi consideración:

Cumplo con el deber de informarle la resolución de Decanato de fecha: martes 20 de noviembre de 2018.

RESOLUCIÓN No. 0343-D-FCS-20-11-2018: Aprobar el tema del proyecto de investigación, Tutor y Miembros de Tribunal de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico (Of. No. 599-CLCH-FCS-2018 y 175-CID-FCS-2018), de acuerdo al siguiente detalle:

No	Nombres y apellidos de los estudiantes	Tema sugerido en el perfil	Tema aprobado por Comisión de Carrera y CID	Tutor y miembros del Tribunal, según Artículo 173 del RRA	Tribunal según Artículo 174 del RRA
1	Orozco Pilco Josué Andrés Molina Ortiz Jhonnatan Paúl	Detección de resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico, aisladas del riego de Río Chambo. Noviembre 2018 - enero 2019	Detección de resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico aisladas en el Río Chambo. Noviembre 2018 - enero 2019	Tutor: Dra. Morella Lucía Guillén Ferraro Miembros: Mgs. Yisela Ramos Campi Dra. Liliana Margarita Araujo Baptista	Mgs. Ximena Robalino Flores (Presidente, Delegado del Decano) Miembros: Mgs. Yisela Ramos Campi Dra. Liliana Margarita Araujo Baptista

Particular que informo para los fines pertinentes.

Atentamente,


Dr. Gonzalo E. Bonilla P.
DECANO DE LA FACULTAD
CIENCIAS DE LA SALUD - UNACH
C.C.: Archivo

Elaboración de Resoluciones Decanato: 20-11-2018: MsC. Ligia Viteri
Transcripción Resoluciones Decanato: 20-11-2018: Jenny Castelo
Revisado y Aprobado: Dr. Gonzalo Bonilla

Anexo N°6:

Aprobación del uso de los Laboratorios



FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA SALUD
DECANATO

Riobamba, 14 de diciembre de 2018
Oficio N° 3583-D-FCS-2018

Doctora
Morella Guillén Ferraro
DOCENTE DE CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO
Presente. -

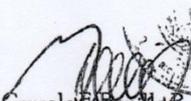
De mi consideración:

En atención al oficio s/n, de fecha 12 de diciembre de 2018, suscrito por su persona, me permito indicar la autorización por parte de este Decanato para el uso de los laboratorios de la Facultad, con el fin de la investigación en el trabajo de titulación "Detección de resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico aisladas en el Río Chambo" de lunes a viernes mientras dure el proceso de siembra.

Se solicita coordinar con los Técnicos encargados responsables de los Laboratorios para que no interfiera con las actividades académicas.

Por la gentileza de su atención, le agradezco.

Atentamente,


Dr. Gonzalo E. Bonilla P.
DECANO DE LA FACULTAD

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO
RECIBÍ
HORA
FECHA 14/12/18
SEGUNDA FIRMADA

Elaborado: Adriana Pérez
Revisado: Dr. Gonzalo Bonilla