



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 Licenciada en
Ciencias de la Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico

TRABAJO DE TITULACIÓN

Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán,
2019.

Autora: Anyeli Yomira López Cuaran

Tutora: Dra. María del Carmen Cordovéz Martínez.

Riobamba - Ecuador

2019

REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019, presentado por Anyeli Yomira López Cuaran, dirigido por: Dra. María del Carmen Cordovéz Martínez, una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final escrito del proyecto de investigación con fines de graduación en el cual se ha constatado 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. Aida mercedes Balladares Saltos
Presidente del Tribunal



.....
Firma

Mgs. Felix Atair Falconí Ontaneda
Miembro del Tribunal



.....
Firma

Lic. Eliana Elizabeth Martínez Durán
Miembro del Tribunal



.....
Firma

DECLARACIÓN DEL TUTOR

Yo, Dra. María del Carmen Cordovéz Martínez en calidad de tutora del proyecto de investigación con el tema “Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca de río Chanchán, 2019”, propuesto por la Srta. Anyeli Yomira López Cuaran egresada 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 encuentra apta para la defensa pública del proyecto. Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad facultando al interesado hacer uso del presente para trámites correspondientes.



.....
Dra. María del Carmen Cordovéz Martínez

**DOCENTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E
HISTOPATOLÓGICO**

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

“La responsabilidad del contenido de este Proyecto de Graduación, corresponde exclusivamente a la autora Anyeli Yomira López Cuaran con cédula de identidad N.1005025497 y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.”



Anyeli Yomira López Cuaran

CI:1005025497

AGRADECIMIENTO

Ofrezco mi agradecimiento en primer lugar a Dios por ser mi guía, mi fuerza y mi fortaleza para seguir adelante.

A la Universidad Nacional de Chimborazo, y los docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico quienes impartieron sus conocimientos profesionales, ayudándome a formar ética y profesionalmente. De manera especial a la Dra. María del Carmen Cordovéz quien durante el proceso de esta investigación ha sido una excelente guía.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo primero a Dios, pilar fundamental en mi vida, con mucho cariño a mis padres por brindarme su amor y estar siempre conmigo, en especial por su ejemplo de lucha y perseverancia. A mi hija Isabella y mis hermanos Dayana, Yair, Arley por ser mi motivación y principal incentivo para mejorar cada día, a mis tíos y primos, gracias por su apoyo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
Objetivo General:	4
Objetivos Específicos:.....	4
CAPÍTULO I.....	5
ESTADO DEL ARTE RELACIONADO A LA TEMÁTICA	5
Cuenca Hidrográfica.	5
Río Chanchán.....	5
Productos agrícolas.	5
Contaminación microbiológica del agua y los alimentos.....	6
Gastroenteritis infecciosa.	7
Bacterias.....	7
Principales bacterias transmitidas por el agua y alimentos causantes de Gastroenteritis.....	8
<i>Shigella dysenteriae</i>	8
<i>Salmonella typhi</i>	8
<i>Salmonella spp.</i>	8
<i>Vibrio cholerae</i>	8
<i>Aeromonas spp.</i>	9
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	9
<i>Campylobacter</i>	9
<i>Yersinia enterocolitica</i>	9
<i>Enterococcus spp.</i>	9
<i>Escherichia coli</i>	10
Diagnóstico bacteriológico.....	11
Tipo de mecanismos de acción de los antimicrobianos.	11
Resistencia antimicrobiana.....	13
Origen de la resistencia de las bacterias a los antibióticos.....	13
Mecanismos de resistencia bacteriana a los antimicrobianos.	14
Métodos para la determinación de sensibilidad y resistencia en los estudios microbiológicos.	16
CAPITULO II	17
METODOLOGÍA	17

Tipo de investigación:	17
Población y muestra.	17
Técnicas y procedimientos	17
Técnicas	17
Instrumentos	17
Identificación del área de estudio y obtención de las muestras	18
Aislamiento e identificación de bacterias presentes en las muestras	18
Determinación de sensibilidad y resistencia antimicrobiana de bacterias de interés clínico.	20
CAPÍTULO III	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES	36
RECOMENDACIONES	37
BIBLIOGRAFÍA.....	1

INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Características clínicas de la diarrea.....	7
Ilustración 2: Escherichia coli causantes de gastroenteritis.....	10
Ilustración 3 Mecanismos básicos de acción antibiótica	11
Ilustración 4 Mecanismos de transferencia genética.....	15
Ilustración 5. Ubicación geográfica para muestreo del río Chanchán, subcuenca hidrográfica Yaguachi.....	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Puntos de muestreo según altitud, temperatura del ambiente y crecimiento bacteriano de los productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán.	22
Tabla 2. Distribución porcentual de los aislados bacterianos según la coloración de Gram....	23
Tabla 3. Aislamiento bacteriano según el producto agrícola, altura y temperatura de cada punto muestreado de la cuenca del río Chanchán.....	25
Tabla 4. Bacterias patógenas aisladas de productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán.	27
Tabla 5. Distribución según el punto geográfico de las bacterias patógenas aisladas de productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán.....	29
Tabla 6. Patrón de susceptibilidad y resistencia identificado del género <i>Klebsiella</i> aislado de productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán.....	30
Tabla 7. Patrón de susceptibilidad y resistencia identificado del resto de la familia Enterobacteriaceae aisladas de productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán.....	31
Tabla 8. Patrón de susceptibilidad y resistencia a los antibióticos de la familia Pseudomonadaceae aislada de productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán.....	32
Tabla 9. Patrón de susceptibilidad y resistencia de la familia Aeromonadaceae aislada de productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán.....	34
Tabla 10. Patrón de susceptibilidad y resistencia de la familia Enterococcus aislada de productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán.....	35

INDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Recolección de muestras. **A.** Toma de muestras en Palmira. **B.** toma de muestras en Totoras, el Cortijo

Imagen 2. Pre-enriquecimiento de muestras: **A.** Obtención de muestras representativas del producto. **B.** Pre-enriquecimiento en Agua Peptonada.

Imagen 3. Inoculación del cultivo: **A.** Toma de muestra desde el cultivo. **B.** inoculación en Agua Peptonada.

Imagen 4. Cultivos en MC y AS: **A.** Preparación de medios de cultivos y pruebas bioquímicas **B.** Estriado en agar Mc. **C.** Crecimiento bacteriano en AS

Imagen 5. Tinción Gram: **A.** Enfoque de bacilos gram negativos.

Imagen 6. Pruebas bioquímicas para Bacterias Gram Positivas: **A.** Bilis-esculina positiva

Imagen 7. Pruebas bioquímicas para Bacterias Gram Negativas: **A.** Bateria de identificación bacteriana, de izquierda a derecha: Malonato (positivo), urea (negativa), MIO (motilidad positiva, indol negativo, ornitina positiva), citrato (positivo), Lisina hierro agar (Desaminación, descarboxilación negativa) agar Triple azúcar hierro (lactosa, glucosa, producción de gas positivo) **B.** Crecimiento de Bacterias Gram Negativas en MC y AS

Imagen 8. Pruebas bioquímicas para Bacterias Gram Negativas no Fermentadoras: **A.** Detección de enzima oxidasa. **B.** Presencia de hemólisis en agar sangre

Imagen 9. Antibiograma según método de Kirby Bauer: **A.** Resiembra en Mueller Hinton para obtención de cepas frescas. **B.** Cepa bacteriana en agar Muller Hinton. **C.** Suspensión de cepas en solución salina fisiológica. **D.** Desarrollo del método Kirby bauer

Imagen 10. Interpretación de resultados del antibiograma: **A.** Medición del halo de inhibición en placas. **B.** Antibiograma por método de Kirby Bauer

RESUMEN

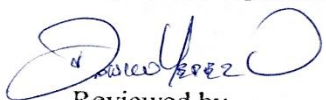
La contaminación de alimentos y agua es una problemática sanitaria a nivel mundial, por lo que este estudio tiene como objetivo identificar bacterias de interés clínico aisladas de productos agrícolas regados con aguas del río Chanchán en Chimborazo, Ecuador, determinando su susceptibilidad y resistencia antimicrobiana; trabajo de tipo descriptivo, transversal y de campo, se midió *in situ* altitud y temperatura ambiental del sitio geográfico donde fue recolectada la muestra. Para el aislamiento e identificación de los microorganismos se utilizaron medios de cultivo como agua Peptonada, agar Sangre, CLED, McConkey e interpretación de pruebas fisiológicas y bioquímicas para la clasificación en especie, obteniéndose 24 bacterias; para la medición de la susceptibilidad y resistencia se realizó la técnica de Kirby Bauer por difusión. La familia *Enterobacteriaceae* fue la más aislada (54,1%) presente con *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter amalonaticus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia enterocolitica* y *Plesiomonas shigelloides*, seguida de la *Streptococcaceae* (33,4%) con el género *Enterococcus* como único Gram positivo aislado, el 8,4% fue de la familia *Pseudomonaceae* entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*, mientras que el 4,1% correspondió con la *Aeromonadaceae* una sola cepa. En cuanto a la actividad antimicrobiana los aislados presentaron buena sensibilidad, mientras que otros siendo resistentes no mostraron mecanismos de resistencia. Los resultados obtenidos indican que los productos estudiados constituyen un riesgo para la salud, por estar contaminados con enteropatógenos; recomendándose socializar a las autoridades pertinentes estos resultados, con el fin de prevenir infecciones intestinales o extraintestinales por su consumo.

Palabras Claves: Productos agrícolas, Enterobacterias, Pseudomonas, Antibiótico, Susceptibilidad y Resistencia.

ABSTRACT

Food and water pollution is a global health issue, so that this study aims to identify bacteria of clinical interest isolated from agricultural products irrigated with waters of the Chanchán River in Chimborazo, Ecuador, determining its susceptibility and antimicrobial resistance; descriptive, cross-sectional and field work, was measured in situ altitude and environment temperature of the geographical site where the sample was collected. For the isolation and identification of microorganisms, culture media such as Peptonated water, Blood agar, CLED, McConkey and interpretation of physiological and biochemical tests were used for classification in kind, obtaining 24 bacteria; For the measurement of susceptibility and resistance, the Kirby Bauer technique was disseminated. The *Enterobacteriaceae* family was the most isolated (54.1%) present with *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter amalonaticus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia enterocolitica* y *Plesiomonas shigelloides*, followed by *Streptococcaceae* (33.4%) with the genus *Enterococcus* as the only isolated positive Gram, 8.4% were from the *Pseudomonaceae* family among *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*, while 4.1% corresponded to *Aeromonadaceae* a single strain. As for the antimicrobial activity, the isolates showed good sensitivity, while others being resistant showed no resistance mechanisms. The results obtained indicate that the products studied constitute a risk for health, for being contaminated with enteropathogens; it is recommended to socialize these results to the relevant authorities, in order to prevent intestinal or extraintestinal infections due to their consumption.

Keywords: Agricultural products, Enterobacteria, Antibiotic, susceptibility, resistance.



Reviewed by.
Danilo Yépez Oviedo
English professor UNACH



INTRODUCCIÓN

La ingestión de productos contaminados por microorganismos patógenos por el hombre, ponen en riesgo su salud. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la prevención de las Enfermedades De Transmisión Alimentaria (ETA) depende del cultivo y manipulación de los productos, especialmente de aquellos que se consumen crudos, las cuales constituyen un problema de Salud Pública que producen Gastroenteritis originada por varios agentes infecciosos que pueden encontrarse tanto en el agua como en los alimentos¹.

El consumo de alimentos que contienen, parásitos, bacterias, virus o sustancias químicas nocivas pueden desatar más de 200 enfermedades, que van desde la diarrea hasta el cáncer. Las infecciones diarreicas, generalmente se asocian al consumo de dichos alimentos; cada año 550 millones de personas enferman y provocan 230.000 muertes, de los cuales el 40% corresponde a niños menores de 5 años¹.

La OMS indica que, de la población mundial el 10 % consume alimentos cultivados con aguas residuales sin tratar y el 32 % no tiene acceso a servicios adecuados de saneamiento básico, generando 280.000 muertes asociadas a enfermedades de carácter hídrico. Se estima que el 4 % del total de muertes en el mundo están directamente relacionadas con la calidad del agua, higiene y saneamiento².

En Estados Unidos, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) para el año 2013 reportó un total de 19.056 infecciones alimentarias, 4200 hospitalizaciones y 80 muertes. Entre los patógenos más frecuentes se encontraron, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Vibrio*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* y *Listeria*. En México se detectó que el 92.85% de las muestras de agua de la llave de viviendas, presentan bacterias coliformes totales, lo cual indicó contaminación fecal^{3,4}.

En América Latina y el Caribe, las Enfermedades Diarreicas Agudas (EDA), son una de las 10 causas principales de muertes por año, gracias a problemas en la calidad del agua, principalmente por el inapropiado manejo de aguas residuales. En Colombia, los principales agentes etiológicos identificados fueron *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Salmonella spp*, se

demonstró la presencia de otras bacterias, como *Listeria monocytogenes* y *Shiguelia spp.* En un estudio en muestras de lechugas de sitios de venta de comida realizado en Bolivia, se aislaron diferentes especies de enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter spp*, *Enterobacter cloacae* además *Salmonella spp.* En Argentina al cuantificar microorganismos indicadores de contaminación patógena en hortalizas mínimamente procesadas y obtenidas de diferentes puntos de venta, mostró que el 71.7% representaba a Coliformes totales, el 48.8% Coliformes fecales y el 9.5% *Escherichia coli*⁵⁻⁸.

En Ecuador, Ortega y Vélez encontraron en hortalizas en Cuenca, que el grado de contaminación era mayor en lechugas, con niveles no aceptables de Coliformes totales y *E. coli*, mientras Cabascando, en Quito luego de realizar la determinación microbiológica en berro expandido en los mercados, indicó que todas las muestras presentaron parásitos y el grado de contaminación bacteriana sobrepasó el 1000.000 UFC/g^{9, 10}.

En Chimborazo, en la investigación realizada por Marcillo y Mur estudiaron las aguas de regadío del río Chibunga aislando bacterias patógenas causantes de infecciones importantes y de difícil tratamiento médico en muchas ocasiones. Igualmente, Molina y Orozco en el río Chambo logran aislar bacterias de interés clínico y resistentes a antibióticos de uso común. Mientras el estudio de Puyol y Razo, al determinar la calidad del agua del sistema de riego Chimpungales en el cantón Guano reveló la presencia de Coliformes tanto fecales como totales, estableciendo que la primordial fuente de contaminación son las descargas de aguas residuales de tipo domiciliarias¹¹⁻¹³.

Los antibióticos han salvado muchas vidas, pero además han supuesto una revolución en la medicina, debido al desarrollo de nuevos fármacos y su mal uso y abuso terapéutico. En la actualidad algunas infecciones causadas por bacterias resistentes a antimicrobianos que se encuentran en nuestro ambiente se relacionan a un porcentaje considerable de morbimortalidad. Las bacterias multirresistentes a los antibióticos se liberan en las aguas principalmente a través de las heces, orina 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 constituyendo las mayores fuentes de contaminación bacteriana y de genes resistentes a antimicrobianos que se liberan en el medio ambiente¹⁴⁻¹⁵.

Desde el punto de vista microbiológico la ingesta de productos agrícolas puede ser potencialmente peligrosa al estar contaminados éstos, produciendo infecciones sobre todo gastroentéricas, principalmente si son productos consumidos sin ningún tipo de cocción o tratamiento. Tales riesgos biológicos están asociados a malas prácticas de producción: cuidado e inadecuada higiene, la adición de estiércol como fertilizantes, presencia de animales en el área de cultivo, ocupación de agua de riego contaminada provenientes de cuencas hidrográficas. Siendo éste el vínculo de transmisión de microorganismos por agua que ha sido contaminada con desechos del hombre, animales o químicos, círculo en el que el hombre es quien se produce daño a sí mismo, contaminando productos de importancia para su estabilidad¹⁶.

Según la bibliografía revisada a nivel local no se encuentran estudios en vegetales de consumo diario y con el antecedente de aislamiento de bacterias patógenas en aguas de regadío en la provincia de Chimborazo, es que se realiza este estudio en productos agrícolas cultivados de la cuenca del río Chanchán, para identificar la calidad microbiológica de estos, los cuales llegan hasta la canasta familiar. La contaminación bacteriana demostrada en vegetales, frutas, verduras u otros, obliga a alertar tanto a las autoridades como a la población involucrada para paliar tal situación, evitando así infecciones gastrointestinales que son productoras de gran morbimortalidad, sobre todo en niños, lo que ayudaría a cumplir con el objetivo 6 del Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021: “Desarrollar las capacidades productivas y del entorno para lograr la soberanía alimentaria y el Buen Vivir rural”¹⁷.

Preocupación que exclusivamente no es nuestra, pues desde hace algunos años la Organización de Naciones Unidas (ONU) alerta del problema creciente de la gestión de los vertidos residuales en las aguas para evitar la propagación de varias enfermedades implicadas en este hecho, planteando que la solución no es fácil y hace un llamado a los gobiernos para emprender acciones urgentes con un enfoque multisectorial, con una acción basada en los ecosistemas y una visión a largo plazo, en la que la educación y la innovación sean fundamentales¹⁸.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Aislar bacterias patógenas para el hombre en productos agrícolas provenientes de la cuenca del río Chanchán.

Objetivos Específicos:

- Recolectar muestras de productos agrícolas cultivados con agua de regadío del río Chanchán en diferentes puntos geográficos, para su análisis bacteriológico.
- Aislar bacterias patógenas de los productos agrícolas, mediante el empleo de diferentes medios de cultivo.
- Medir la resistencia antimicrobiana de bacterias de interés clínico, aplicando el método de Kirby Bauer.

CAPÍTULO I

ESTADO DEL ARTE RELACIONADO A LA TEMÁTICA

Cuenca Hidrográfica.

Territorio cuya topografía hace que el agua drene hacia ciertos puntos, desde la expectativa socio ecosistémica, la cuenca es un sistema complejo humano-bio-físico integrado. El manejo de estas resuelve problemas de: suministro en calidad, cantidad y temporalidad; de distribución para fortalecimiento institucional; de manejo de residuos con la ubicación de plantas de tratamiento; y de control de inundaciones¹⁹.

Río Chanchán

Forma parte del sistema hídrico del río Guayas, que nace en la provincia de Pichincha y Cotopaxi y desemboca en el Pacífico; recibe las aguas de los ríos Daule y Babahoyo. El río Chanchán se ubica en la región Andina del centro del Ecuador, en la Sierra Occidental, nace en los montes de Cruzpungo en la provincia de Chimborazo, y luego de regar el valle de su mismo nombre y el de Alausí, desciende hacia el oeste hasta juntarse al río Chimbo y formar la subcuenca hidrográfica Yaguachi (Anexo 1), que desencadena en el Río Babahoyo²⁰.

El río Chanchán se dispone entre las cordilleras Real y Occidental de Los Andes; las dos cordilleras se formaron en dos episodios orogénicos: Paleozoico y Meso-cenozoico, respectivamente. En cuanto se refiere al uso del suelo, existe la predominancia de espacios con cultivos (37%), páramo (25%), vegetación arbustiva (17%), bosque natural (12%) y pastos (7,5%)²⁰.

Productos agrícolas.

Productos destinados al consumo humano, siendo el recurso más importante para su subsistencia, algunos son consumidos de forma directa y otra parte es proporcionada a la industria para la obtención de sus derivados²¹.

El acceso a alimentos inocuos y nutritivos en cantidad suficiente es fundamental para mantener la vida y fomentar la buena salud, pero en ocasiones el hombre ingiere alimentos y agua insalubres que contienen bacterias o sus toxinas, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas causando más de 200 enfermedades, que van desde la diarrea hasta el cáncer, constituyendo un problema de salud pública según la OMS²².

La OMS estima que 1 de cada 10 habitantes enferman cada año por ingerir alimentos y aguas contaminadas y que por la misma causa mueren unos 420 000, siendo los niños menores de 5 años la gran mayoría. Estando relacionados con las Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA), generalmente las diarreicas. La inocuidad de los alimentos, la nutrición y la seguridad alimentaria están inevitablemente relacionadas. Los alimentos insalubres generan un círculo vicioso de enfermedad y malnutrición, afectando generalmente a los lactantes, niños pequeños y ancianos¹⁹.

Las ETA según la OMS conforman uno de los problemas sanitarios más comunes que aquejan la salud de las personas en el mundo y afectan con mayor severidad a niños, mujeres embarazadas, ancianos y personas con otros padecimientos, sin embargo, estas enfermedades no sólo afectan la salud, afectan socioeconómicamente al ocasionar una disminución en la productividad y el comercio e imponer una carga sustancial en los sistemas de salud generando gastos en hospitalizaciones y medicamentos¹⁹.

Contaminación microbiológica del agua y los alimentos.

La contaminación microbiológica del agua y los alimentos está asociada a las malas prácticas de producción, inadecuada higiene, utilización de estiércol como fertilizantes, presencia de animales en el área de cultivo, ocupación de agua de riego contaminada provenientes de cuencas hidrográficas, siendo este el principal vínculo de transmisión de microorganismos por agua que ha sido contaminada con desechos del hombre, animales o químicos, además de las malas prácticas higiénicas en el hogar como no lavarse las manos, higiene deficiente en la manipulación de los alimentos, contacto con utensilios o recipientes contaminados, a través de artrópodos o roedores como ejemplo moscas, cucarachas, ratas, que posan sobre el alimento o tienen contacto con el mismo²³. Esto trae consigo las Enfermedades Gastroentéricas que se

adquieren por vía fecal-oral al ingerir el agua o alimentos contaminados, siendo las bacterias, virus, protozoos y helmintos los microorganismos transmitidos de esta forma²⁴.

Las bacterias patógenas producen muchas enfermedades infecciosas, en su mayoría generan enfermedades a nivel digestivo, transmitidas por bacterias provenientes del tracto gastrointestinal de animales y humanos, patógenos que son vertidos a los sistemas de aguas cloacales y hacen de estos su habitat^{25, 26}.

Gastroenteritis infecciosa. Es la inflamación o disfunción intestinal que provocan los microorganismos (virus, bacterias, parásitos) o sus toxinas (enterotoxinas, citotoxinas) se caracteriza por la presencia de diarreas mostrándose cambio en las deposiciones tanto en consistencia como en frecuencia. Estas se clasifican según su duración en agudas con menos de 14 días, persistentes entre 14-30 días y en crónicas cuando persisten más de 30 días y según el mecanismo de producción en inflamatorias y no inflamatorias (Ilustración 1)²⁷.

	Inflamatoria	No inflamatoria
Aspecto de las heces.	Mucosanguinolentas.	Acuosas.
Diarrea.	Frecuente y poco voluminosa	Voluminosa.
Fiebre.	Frecuentemente.	Poco frecuente.
Dolor abdominal.	Hipogastrio/ difuso/	Mesogastrio/ difuso/
Sensación de urgencia.	Si	No
Tenesmo o dolor rectal.	Frecuente (si existe proctitis)	No
Localización.	Preferentemente colon	Preferentemente I. delgado

Ilustración 1 Características clínicas de la diarrea.

Fuente: Murray et al.: Microbiología médica. 8va edición 2017.

Bacterias.

Las bacterias disponen una estructura relativamente simple. Son microorganismos procariotas, es decir, microorganismos unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, aparato de Golgi, mitocondrias, ni retículo endoplásmico, y se reproducen por división asexual. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja y existen dos formas básicas: una pared celular grampositiva con una gruesa capa de peptidoglucano y una pared celular gramnegativa con una delgada capa de peptidoglucano, y una membrana externa²⁷.

Para realizar una clasificación preliminar de las bacterias se utiliza su tamaño (de 1 a 20 micras o más), su forma (esferas, bastoncillos, espirales) y disposición espacial (células aisladas, en cadenas y formando cúmulos); mientras que su clasificación definitiva se refiere a sus propiedades fenotípicas y genotípicas²⁷.

El organismo humano está habitado por miles de especies bacterianas distintas; mientras algunas mantienen una relación parasitaria temporal, otras habitan en el cuerpo humano de manera permanente. También se encuentran bacterias en el ambiente, como en el aire, el agua y los alimentos, aunque muchas de ellas son relativamente avirulentas otras son capaces de provocar enfermedades potencialmente mortales. La enfermedad puede deberse a los efectos tóxicos de los productos bacterianos (toxinas) o bien a la invasión de sitios estériles del cuerpo humano²⁷.

Principales bacterias transmitidas por el agua y alimentos causantes de Gastroenteritis.

Shigella dysenteriae. Periodo de incubación 1-7 días, causa disentería bacilar (diarrea sangrante), se muestra con fiebres altas, pujos intensos, retortijones, síntomas tóxicos e incluso convulsiones. Esta enfermedad puede causar altos índices de morbimortalidad sobre todo en niños²⁷.

Salmonella typhi. Periodo de incubación 7-28 días, es un bacilo que causa la fiebre tifoidea, una dolencia sistémica grave que puede originar hemorragia o perforación intestinal. Se manifiesta con fiebre, dolor de cabeza, náuseas, tos, vómitos y diarrea. Este agente puede transferirse por agua y alimentos contaminados y por contacto directo con personas infectadas²⁷.

Salmonella spp. Periodo de incubación 8-48 horas, bacilo Gram negativo, no esporulado y móvil, agente de la Salmonelosis, enfermedad más frecuente que la fiebre tifoidea, pero generalmente menos severa, se manifiesta por fiebre y diarrea acuosa con sangre²⁷.

Vibrio cholerae. Periodo de incubación 9-72 horas, agente etiológico del cólera, se transmite habitualmente a través del agua y alimentos contaminados, con más frecuencia por el consumo de los derivados del mar como mariscos. Bacteria Gram negativa, con morfología celular de bacilos cortos, que a menudo son curvados o en forma de coma, síntomas clínicos diarrea acuosa, vómitos, y puede llegar a la deshidratación²⁷.

Aeromonas spp. Bacilos Gram negativos anaerobios facultativos y no esporulados. Las principales fuentes de contaminación con este microorganismo son el agua, los vegetales, alimentos de origen animal y de procedencia del mar, es causa potencial de gastroenteritis en seres humanos. Como síntomas clínicos presenta heces acuosas no sanguinolentas, náuseas, vómitos, dolor de cabeza y colitis; aislamientos con genes de virulencia, principalmente relacionados con la producción de enterotoxinas. Además, se pueden presentar otras manifestaciones clínicas como infección de heridas, septicemia, abscesos en el hígado e infección respiratoria²⁷.

Plesiomonas shigelloides. Periodo de incubación 20-24 horas. Bacilo gram negativo con flagelos polares, anaerobio facultativo con la particularidad de ser productor de citocromooxidasa. Este microorganismo se encuentra en aguas dulces de regiones tropicales y subtropicales debido a que no crece a temperaturas inferiores a 8°C. En el hombre suele causar infecciones diarreicas acompañadas de fiebre, escalofríos, dolor abdominal, náuseas y vómitos, relacionadas con la ingesta de agua y mariscos contaminados²⁷.

Campylobacter. Periodo de incubación 2-5 días. Se ha reclasificado en géneros *C. jejuni* y *C. coli*. patógenos más frecuentes en humanos, gram negativos con forma de coma, S, o de ala de gaviota, móviles con un solo flagelo polar. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, reconociendo como reservorio natural animales tanto domésticos como de vida silvestre, tales como ganado vacuno, cerdos, ovejas, aves de corral, cabras, perros, gatos y roedores, entre otros. Las aves de consumo y sus subproductos constituyen uno de los principales reservorios y fuente de infección humana. Causante de heces fecales diarreicas algunas veces con sangre, dolores abdominales, fiebre, dolor de cabeza²⁷.

Yersinia enterocolitica. Periodo de incubación 1-11 días, patógeno de transmisión alimentaria, sus síntomas clínicos incluyen dolor abdominal, fiebre, vómitos, diarrea con moco y sangre; enfermedad infecciosa denominada Yersiniosis que puede ir desde una gastroenteritis hasta una septicemia grave²⁷.

Enterococcus spp. Son cocos grampositivos que se disponen en parejas y en cadenas cortas. Anaerobio facultativo. Coloniza el aparato digestivo de los humanos y los animales. Es capaz de sobrevivir en el medio ambiente durante largos períodos de tiempo. La mayoría de las infecciones provienen de la microflora bacteriana del paciente; algunas se deben a la transmisión horizontal de paciente a paciente. Producen infecciones del aparato urinario, infecciones de

heridas (especialmente intraabdominales y generalmente polimicrobianas), bacteriemia y endocarditis. Los pacientes de mayor riesgo son los inmunodeprimidos y los que permanecen hospitalizados durante períodos de tiempo prolongados y reciben antibióticos de amplio espectro (fundamentalmente cefalosporinas, a las que los enterococos son resistentes de forma natural)²⁶

Escherichia coli. Es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, usualmente móvil por flagelos peritricos, cuyo hábitat es el intestino de animales y el hombre, por lo que es utilizada como indicador de contaminación fecal debido a que se encuentra abundantemente en heces. Generalmente las cepas de *E. coli* que colonizan el intestino son comensales, sin embargo, en base a sus factores de virulencia específicos y rasgos fenotípicos dentro de esta especie se encuentran bacterias patógenas causantes de una diversidad de enfermedades gastrointestinales. Dentro de las *E. coli* patógenos se incluyen: *E. coli* enteropatogénico (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), *E. coli* enteroadherente y *E. coli* enteroagregativo (EAEC)^{26, 27} (Ilustración 2).

Características de los grupos de <i>Escherichia coli</i> causantes de diarrea			
GRUPO	SINTOMAS CLÍNICOS	EPIDEMIOLOGÍA	FACTORES DE PATOGENICIDAD
<i>ETEC</i>	Diarrea aguda acuosa.	Niños menores de dos años y diarrea del viajero	ST y LT CFA
<i>EHEC</i>	Diarrea sin sangre, fiebre, dolor abdominal, vomito.	Niños y adultos que adquieren por comer carne cruda o mal cocida.	STX A/E Intimina, pO157
<i>EIEC</i>	Diarrea con moco y sangre o diarrea acuosa, también se presenta cuadro disentérico.	Niños menores de seis meses.	Invasividad plásmido de 140MDa
<i>EPEC</i>	Diarrea aguda, fiebre baja, dolor abdominal, vómito.	Niños menores de seis meses. Hasta dos años	A/E, BFP Plásmido EAF de 50-70 MDa
<i>EAEC</i>	Diarrea líquida, verde con moco, sin sangre, diarrea persistente hasta 20 días	Recién nacidos y Niños menores de dos años	Fimbria AAFI y II, EASTI. Proteínas pot y Pic, OMP, Plásmido de 60 MDa, Citotoxina
<i>DAEC</i>	Diarrea acuosa sin sangre.	Niños de 1 – 5 años	Fimbrina f 1845, OMP

Ilustración 2: *Escherichia coli* causantes de gastroenteritis.

Fuente: Murray et al.: Microbiología médica. 8va edición 2017.

Diagnóstico bacteriológico

Es el conjunto de procedimientos y técnicas adicionales utilizadas para establecer la etiología del agente responsable de una enfermedad infecciosa. El procesamiento de las muestras para el diagnóstico bacteriológico abarca: examen microscópico, aislamiento del patógeno con medios de cultivos, detección de antígenos específicos que permitan la identificación del mismo y antibiograma que indique el patrón de sensibilidad a los antimicrobianos²⁸.

Tipo de mecanismos de acción de los antimicrobianos.

Los antimicrobianos actúan de diversas formas: por inhibición de la síntesis de la pared celular, inhibición de la función de la membrana celular, inhibiendo la síntesis de proteínas inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos (Ilustración 3)²⁶.

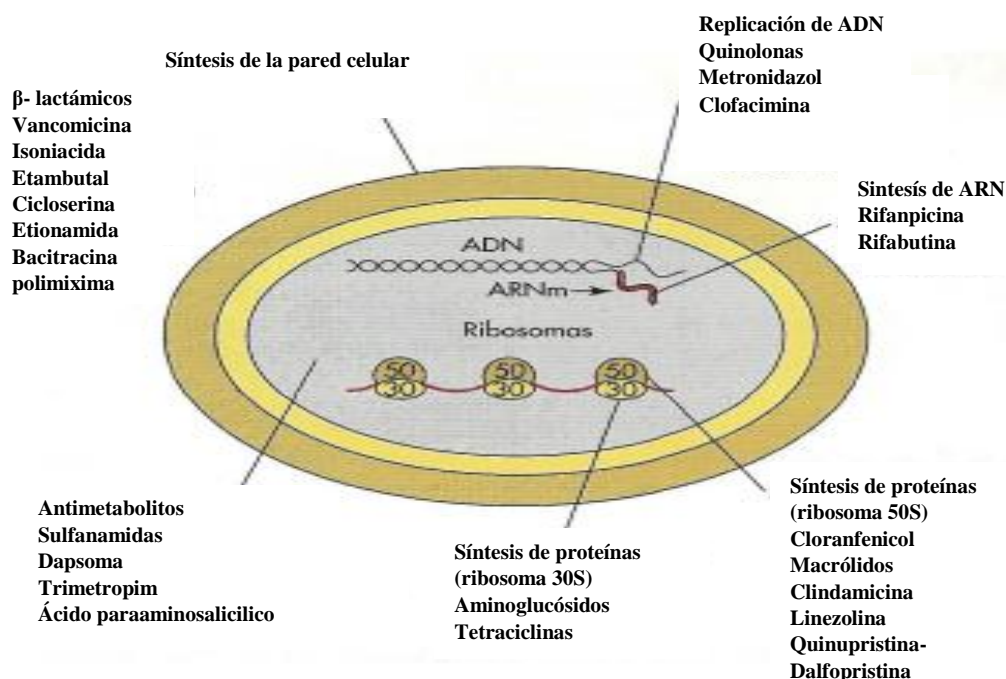


Ilustración 3 Mecanismos básicos de acción antibiótica

Fuente: Murray et al.: Microbiología médica. 8va edición 2017. Página 204.

1. Inhibición de la Síntesis de la Pared Celular.

El principal componente estructural de la mayoría de las paredes bacterianas es la capa de peptidoglucano, que se compone de enlaces entrecruzados; moléculas en variación de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. Estas cadenas están catalizadas por enzimas

específicas miembros de una gran familia de serina proteasas; enzimas reguladoras que también se denominan proteínas fijadoras de penicilinas “PBP”, del inglés penicillinbinding proteins, porque son las dianas de los antibióticos β -lactámicos, que inhibe el ensamblaje de las cadenas de peptidoglucano; esto a su vez, activa autolisinas que degradan la pared celular, lo que da lugar a la muerte de la célula bacteriana. Es el mecanismo más común de la actividad antibiótica, la mayoría de los antibióticos activos sobre la pared celular se clasifican en beta-lactámicos, otros antibióticos que interfieren son la Vancomicina, la Daptomicina, la Bacitracina^{26, 27}.

2. Inhibición de la Función de la Membrana Celular.

La membrana celular de las bacterias tiene una estructura diferente 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 algunos contienen péptidos cíclicos que dañan de manera selectiva a la fosfatidiletanolamina, componente principal de las membranas, otros interfieren específicamente en la biosíntesis de las membranas citoplasmáticas^{26, 27}.

3. Inhibición de las Síntesis de Proteínas.

Los antibióticos ejecutan su acción al pasar a través de la membrana externa bacteriana, la pared celular y la membrana citoplasmática al citoplasma, donde inhabilitan la síntesis proteica al acoplarse de modo irreversible a las proteínas ribosómicas 30S; produciendo un efecto destructor el cual se menciona a la elaboración de proteínas aberrantes como derivación de una lectura inexacta del ARN mensajero (ARNm). 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 son 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 aún se desconoce^{26, 27}.

4. Inhibición de la Síntesis de Ácidos Nucleicos.

Los ácidos nucleicos se inhabilitan por la acción de agentes quimioterapéuticos sintéticos que toman como diana las enzimas topoisomerasa de tipo II (girasa) o la topoisomerasa de tipo IV,

en el ADN bacteriano, necesarias para la replicación, recombinación y reparación del mismo. Incluso la síntesis de ADN puede verse afectada por antimetabolitos que compiten con el ácido p-aminobenzoico, con lo que se previene la síntesis del ácido fólico requerido por ciertos microorganismos o interferir directamente con el metabolismo del ácido fólico. El trimetoprim al inhibir el ácido dihidrofolato reductasa, evita la conversión de dihidrofolato a tetrahidrofolato una fase que en la secuencia provoca la síntesis de purinas y finalmente de DNA. La ARN polimerasa, de la misma forma puede ser inhibida, obstaculizando la iniciación de la síntesis de ARN, ejemplo las quinolonas y fluoroquinolonas inhiben la síntesis microbiana en el ADN bloqueando a la DNA girasa^{26, 27}.

Resistencia antimicrobiana.

Cada vez más las bacterias han demostrado una gran capacidad para desarrollar resistencia a los antibióticos, a pesar de la rapidez con que se introducen estos fármacos en el mercado. Aunque la terapia antimicrobiana constituye un arma importante contra las enfermedades infecciosas no siempre representa el método de curación rápido para las mismas, en muchos casos para tratar al paciente el médico ha de basarse en su experiencia clínica para la selección inicial del tratamiento empírico²⁶.

Origen de la resistencia de las bacterias a los antibióticos

La resistencia bacteriana puede ser natural o adquirida:

➤ 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. Ésta puede producirse por particularidades de la pared bacteriana que impiden acceder el antibiótico a su blanco, casos como los micoplasmas carecen de una pared celular típica y son resistentes a las penicilinas. También el organismo puede alterar el antibiótico pasándolo a una forma inactiva por la producción de enzimas que hidrolizan o modifican la molécula. Ejemplo el *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. Por su parte la *Klebsiella pneumoniae* posee una resistencia a las penicilinas debido a su producción natural de beta lactamasas²⁷.

➤ **Resistencia Adquirida**

La resistencia adquirida es una característica oportuna 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 de plásmidos, transposones e integrones. Un ejemplo, la resistencia a las quinolonas por modificación de la ADN girasa en las enterobacterias²⁷.

Entre los mecanismos básicos de resistencia se encuentran la inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura química, alteración del sitio blanco del antibiótico, alteración en las barreras de permeabilidad y las bombas de eflujo²⁷

Mecanismos de resistencia bacteriana a los antimicrobianos.

La resistencia de las bacterias a los antibióticos es un problema que se genera con el pasar del tiempo, más aún en los últimos años, pues las bacterias como seres vivos tienen la capacidad de desarrollar diferentes mecanismos de defensa ante cualquier tipo de amenaza²⁶.

La propagación de bacterias multirresistentes a antibióticos se ha incrementado gracias a la aparición de cepas que evaden el efecto bacteriostático y bactericida de los antibióticos, lo cual constituye un problema de salud pública, ya que afecta al tratamiento tanto ambulatorio como hospitalario de las enfermedades producidas por microorganismos incluyendo en estos procesos las llamadas bacterias oportunistas o comensales, generalmente poco sensibles a los antibióticos actuales, lo que lleva a limitarse de forma progresiva las posibilidades de utilizar antibióticos que en tiempos anteriores fueron activos, aumentando la tasa de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas^{29,30}.

Las bacterias pueden presentar resistencia a los antibióticos como resultado de mutaciones cromosomales e intercambio de material genético de otras bacterias o fagos (virus que utilizan bacterias para su desarrollo y reproducción), a través de mecanismos como:

- ✓ **Transducción:** Transferencia de ADN cromosómico o plasmídico, la cubierta del fago estará rodeada por ADN bacteriano, lo que se utiliza para transferir genes de una bacteria a otra, los fagos se identifican con base a la morfología de la placa que forman la lisis de otras bacterias²⁶.
- ✓ **Transformación:** La captación directa de fragmentos de ADN desnudo del donador por la célula receptora que los incorpora a su genoma, proceso que demanda proteínas específicas producidas por la célula receptora para la captación de ADN, tales secuencias de captación son específicas y restringen el intercambio genético a una sola especie, el ADN que no se incorpora se degrada para ser utilizado como fuente de nutrientes para el crecimiento bacteriano²⁶.
- ✓ **Conjugación:** Proceso entre dos bacterias, transferencia unidireccional de ADN desde una célula donante o macho a una célula receptora o hembra, deben estar en contacto para la transferencia a través del llamado *pilus sexual* ²⁶.
- ✓ **Recombinación:** La incorporación del ADN extracromosómico en el cromosoma se realiza mediante un proceso de recombinación. Existen dos tipos: la recombinación homóloga que tiene lugar entre secuencias de ADN relacionados, en la cual se sustituye una secuencia por otra, mientras que la recombinación no homóloga se lleva a cabo entre secuencias distintas de ADN (Ilustración 4)²⁶.

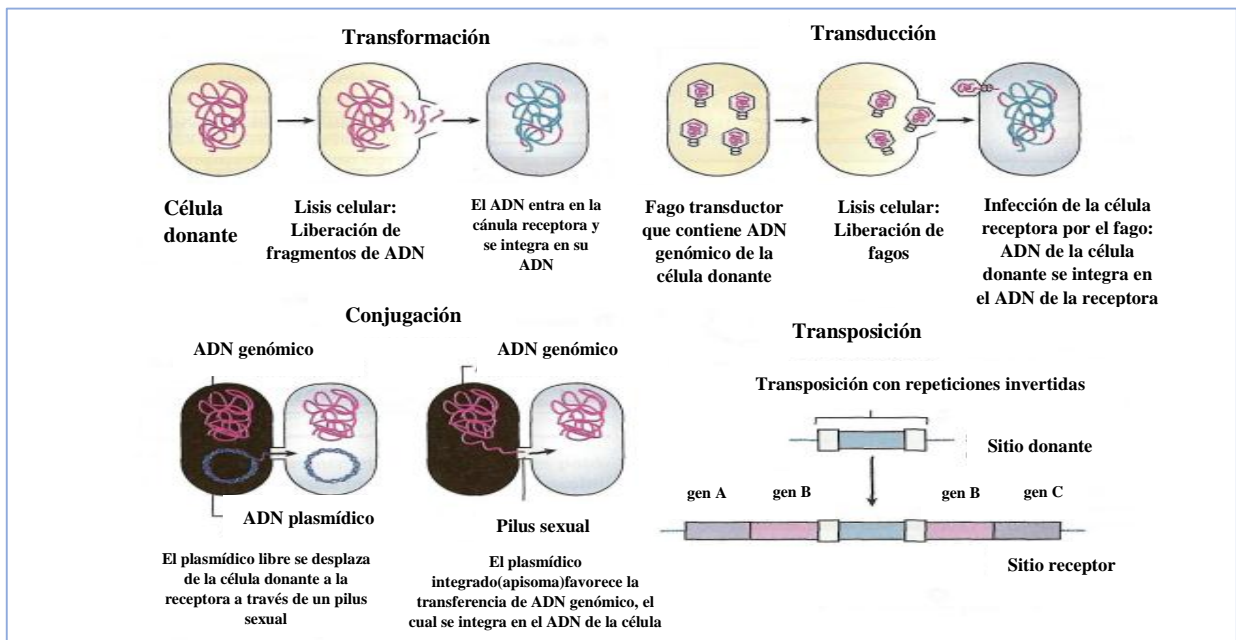


Ilustración 4 Mecanismos de transferencia genética en bacterias

Fuente: Murray et al.: Microbiología médica. 8va edición 2017. Página 42.

Métodos para la determinación de sensibilidad y resistencia en los estudios microbiológicos.

La medición de la actividad antimicrobiana permite conocer la sensibilidad de los diferentes microorganismos a las diversas drogas antimicrobianas. Dicha actividad se mide *in vitro* para determinar: la potencia de una droga antimicrobiana frente a un microorganismo dado, su concentración en los líquidos del cuerpo o en los tejidos, y la sensibilidad de un microorganismo dado a concentraciones conocidas del medicamento²⁶.

Los métodos más utilizados son: dilución y difusión. En ambos métodos se trata de enfrentar un microorganismo a una muestra de concentración conocida del medicamento para apreciar y medir el comportamiento del crecimiento del microorganismo en un tiempo y a una temperatura dados y compararlos con un patrón estándar conocido, que actuará como referencia^{26, 31}.

Los métodos cuantitativos se prefieren a los cualitativos. Existen varios procedimientos para la determinación cuantitativa de la sensibilidad a los antimicrobianos, entre estos se encuentran: macrodilución en caldo, dilución en agar, microdilución en caldo, E Test y los métodos automatizados. El método más utilizado en la mayoría de los laboratorios microbiológicos es el método por difusión Bauer-Kirby³¹.

CAPITULO II

METODOLOGÍA

Tipo de investigación:

- **Descriptiva** porque se obtiene información de manera conjunta sobre las variables de estudio, describiendo la patogenia y resistencia antimicrobiana de las bacterias aisladas en los productos agrícolas provenientes de la cuenca del río Chanchán.
- **Enfoque mixto** se realizó una descripción de las variables de estudio, y se determinó la sensibilidad y resistencia antimicrobiana en las bacterias patógenas aisladas de los productos agrícolas, obteniendo así resultados que posteriormente se analizaron.
- **De campo** pues se recolectaron muestras de productos agrícolas de los diferentes puntos geográficos, los cuales se estudiaron para aislar e identificar las bacterias patógenas existentes en ellos y se determinó la susceptibilidad y resistencia antimicrobiana.
- **No experimental** ya que no se manipularon las variables, es decir que no se alteran las condiciones existentes.
- **Corte transversal:** el proyecto se ejecutó en un lugar delimitado (cultivos agrícolas a orillas de cuencas provenientes del río Chanchán) en un tiempo específico, durante el período mayo-julio del presente año.
- **Método Inductivo** pues se parte de lo particular a lo general, es decir, de la observación para proyectar una teoría.

Población y muestra.

Población: Conformada por 13 productos agrícolas cultivadas con aguas de los regadíos del río Chanchán.

Muestra: Se trabajó con la totalidad de la población.

Técnicas y procedimientos

Técnicas: Observación.

Instrumentos: Se utilizó la ficha de observación (Anexo 2) donde se recogieron los datos de las condiciones físicas y atmosféricas en que fueron tomadas las muestras.

Procedimientos:

Identificación del área de estudio y obtención de las muestras.

Para la investigación se utilizaron muestras de productos agrícolas cultivados con sistemas de riego provenientes del río Chanchán. Se hizo un recorrido para la determinación de puntos geográficos estratégicos para muestreo, donde se tomaron en cuenta las zonas más planas, estas se encuentran al este de la cuenca del río en las comunidades de Pungapala, San Francisco, Tixán, Palmira, Totoras, Cantón Alausí, Provincia de Chimborazo. Se identificaron seis diferentes puntos de riego.

Se identificó la presencia de cultivos en las cercanías entre 500 m a 1 km a partir de los puntos identificados para la toma de muestras de aguas del río, las que fueron estudiadas por otros investigadores. Por cada punto geográfico se recolectaron 3 muestras de productos agrícolas según existían en el lugar y de cada producto agrícola se tomaron varios ejemplares utilizando bolsas estériles herméticas asignándole su respectiva codificación (Anexo 5), además se tomó la altitud y temperatura ambiental (Anexo 3)

Las muestras obtenidas se transportaron con el sistema triple embalaje (fundas estériles, separadores de muestras, caja transportadora), hasta el Laboratorio de Investigación de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico, Facultad de Ciencias de la Salud, de la UNACH, donde siguiendo un protocolo de trabajo se realizó el respectivo estudio microbiológico.

Aislamiento e identificación de bacterias presentes en las muestras.

Se procedió a realizar el análisis microbiológico de las muestras, se utilizaron las debidas barreras de protección y precauciones con el objetivo de evitar posibles contaminaciones. Todo procedimiento se realizó bajo el mechero de bunsen y desinfectando el lugar de trabajo con alcohol al 70%. Con la ayuda de pinzas y bisturí estériles, se obtuvo del centro del producto 25 gr y se agregó a 225ml de Agua Peptonada como método pre-enriquecimiento (Anexo 5). A las 24 horas de incubación a 37°C con una jeringa estéril se tomó 1 ml del cultivo y se inoculó en 9 ml de Agua Peptonada nuevamente, incubando de igual forma (Anexo 5), transcurrido el tiempo a partir de esta dilución se realizaron cultivos, homogenizando bien la muestra se tomó 0.1ml con el asa de siembra calibrada, sembrando en placas de Agar Sangre (AS) y Agar

MacConkey (MC) previamente preparadas según indicaciones de la casa comercial Himedia® y rotuladas como es debido, se estrío la muestra mediante técnica por agotamiento (Anexo 5) y en posición invertida se incubó a 37°C durante 24 horas, aplicando de esta forma las normas microbiológicas establecidas²⁹.

Pasado el tiempo de incubación se hizo lectura de las placas, identificando las características de cada una de las colonias existentes y se realizó la tinción de Gram siguiendo el protocolo de Hans Christian Gram, para visualizar morfología, agrupación y diferencias constitutivas en la estructura de la pared celular bacteriana.

Pasos seguidos para la realización de la tinción de Gram:

1. Se colocó 0,05 ml de solución fisiológica estéril sobre una placa porta objetos tomando colonias bacterianas puras para la realización del frotis.
2. Seguido se dejó secar a temperatura ambiente.
3. Luego se fijó la muestra al portaobjetos pasándolo tres o cuatro veces a través de la llama del mechero Bunsen para que el material no se lavara durante la tinción.
4. Posteriormente se cubrió la placa con cristal violeta por 1 minuto.
5. Con agua destilada se lavó sin que cayera directamente sobre el frotis hasta que salió todo el colorante.
6. Seguido se escurrió y se agregó la solución yodada de Gram (Lugol) como mordiente durante 1 minuto.
7. Se lavó al igual que en el paso 5, para pasar a la decoloración con alcohol cetona durante 30 segundos.
8. Se lavó de nuevo para eliminar el producto y finalmente se agregó el colorante de contraste, safranina y se dejó actuar durante 1 minuto.
9. Enjuagando de nuevo la placa, se escurrió y se dejó secar a temperatura ambiente.
10. Luego se observó el con lente de aumento 100x y aceite de inmersión para visualizar las bacterias: las grampositivas se tiñen de azul oscuro y las gramnegativas aparecen de color rosa o rojo³² (Anexo 5).

Después de esta observación se realizaron varias pruebas tanto fisiológicas como bioquímicas para llegar a la clasificación de género y especie según los medios y reactivos presentes en el laboratorio. Para colonias de bacterias grampositivas aisladas en agar Sangre se observó si existía la presencia de α , β , o γ hemólisis, además se le realizó la prueba de catalasa, bilis esculina y crecimiento en CINa al 6,5% (Anexo 5).

Mientras que para las gramnegativas que crecieron de igual forma en AS y MC se inocularon en agar Kligler para observar si eran fermentadoras de la lactosa o la glucosa, la presencia de SH_2 y si producían gas o no³².

Para ver la producción de ureasa se utilizó el agar Urea, el agar Citrato como fuente de energía, caldo Malonato como fuente de carbono y nitrógeno, agar MIO (motilidad indol ornitina) para observar la motilidad bacteriana, la producción de indol y la actividad enzimática ornitina descarboxilasa, el agar Lisina Hierro (LIA) para la desaminación o descarboxilación de la lisina²⁹ (Anexo 5). En el caso de las bacterias no fermentadoras de la lactosa ni la glucosa (BNF) se les realizó la prueba de la oxidasa para ver si producían esta enzima. En las que eran oxidasa positivas se observó la presencia de hemólisis en agar sangre, crecimiento a temperaturas de 37°C y a 42°C, más la producción de pigmento³² (Anexo 5).

Determinación de sensibilidad y resistencia antimicrobiana de bacterias de interés clínico.

Después de llegar a la identificación de género y especie de cada una de las bacterias aisladas, se procedió a medir la actividad antimicrobiana realizando el antibiograma (ATB) mediante el método por difusión de Kirby Bauer. El medio de cultivo que se utilizó fue el Agar Müller Hinton DifcoTM (MH) deshidratado, se pesó, diluyó y autoclaveó según la casa comercial, se dejó enfriar entre 45-50°C para verter en placas Petri a una altura de 4 mm, se dejó solidificar. De la cepa a estudiar (cultivo puro) se tocaron de la superficie del Ag Nutriente de 3-5 colonias para transferir a un tubo de cultivo con NaCl al 0.9% logrando una turbidez similar al tubo 0,5 del patrón de McFarland que corresponde aproximadamente a $1,5 \times 10^8$ CFU/ ml^{31,32}.

Para sembrar en placas Petri se procedió a introducir un hisopo estéril en el tubo de cultivo, se rotó para embeberlo bien del inóculo, luego para eliminar el sobrante se apretó el hisopo contra las paredes del tubo con movimientos rotatorios; para luego sembrar en la placa de Ag MH estriando en 3 direcciones de manera que quede uniformemente distribuido en un ángulo de 60°. Tapando la placa y se dejó reposar por 15 minutos para posteriormente colocar los discos de ATB con pinza estéril a 15mm del borde y 20 mm de equidistancia. Presionar discos con delicadeza e incubar a 35°C por 18-24h (Anexo 5). Pasado este tiempo se realizó la lectura midiendo con regla milimetrada los halos de inhibición ^{31,32} (Anexo 5).

Los resultados se interpretaron de acuerdo a las tablas publicadas por la guía internacional Clinical & Laboratory Standards Institute CLSI 2019 (Documento M100) y se categorizó como sensible, intermedio o resistente³¹ (Anexo N°4).

- **Procesamiento estadístico:** Se empleó la estadística descriptiva con los resultados obtenidos mediante la aplicación de hojas de cálculo que pertenece al sistema operativo Microsoft Office 2013
- **Consideraciones éticas:** se respetaron las normas éticas de la investigación científica. No existen conflictos bioéticos porque las muestras no son de origen biológico.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se conoce que a medida que aumenta la altitud disminuye la temperatura y existe menor presión atmosférica, es decir menos oxígeno y al relacionarlo con el crecimiento de bacterias, algunas crecen bien a temperaturas altas con presencia de O₂ y otras a menos concentraciones del mismo, pero con bajas temperaturas ³³.

Muchas bacterias Gram negativas tienen un crecimiento óptimo entre 22°C y 37 C, mientras que algunas Gram positivas soportan temperaturas entre 10°C a 45°C, lo cual queda demostrado en la Tabla 1 que en los puntos geográficos de menor altitud y mayor temperatura hubo más crecimiento de bacterias Gram negativas, mientras que las Gram positivas, se desarrollaron más donde la temperatura fue menor y mayor altitud ^{27,33}.

Tabla 1. Puntos de muestreo según altitud, temperatura del ambiente y crecimiento bacteriano de los productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán.

Puntos	Lugar	Ubicación	Altitud	Temperatura Ambiente (°C)	Bacterias Gram -	Bacterias Gram +
Punto 1	Puente Rumichaca	Alausí, vía Sibambe	2300	20	9	0
Punto 2	Puente Illibuchi	Alausí, vía principal	2340	19	3	1
Punto 3	Estación de Tixán	Alausí, Tixán	2860	20	1	2
Punto 4	Totoras Vía Cocan	Alausí, Totoras	3760	14	1	3
Punto 5	El Cortijo	Alausí, Totoras	3720	10	1	2
Punto 6	Entrada de Palmira	Alausí, Palmira	3080	18	1	0

Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH

A mayor altitud existe menor temperatura lo cual en algunas bacterias provoca un descenso de la fluidez de la membrana de modo que se detienen los procesos de transporte de nutrientes, modificando la velocidad de crecimiento, provocando cambios que pueden ocasionar la muerte del microorganismo^{34, 35}.

El estudio de los microorganismos del aire se remonta desde el 1879 cuando Pierre Miquel, fue el investigador, que más estudió los microorganismos del aire, en el observatorio de Montsouris en París y es en 1882 que se produce la generalización de los análisis microbiológicos del aire, estudiándose el número y tipo presentes en diversos ambientes. No sólo determinó el número por m³ presente en cada uno de estos ambientes, sino su naturaleza y propiedades patógenas, así como la influencia de los diversos factores como temperatura, lluvia, corrientes de aire, altitud, número de personas, etc. y por supuesto la posibilidad de transmisión por el aire de enfermedades contagiosas. A demás demostró que a medida que aumenta la altitud, disminuye el número de microorganismos, en los análisis que realizó desde el tejado del Panteón de París (82 m)^{34, 35}.

Otros investigadores confirmaron dicha hipótesis, como Freudenreich entre el año 1883 -1884 que estudió el aire de diversos picos de los Alpes, concluyendo que a 300 m de altura hay muy pocos microorganismos y que por encima de los 4.000 la pureza era absoluta y Cristiani por su cuenta, en 1893, obtiene los mismos resultados en experimentos realizados en globo³⁴.

Las bacterias patógenas contaminantes del agua en su mayoría son de tipo gramnegativas, por lo general provenientes de la microbiota intestinal y las bacterias grampositivas no se aíslan con frecuencia en aguas, pero existen algunos géneros como el *Enterococcus* que es indicador de contaminación fecal cuando se encuentra presente, según lo planteado en el Manual de Bergey³⁶, correspondiendo esto, con nuestros hallazgos determinados mediante la coloración de Gram (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución porcentual de los aislados bacterianos según la coloración de Gram

Coloración Gram	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Gram negativas	16	66,66
Gram positivas	8	33,34
Total	24	100%

Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH.

El 66,66% de las bacterias aisladas fueron las gramnegativas, resultados similares a los encontrados en estudios consultados.

Las bacterias patógenas producen muchas enfermedades infecciosas, en su mayoría generan enfermedades a nivel digestivo, transmitidas por bacterias provenientes del tracto gastrointestinal de animales y humanos, patógenos que son vertidos a los sistemas de aguas cloacales y hacen de estos su hábitad^{23,24} y de esta forma se pueden contaminar los alimentos.

En el estudio realizado en productos agrícolas se aislaron bacterias que corresponden con el enunciado anterior y que pueden causar enfermedades gastroentéricas que se presentan desde una sintomatología leve hasta causar la muerte (Tabla 3).

Tabla 3. Aislamiento bacteriano según el producto agrícola, altura y temperatura de cada punto muestreado de la cuenca del río Chanchán.

Puntos de muestreo	Muestras.	Especie identificada.	Altura (m)	Temp. Ambiente °C	Bacterias por cada punto.
Punto 1 Puente Rumichaca	Lechuga crespa	<i>St. maltophilia.</i>	2300	20	9
		<i>K. pneumoniae</i> (cepa 1)			
	<i>C. diversus</i> (cepa 1)				
	<i>C. diversus</i> (cepa 2)				
Lechuga repollada	<i>E. aerogenes</i>				
	<i>Aeromonas</i> spp.				
	<i>P. shigelloides</i>				
Culantro	<i>K. oxytoca</i> (cepa 2) <i>Y. enterocolitica</i>				
Punto 2 Puente Illibuchi	Frutilla	<i>K. oxytoca</i> (cepa 3)	2340	19	4
	Papa	<i>P. aeruginosa</i>			
		<i>C. diversus</i> (cepa 3) <i>Enterococcus</i> spp.			
Punto 3 Estación de Tixán	Zanahoria	<i>Enterococcus</i> spp	2860	20	3
	Habas	<i>C. amalonaticus</i> <i>Enterococcus</i> spp.			
Punto 4 Totoras Vía Cocan	Ocas	<i>Enterococcus</i> spp	3760	14	4
	papa	<i>Enterococcus</i> spp.			
	Mashua	<i>E. cloacae</i> (cepa 1) <i>Enterococcus</i> spp			
Punto 5 El Cortijo	Culantro	<i>Enterococcus</i> spp.	3720	10	3
		<i>E. cloacae</i> (cepa 2)			
Punto 6 Entrada a Palmira	Habas	<i>Enterococcus</i> spp	3080	18	1
		<i>K. pneumoniae</i> (cepa 4)			
TOTAL					24

Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH

Del género *Klebsiella* se aislaron dos especies: *K. oxytoca* del culantro del punto 1 y de la frutilla en el punto 2 y *K. pneumoniae* de la lechuga crespa y de habas del punto 6, productos que se ingieren crudos o con poca cocción. Resultados similares obtuvieron de muestras de lechugas recolectadas de las parcelas de producción de provincia de Quillacollo, Bolivia, pero aparte de

la *K. pneumoniae* identificaron también *Citrobacter* spp, *Enterobacter cloacae*, donde los productores regaron sus plantaciones con aguas de sistemas de riego lo que podría favorecer a la contaminación bacteriana⁷. González en Colombia y Saltos en Ecuador analizaron fresas y papas respectivamente, donde obtuvieron como resultados *Aerobios mesófilos*^{39, 40}.

La *St. maltophilia* creció de la lechuga crespa, es un microorganismo ubicuo cuyo hábitat principal es acuático incluyendo ríos, pozos, lagos, agua embotellada, y aguas negras, el suelo, plantas, animales y residuos orgánicos, pero a la vez en ocasiones puede ser muy patógeno como en sepsis nosocomial, sobre todo para personas con un sistema inmunológico deficiente⁴¹.

De la zanahoria se obtuvo una cepa de *Enterococcus* spp, sin embargo, Pérez y colaboradores en el Perú en estudios realizados en este mismo producto encontraron *Listeria monocytogenes*⁴².

Otros aislamientos de *Enterococcus* spp fue a partir de la papa, rábano, culantro, mashua, ocas y habas. Este microorganismo grampositivo podemos encontrarlo en aguas albañales no tratadas y como resultado de la contaminación con heces de animales en el agua, la vegetación y en superficies del entorno ambiental, lo que significa que los alimentos puedan contaminarse con éste y de esta forma se coloniza el intestino del hombre, pero no va a provocar enfermedades gastroentéricas sino por vía endógena es capaz de producir bacteriemia, endocarditis, infecciones del aparato urinario, infecciones de heridas, entre otras y se le agrega a esto que existen muy pocos antibióticos para ser tratadas estas infecciones por la resistencia intrínseca que tiene este microorganismo²⁶

Pero además está relacionado con factores de riesgo como son el uso irracional de antibióticos de amplio espectro, inmunodepresión, enfermedades debilitantes, uso de catéter, la Diabetes Mellitus, infecciones por *Clostridium difficile*, estadía hospitalaria prolongada, diálisis peritoneal, hemodiálisis y transplantados sobre todo renales pueden invadir y producir infecciones o diseminarse como patógeno nosocomial^{26, 27}.

Salgado y Grijalva encuentran de culantro y perejil expendidos en los mercados de Quito valores significativos de *Coliformes Totales*, *Coliformes Fecales* y *Escherichia coli*⁴³, significando

contaminación fecal de los mismos, al igual en nuestro estudio se encontraron en la hierba de las familias apiáceas el culantro, bacterias que viven en el intestino del hombre y los animales como la *K. oxytoca*, *Y. enterocolitica*, *E. cloacae* y *Enterococcus spp.* Esta especie como hierba aromática se consume cruda la mayoría de las veces para aderezar ensaladas, sopas, etc.

En la tabla 4 se muestra por familias el aislamiento bacteriano que se obtuvo en los productos agrícolas provenientes de la cuenca del río Chanchán.

Tabla 4. Bacterias patógenas aisladas de productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán.

Familia	Género y especie	Frecuencia	Porcentaje (%)
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	54,1
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	
	<i>Citrobacter diversus</i>	3	
	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	2	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1	
<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas sp</i>	1	4,1
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Enterococcus sp</i>	8	33,4
<i>Pseudomonaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	8,4
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	
TOTAL		24	100

Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH

La familia *Enterobacteriaceae* fue la más aislada seguida de la *Streptococcaceae* con el 54.1 % y 33,4% respectivamente.

La *Pseudomonaceae* (8,4%) a pesar que se encontró en un porcentaje bajo y no es causante frecuente de sintomatología digestiva hay que darle importancia, pues son bacilos gramnegativos no fermentadores (BNF) y su hábitat principal es el acuático, el suelo, las plantas, los animales, pero se consideran patógenos nosocomiales y sobre todo la *Stenotrophomonas*

maltophilia es considerada un patógenos emergente desde la década del 2000 y aunque es un microorganismo con limitada virulencia, presenta resistencia intrínseca a múltiples antimicrobianos y puede producir un amplio espectro clínico de infecciones, principalmente en pacientes con factores de riesgo²⁶.

Sin embargo, Bayona en Bogotá encontró *Salmonella* spp. en frutas³⁷, mientras que Chicaiza en el 2015 estudió microbiológicamente la Fresa (*Fragaria vesca*) de Ambato, pero no obtuvo crecimiento bacteriano³⁸.

En Bolivia, Rodríguez y colaboradores coincidieron con el presente estudio al aislar mayormente especies de enterobacterias tanto en muestras de lechugas recolectadas de las parcelas de producción como de puestos de venta de comida correspondientes a dos mercados, entre ellas se encuentran el *Citrobacter* ssp, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia enterocolitica*⁷.

Molina y Orozco de la provincia Chimborazo también obtuvieron similares patógenos perjudiciales al hombre, a partir del estudio microbiológico del agua del río Chambo y en el río Chibunga, Mur y Marcillo aislaron de igual forma mayor porcentaje de bacterias pertenecientes al grupo de enterobacterias^{12, 13}.

Se puede observar en la Tabla 5 que el lugar de muestreo donde se encontró mayor porcentaje de bacterias patógenas fue en el sector del Puente Rumichaca con un 37,5% en Alausí, es el punto de los seis muestreados con menos altitud y mayor temperatura y crecimiento de enterobacterias, lo cual coincide con lo descrito en las bibliografías revisadas, además de otros factores influyentes como es la presencia de animales domésticos y casas habitables en sus alrededores.

Tabla 5. Distribución según el punto geográfico de las bacterias patógenas aisladas de productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán.

Puntos de muestreo	Bacterias aisladas													
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>C. diversus</i>	<i>C. amalonaticus</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>P. shigelloides</i>	<i>Aeromonas sp</i>	<i>Enterococcus sp</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. maltophilia</i>	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Punto 1: Puente Rumichaca Alausí	1	1	2		1		1	1	1			1	9	37,5
Punto 2: Puente Illibuchi Alausí		1	1							1	1		4	16,7
Punto 3: Estación de Tixán				1						2			3	12,5
Punto 4: Totorá Vía Cocan						1				3			4	16,7
Punto 5: Cortijo Alausí						1				2			3	12,5
Punto 6: Entrada de Palmira	1												1	4,1
Total	2	2	3	1	1	2	1	1	1	8	1	1	24	100

Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH

En el Puente Illibuchi en Alausí y Totorá Vía Cocan se obtuvo un crecimiento de un 16,7% y de 12,5% en los puntos de Estación de Tixán y Cortijo en Alausí, mientras que en la entrada de Palmira sólo fue de un 4,1%.

El punto de muestreo de la estación del tren de Tixán se encuentra aproximadamente a unos 150 metros de una laguna de aguas residuales pertenecientes a la comunidad de Tixán, sin embargo, es un sector donde se aisló poca cantidad de bacterias patógenas solamente 3 cepas, pero de ellas 2 corresponden a *Enterococcus spp* que significa contaminación fecal y es muy importante conocerlo y evitar su contaminación pues es un microorganismo que ha alcanzado una gran relevancia como agente patógeno en infecciones nosocomiales en los últimos años y presenta

una resistencia bacteriana de importancia, donde el grupo de antibióticos efectivos contra él es muy reducido ^{31,36}.

Mediante el método por difusión de Kirby Bauer se midió la susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de las bacterias de interés clínico aisladas de los diferentes productos agrícolas. Los resultados se interpretaron según el Documento M100 de las CLSI 2019³¹ para categorizar cada cepa frente a los antibióticos usados como sensible, intermedia y resistente, pudiendo observarse en las Tablas 6, 7, 8, 9 y 10.

Tabla 6. Patrón de susceptibilidad y resistencia identificado del género *Klebsiella* aislado de productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán.

MUESTRA	GN	K	TE	CIP	AN	SXT	CRO	CAZ	IPM	ATM	AZM	AX	AMC	CXT
<i>Klebsiella Pneumoniae</i> (cepa 1)	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S
<i>Klebsiella Pneumoniae</i> (cepa 2)	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
<i>Klebsiella Oxytoca</i> (cepa 3)	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S
<i>Klebsiella Oxytoca</i> (cepa 4)	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S

GE: gentamicina; K: kanamicina; TE: tetraciclina; CIP: ciprofloxacino; AN: ácido nalidíxico; SXT: Sulphamethoxazole/ Trimethoprim CRO: ceftriaxone; CAZ: ceftazidime; IPM: imipenem; ATM: aztreonam; AZM: azitromicina; AX: amoxicilina; AMC: amoxicilina/clavulánico; CXT: cefotaxima

Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH

El género *Klebsiella* representado por *K.pneumoniae* y *K. oxytoca*, dos cepas de cada una, fueron el 100% sensible a casi todos los antibióticos probados, excepto para Azitromicina, Amoxicilina y Amoxicilina/clavulánico que se comportó entre un 50% de intermedia a resistente. La *K. oxytoca* si fue el 100% resistente para la Kanamicina. Mientras que la *K.pneumoniae* y *K.*

oxytoca aisladas por Orozco y Molina en su estudio reportaron un 100% de sensibilidad frente a los antimicrobianos al igual que Marcillo y Mur¹². En Nigeria los aislamientos de este género en muestras de vegetales se comportó resistentes a la ampicilina (98.4%), amoxicilina (52.5%) y nitrofurantoína (36.1%)⁴⁴.

Tabla 7. Patrón de susceptibilidad y resistencia identificado del resto de la familia *Enterobacteriaceae* aisladas de productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán.

MUESTRA	GN	K	TE	CIP	AN	SXT	CRO	CAZ	IPM	ATM	AZM	AX	FOX
<i>Citrobacter diversus</i> (cepa 1) L. crespá	<u>R</u>	<u>R</u>	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	-
<i>Citrobacter diversus</i> (cepa 2)	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	<u>R</u>	-
<i>Citrobacter diversus</i> (cepa 3)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	<u>R</u>	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	S	<u>R</u>	<u>R</u>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	<u>R</u>	-
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	<u>R</u>	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (cepa 1)	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	<u>R</u>
<i>Enterobacter cloacae</i> (cepa 2)	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	<u>R</u>	S

GE: gentamicina; K: kanamicina; TE: tetraciclina; CIP: ciprofloxacino; AN: ácido nalidíxico; SXT: Sulphamethoxazole/ Trimethoprim CRO: ceftriaxone; CAZ: ceftazidime; IPM: imipenem; ATM: aztreonam; AZM: azitromicina; AX: amoxicilina; FOX: cefoxitin

Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH

En la Tabla 7 se muestra el patrón de susceptibilidad y resistencia de las otras cepas de enterobacterias aisladas, las cuales presentan gran sensibilidad a la mayoría de antimicrobianos utilizados. En muestras de vegetales se aislaron en Nigeria *Citrobacter diversus* y *Enterobacter cloacae*, con alto porcentaje de resistencia a la ampicilina y amoxicilina⁴⁴, coincidiendo con este estudio donde estos dos géneros de enterobacterias presentan un 50% y un 66,66% de resistencia a la amoxicilina.

Yersinia enterocolitica a pesar de ser un patógeno que produce graves cuadros diarreicos, la cepa aislada en esta investigación tuvo buena sensibilidad excepto frente a la amoxicilina, siendo similar este resultado por los obtenidos de las aguas del río Chibunga por Mur y Marcillo¹².

La única cepa de *Plesiomonas shigelloides* presentó un 75% de sensibilidad a los antibióticos probados y con resistencia solamente a la Kanamicina y Tetraciclina, a diferencia de Mur y Marcillo¹², los aislados que obtuvieron de esta bacteria presentaron multiresistencia.

Otras investigaciones realizadas en estanques y aguas de canales en la Llanura de Panonia, Serbia encontraron abundante crecimiento de diferentes serotipos de *Plesiomonas shigelloides*, al igual que en Río de Janeiro también encontraron aislados de mejillones frescos y precocinados, pero en estos estudios y otras bibliografías consultadas no manifiestan la realización de pruebas de sensibilidad y resistencia^{45, 46}.

Tabla 8. Patrón de susceptibilidad y resistencia a los antibióticos de la familia *Pseudomonadaceae* aislada de productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán.

MUESTRA	GN	K	CT	CIP	CAZ	IPM	ATM
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	S	S	S	S	S	S	<u>R</u>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	I

GE: gentamicina; K: kanamicina; CT: colistin; CIP: ciprofloxacino; CAZ: ceftazidime; IPM: imipenem; ATM: aztreonam

Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH

En la Tabla 8 se aprecia que los antibióticos a los cuales las cepas obtenidas de la familia *Pseudomonaceae* presentaron sensibilidad en un 100% fueron gentamicina, kanamicina, colistin, ciprofloxacino, ceftazidime, imipenem; a excepción de aztreonam que presenta una resistencia frente a la cepa de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Aunque la *S. maltophilia* es un microorganismo con limitada virulencia, posee, sin embargo, una resistencia intrínseca de alto grado que le confiere un carácter de multirresistencia, y en combinación con las resistencias adquiridas por presión selectiva de los antimicrobianos, esto le confiere una ventaja ecológica sobre otros posibles patógenos en el medio hospitalario. Presenta además en su superficie cargas positivas y fimbrias, las cuales le permiten tener una habilidad inherente para formar películas y protegerse así de las defensas del huésped y de los antibióticos^{47, 48}.

Pseudomonas aeruginosa ha sido aislada previamente en aguas de riego y vegetales y se ha visto envuelta en distintas afecciones a la salud, incluyendo infecciones oportunistas, es por esto que la utilización de agua contaminada para los cultivos y el manejo de los mismos, podría extender la carga bacteriana y la transmisión de estos patógenos, por esta razón a pesar de presentar buena sensibilidad a los antimicrobianos hay que tener precaución con la ingestión de aguas y alimentos contaminados por la misma, pues por sus características puede causar graves infecciones en los pacientes inmunocomprometidos²⁶.

En la Tabla 9 se muestra el patrón de susceptibilidad y resistencia a los antimicrobianos de la familia *Aeromonadaceae* aislada en la presente investigación, observando que la cepa de *Aeromonas* spp. es únicamente resistente a la amoxicilina a diferencia de la investigación realizada por Marcillo y Mur que presentaron un 100% de sensibilidad en este tipo de bacteria¹².

Tabla 9. Patrón de susceptibilidad y resistencia de la familia Aeromonadaceae aislada de productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán.

MUESTRA	GN	K	TE	CIP	AN	SXT	CRO	CAZ	IPM	ATM	AZM	AX	CT
<i>Aeromonas spp.</i>	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	<u>R</u>	S

GE: gentamicina; K: kanamicina; TE: tetraciclina; CIP: ciprofloxacino; AN: ácido nalidíxico; SXT: Sulphamethoxazole/ Trimethoprim CRO: ceftriaxone; CAZ: ceftazidime; IPM: imipenem; ATM: aztreonam; AZM: azitromicina; AX: amoxicilina; CT: colistin

Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH.

En el 2012 Muñoz y colaboradores⁴⁹ aíslan esta bacteria en Ostión de mangle destinados para consumo humano, la cual mostró resistencia a amoxicilina y cefalotina en un 80%, resistencia que puede corresponder al uso indiscriminado de antibióticos o condiciones sanitarias deficientes que favorecen la adquisición de R plásmidos y transposones que determinan la propagación de resistencia antibiótica.

En cuanto a salud se refiere, cualquier especie del género *Aeromonas* es causa de gastroenteritis, donde pueden existir aislamientos con genes de virulencia, principalmente relacionados con la producción de enterotoxinas, las cuales se han encontrado en pacientes con diarrea, pero además pueden presentarse infecciones extraintestinales relacionadas frecuentemente con heridas ocurridas por traumas o aquellas que hayan estado en contacto con el agua contaminada, otras como la septicemia que se presenta asociada a pacientes inmunocomprometidos y menos frecuente la otitis, conjuntivitis, peritonitis, colecistitis, endocarditis, meningitis y osteomielitis²⁶.

El género *Enterococcus* es un microorganismo que es y ha sido estudiado en las últimas décadas, porque de ser flora normal del cuerpo, ha emergido como un patógeno nosocomial y sobre todo cuando es multiresistente³¹. Los resultados obtenidos de este aislamiento en cuanto a susceptibilidad y resistencia, revelan en la Tabla 10 un por ciento alto de sensibilidad, con un 100% para la vancomicina, amoxicilina y penicilina, 87,5% a la tetraciclina y para la ciprofloxacina un 37,5%.

Tabla 10. Patrón de susceptibilidad y resistencia de la familia *Enterococcus* aislada de productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán.

MUESTRA	PRODUCTO	TE	CIP	VA	AX	P
<i>Enterococcus spp.</i>	Papa	S	I	S	S	S
<i>Enterococcus spp.</i>	Zanahoria	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus spp.</i>	Habas	S	I	S	S	S
<i>Enterococcus spp.</i>	Ocas	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus spp.</i>	Papas	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus spp.</i>	Mashua	<u>R</u>	<u>R</u>	S	S	S
<i>Enterococcus spp.</i>	Culantro	S	<u>R</u>	S	S	S
<i>Enterococcus spp.</i>	Haba	S	I	S	S	S

TE: tetraciclina; CIP: ciprofloxacino; V: vancomicina; AX: amoxicilina; P: penicilina

Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH.

A pesar de tener buena sensibilidad su aislamiento se considera contaminación fecal, pues se encuentra en el intestino del hombre y animales. Las 2 cepas aisladas a partir de las habas fueron productos recogidos en diferentes puntos geográficos, sin embargo, presentan un patrón de sensibilidad y resistencia idénticos con un 80% de sensibilidad. A diferencia de las papas que tienen diferente patrón. La cepa aislada a partir de la Mashua es la que mostró resistencia a dos antibióticos exclusivamente.

A diferencia de este estudio Moreira en Paraná, Brasil obtuvo a partir de productos vegetales 39 aislamientos de *Enterococcus* los cuales presentaron multiresistencia frente a todos los antibióticos probados de uso clínico común. Según las CLSI 2019 Documento M100, se dice que los enterococos susceptibles a la penicilina son previsiblemente susceptibles también a la ampicilina, amoxicilina, ampicilina-sulbactam, amoxicilina-clavulanato y piperacilina-tazobactam para los enterococos que no producen β -lactamasa. Sin embargo, a la inversa no se puede suponer que los susceptibles a la ampicilina sean susceptibles a la penicilina^{50,34}.

CONCLUSIONES

1. En esta investigación se realizó el aislamiento de bacterias de interés clínico de acuerdo a sus características de crecimiento, según la altitud y la temperatura, obteniendo mayor cantidad de enterobacterias de los productos agrícolas recolectados en las inmediaciones del río Chanchán, en el punto 1 Puente Rumichaca, Alausí, donde existió menos altitud y mayor temperatura.
2. De las 13 muestras recogidas de productos agrícolas en los diferentes sitios geográficos muestreados se aislaron 24 bacterias patógenas, de ellas 16 gramnegativas y 8 grampositivas, las cuales pueden ser causantes de infecciones intestinales y extraintestinales. El mayor crecimiento bacteriano correspondió con el 54,1% a la familia *Enterobacteriaceae* y de ésta los géneros *Klebsiella* (*K. pneumoniae* y *K. oxytoca*), *Citrobacter* (*C. diversus* y *C. amalonaticus*), *Enterobacter* (*E. aerogenes* y *E. cloacae*), *Yersinia* (*Y. enterocolitica*) y la *Plesiomonas shigelloides*. El 33,4% perteneció a la familia *Streptococcaceae* representada por el género *Enterococcus*, patógeno responsable de afecciones extraintestinales que van desde una infección urinaria hasta una septicemia y muerte, sobre todo en personas inmunodeprimidos. En menor proporción se encontró aislados de la familia *Aeromonadaceae* y *Pseudomonaceae*, esto no quiere decir que sean menos importantes, es todo lo contrario, pues producen cuadros graves extra e intrainstestinales con preferencia en pacientes inmunocomprometidos.
3. En cuanto a la actividad antimicrobiana mediante el método Kirby Bauer, de forma general todos los microorganismos aislados presentaron buena sensibilidad y no mostraron mecanismos de resistencia frente a los antibióticos, aunque no se descarta que en un momento determinado estas bacterias se vuelvan multirresistentes por el mal uso y abuso de antibióticos, además de los contaminantes vertidos en las aguas de este río.

RECOMENDACIONES

1. Realizar investigaciones en este campo de estudio, que abarquen otros productos agrícolas en diferentes ciudades, y que sus resultados corroboren esta investigación.
2. Profundizar en el estudio realizado para llegar a clasificar en especie la totalidad de los microorganismos aislados.
3. Realizar estudios de medición antimicrobiana a nivel molecular, para buscar mecanismos de resistencia en las bacterias patógenas aisladas en productos agrícolas obtenidos de las inmediaciones del río Chanchán.

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Inocuidad de los alimentos. [Internet]. 2017 [consulta el 10 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety#>
2. Organización Mundial de la Salud. Relación del agua, el saneamiento y la higiene con la salud [Internet] [consulta el 12 de mayo de 2019]. Disponible en: https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/facts2004/es/
3. Crim S, Iwamoto M, Huang J, Griffin P, Gilliss D. Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006-2013. Rev. Centers for Disease Control and Prevention [Internet] 2014 [consulta el 20 de mayo de 2019] 63(15): 328-332. Disponible en: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6315a3.htm?s_cid=mm6315a3_w
4. Enríquez E, Flores J, Di Giovanni, George F, Corral B, Osuna P. Contaminación fecal en agua potable del valle de Juárez [Internet] México: Terra Latinoamericana; 2013 [consulta el 20 de mayo de 2019] 31(2): 135-143. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/573/57328308006.pdf>
5. Corral B, Flores J, Olivas E, Osuna P, Giovanni G. Contaminación fecal en agua potable del Valle de Juárez. Rev Terra Latinoamericana [Internet]. 2013 [consulta el 20 de mayo de 2019] 31(2): Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792013000300135&lang=es
6. Ministerio de Salud y Protección Social, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Documento de Estado Actual de Inocuidad de los Alimentos. Bogotá, D. C.: Departamento de Salud Nutricional, Alimentos y Bebidas; 2013.
7. Rodríguez M, Zapata M, Solano M, Lozano D, Torrico F, Torrico M. Evaluación de la contaminación microbiológica de la lechuga (*lactuca sativa*) en la cadena alimentaria, provincia de Quillacollo, Cochabamba, Bolivia 2015. Rev. Scielo [Internet]. 2015

[consulta el 25 de junio de 2019] 38(2): Disponible en:
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662015000200006

8. Castro M, Basualdo M, Gómez C, Díaz E, Ugnia L. Inocuidad en ensaladas de hortalizas mínimamente procesadas listas para su consumo. Rev. Científica FAV-UNRC [Internet]. 2018 [consulta el 25 de junio de 2019] 1(1): Disponible en: www.ayv.unrc.edu.ar/ojs/index.php/Ab_Intus/article/download/51/12/
9. Ortega J, Vélez A. Determinación de coliformes totales y *E. coli* en muestras de lechuga expandidas en cuatro mercados de la ciudad de Cuenca. [Tesis tercer nivel] Cuenca: Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca. 2013.
10. Cabascango, S. Determinación microbiológica y de metales pesados en berro expandido en los diferentes mercados del Distrito Metropolitano de Quito. [Tesis tercer nivel] Quito: Universidad Politécnica Salesiana. 2016.
11. Marcillo K, Mur Ll. Resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas aisladas del regadío del río Chibunga. [Tesis tercer nivel] Riobamba: Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo. 2018.
12. Molina J, Orozco J. Detección de resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico aisladas en el Río Chambo [Tesis tercer nivel] Riobamba: Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo. 2019.
13. Puyol F, Razo A. Determinación de la calidad de agua del sistema de riego “Chipungales” y su incidencia en la producción de maíz de la comunidad Pungal Santa Marianita del cantón Guano. [Tesis tercer nivel] Riobamba: Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Chimborazo. 2016.
14. Guzman V, Narvaez R. Línea base para el monitoreo de la calidad de agua de riego en la demarcación hidrográfica del Guayas. Secretaria Nacional del Agua. Quito, 2010
15. Acevedo R, Jaimes J, Severiche C. Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. Rev. Scielo [Internet] 2015 [consulta el 10 de mayo de 2019] 10(2): 160 -172. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1909-04552015000200015&script=sci_abstract&tlng=es
16. Alós. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Rev. Elsevier [Internet] 2015 [consulta el 12 de mayo de 2019] 33(10): 692 - 699. Disponible en:

<https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica28-articulo-resistencia-bacteriana-los-antibioticos-una-S0213005X14003413>

17. Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021 [Internet] Ecuador. Secretaria Nacional de Planificación y Desarrollo; 2015 [consulta el 12 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://planparatodoscloud.senplades.gob.ec/objetivo6>
18. EL PAÍS. El agua contaminada causa más muertos que cualquier guerra. La ONU alerta del problema creciente de la gestión de los vertidos residuales en el Día Mundial del Agua. Madrid 22 MAR 2010 - 13:48 CET
19. Maass J. El manejo de cuencas desde un enfoque sociosistémico. Rev. Trimestral, 2015.
20. Mapas Ecuador. Río Chanchán, Get a map; Disponible en: [http://es.getamap.net/mapas/ecuador/ecuador_\(general\)/_chanchan_rio/](http://es.getamap.net/mapas/ecuador/ecuador_(general)/_chanchan_rio/)
21. Ríos E. Producción agrícola (en línea). España: Ed. Síntesis, S.A. 2016 (19 de septiembre del 2019); Disponible en: <https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773260.pdf>
22. Inocuidad de los alimentos. Organización Mundial de la Salud (OMS). Estrategia global de la OMS para la inocuidad de los alimentos: alimentos más sanos para una salud mejor. Ginebra: Departamento de Inocuidad de los Alimentos; 2019. 4 de junio de 2019. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
23. Campos V, Mondaca M. Agua potable para comunidades rurales, reuso y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas. Argentina: CYTED; 2016, p. 159-162. Cap. 13. Riesgo de enfermedades transmitidas por el agua en zonas rurales; Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd57/riesgo.pdf>
24. Bibek R, Bhunia A. Fundamentos de Microbiología de los alimentos. 4a ed. México: Graw Hill; 2010. p. 202-222.
25. Ríos-Tobón S, Agudelo-Cadavid RM, Gutiérrez-Builes LA. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. Rev Fac Nac Salud Pública [Internet]. 2017;35(2):236–47. Disponible en: <http://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php/fnsp/article/view/26353>
26. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. En: Microbiología médica. 8va edición. Barcelona; 2017. p. 162–169

27. Jawetz, Melnick, Adelberg. Microbiología Médica. 25 edición, Mc Graw Hill. 2011. p 219, 339-341
28. Rodríguez Díaz JC, Guna Serrano R, Larrosa Escartín N, Marín Arriaza M. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. 2017. 62. Rodríguez Díaz JC (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.
29. Oromí J. Resistencia bacteriana a los antibióticos. Rev. Elsevier [Internet] 2000 [consulta el 22 de junio de 2019]; 30(10): 367-405. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-resistencia-bacteriana-los-antibioticos-10022180>
30. Calderon G, Aguilar L, Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. Revista médica de Costa Rica y Centroamérica LXXIII [Internet]. 2016; [citado 22 de junio de 2019]; 621(1): 758-759. Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/621/art03.pdf>
31. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Documento M100. CLSI 2019. 29th Edition.
32. Koneman. Diagnóstico microbiológico ©2012. Editorial Médica Panamericana
33. Sendiña Nadal, Irene (2006). *Fundamentos de meteorología*. Universidad Santiago de Compostela. ISBN [9788497506458](https://www.isbn-international.org/product/9788497506458)
34. De La Rosa, MC, Mosso, MA, Ullán, C. El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. Observatorio Medioambiental ISSN: 1139-1987 Vol. 5 (2002): 375-402 <http://www.divulgameteo.es/uploads/aire-microorganismos.pdf>
35. Miquel, P., Cambert, R. *Traité de bacteriologie pure et appliquee*. Ed. Masson et Cia, Paris. (1901)
36. Bergey DH. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - Vol 4: Bacteroidetes [Internet]. 4ta edición. Springer-Verlag New York Inc. Estados Unidos: Athens; 2010. 949 p. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-68572-4>
37. Bayona MR. Evaluación microbiológica de alimentos adquiridos en la vía pública en un sector del norte de Bogotá. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 12 (2): 9-17, 2009

38. Chicaiza, J. Determinación de los parámetros físico-químicos y microbiológicos de la Fresa (*Fragaria vesca*) variedad Oso Grande como base para el establecimiento de la norma de requisitos. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Regional Autónoma de los Andes (UNIANDES) 2015
39. Saltos Jaramillo, YM. “Análisis de la conservación de papa fresca (*Solanum phureja*) como producto de iv gama usando extracto acuoso de propóleo”. [Tesis tercer nivel] Riobamba: Facultad de Ciencias, ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO. 2015
40. González, AM. Influencia del mantenimiento de la cadena de frío controlada en la vida útil, calidad microbiológica, físico química y organoléptica en fresas tipo exportación. [Tesis tercer nivel]. Bogotá. Facultad de Ciencias, PONTIFICA UNIVERSIDAD JAVERIANA. Colombia. 2006
41. Mayer-Hamblett N, Aitken M, Rubinfeld G, Ramsey B. Association between *Stenotrophomonas maltophilia* and lung function in cystic fibrosis. *Thorax* 2004;59:955-9.
42. Perez G. Chávez M. Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en tomate, zanahoria, espinaca, lechuga y rabanito, expandidos en mercados de Trujillo, Perú. *Rev. Ciencia y Tecnología* [Internet] 2012 [consulta el 23 de agosto de 2019] 8(22): 1 - 11. Disponible en: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/article/view/183/189>
43. Salgado D. Grijalva N. Diagnóstico de indicadores entéricos en cilantro (*Coriandrum sativum*) y perejil (*Petroselinum sativum*) que se expenden en mercados populares del norte de la ciudad de Quito. *Rev. Scielo* [Internet] 2012 [consulta el 23 de agosto de 2019] 8(22): 1 - 11. Disponible en: http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1390-65422015000100045&lng=es&nrm=iso
44. Akinde S, Sunday A, Adeyemi F, Fakayode I, Oluwajde 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 24 de agosto de 2019]; 21(2):94 Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1535676016652231>

45. Petrušić, M, Obreht, D, Sava Lazić, V, Radnović, Knežević, D. Prevalence and genetic variability of *Plesiomonas shigelloides* in temperate climate surface waters of the Pannonian Plain. Arch Biol Sci. 2018;70(1):99-108
46. Soares Pereira, C, Albuquerque Possas, C, Mauro Viana, C, Placeres Rodrigues, D. *Aeromonas* spp. Y *Plesiomonas shigelloides* aislados de mejillones frescos y precocinados (*Perna Perna*) en Río de Janeiro, RJ. Science Technol. Feed Vol.24 No.4 Campinas Oct./Dec.2004
47. W John Looney. *Stenotrophomonas*: An emerging opportunist human pathogen. Lancet Infect 2009; 9: 312-323
48. Hae-Sung Chung, Seong Hong, Young ReeKim. Antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from Korea and the activity of antimicrobial combinations against isolates. J Korean Med Society 2013 Vol 24 No.1:62-68
49. Muñoz D. Castañeda Y. Grau C. Marval H. Prevalencia y susceptibilidad a antibióticos de cepas móviles de *Aeromonas* aisladas del ostión de mangle (*Crassostrea rhizophorae*) Rev. Científica. 2012; 22(6)
50. Moreira, R, Mucinhato, D, Tormen, SH, Terra, MR, Furlaneto, MC, Furlaneto D. *Enterococcus* spp. Isolados de Alimentos Vegetais: Análise da Resistência a Antimicrobianos. V SIMPOSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGÍA. 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina-PR. Universidade Estadual de Londrina. Paraná, Brasil

ANEXOS.

**ANEXO 1. Ubicación
geográfica para muestreo del
río Chanchán, subcuenca
hidrográfica Yaguachi**

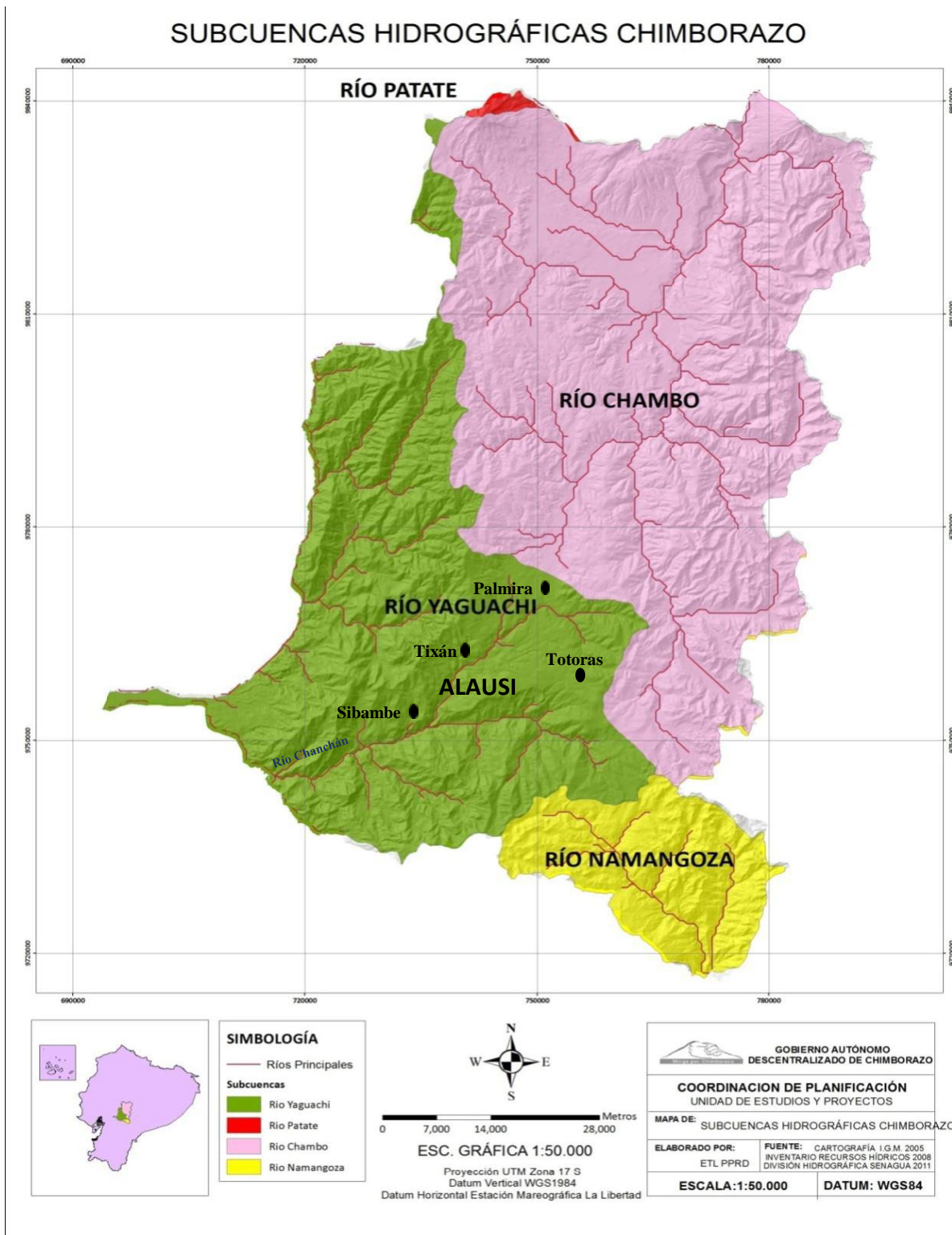


Ilustración 5. Ubicación geográfica para muestreo del río Chanchán, subcuena hidrográfica Yaguachi

Fuente: Gobierno Provincial de Chimborazo, Unidad Técnica de Riego. Plan Provincial de Riego y Drenaje. 2013.

ANEXO 2. Fichas de observación de toma de muestras.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: Impacto sobre la salud humana ocasionado por la contaminación bacteriana de las aguas de riego utilizadas en la agricultura en la provincia de Chimborazo, Ecuador”

Nº de muestra: _____

Nombre del estudiante: _____

Fecha: _____

Muestra: Agua ____ Producto Agrícola ____ Río: _____

Muestra tomada en (lugar): _____

Temperatura: Medio Ambiente _____ Agua _____ (sólo para agua)

PH: _____ (sólo para agua)

Observación:

Presencia de animales en los cultivos: _____

Viviendas colindantes: _____

Otra fuente que se considere contaminación: _____ Cuál: _____

Realizado por:

Anyeli López Cuaran.

Estudiante

Dra. María del Carmen Cordovéz

Tutora

ANEXO 3. Descripción de los puntos de muestreo.

Descripción de los puntos de muestreo de los productos agrícolas recolectados de las inmediaciones del río Chanchán

Puntos	Lugar de muestreo	Ubicación	Altitud	Temperatura ambiental
<i>Punto 1</i>	Puente Rumichaca	Alausí, vía Sibambe	2300 m	20 ^a C
<i>Punto 2</i>	Puente Illibuchi	Alausí, vía principal	2340 m	19 ^a C
<i>Punto 3</i>	Estación del tren	Alausí, Tixán	2860 m	20 ^a C
<i>Punto 4</i>	Vía Cocan	Alausí, Totoras	3760 m	14 ^a C
<i>Punto 5</i>	El Cortijo	Alausí, Totoras	3720 m	10 ^a C
<i>Punto 6</i>	Entrada a Palmira	Alausí, Palmira	3080 m	18 ^a C

Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH

ANEXO 4. Mecanismos de transferencia genética en bacterias.



29th Edition

M100

Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing

This document includes updated tables for the Clinical and Laboratory Standards Institute antimicrobial susceptibility testing standards M02, M07, and M11.

A CLSI supplement for global application.

M100
Normas de funcionamiento para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos, 29ª edición.
2019

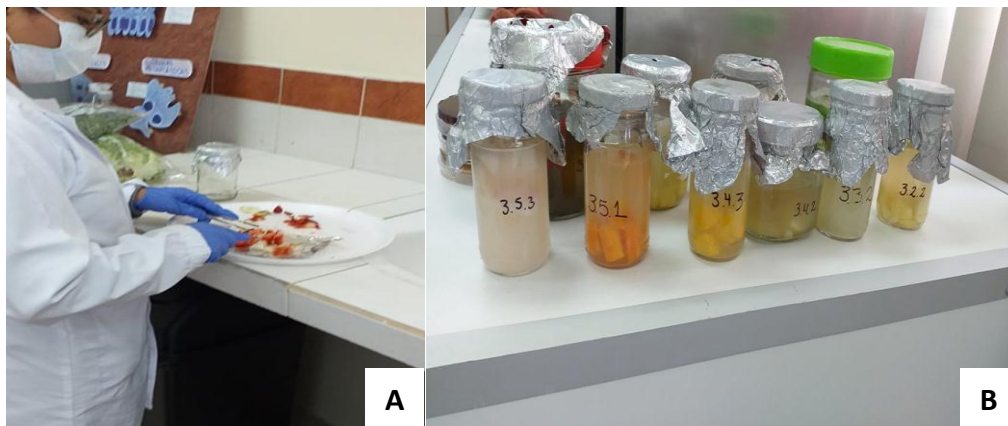
ANEXO 5. EVIDENCIAS FOTOGRAFÍCAS

Imagen 1. Recolección de muestras. **A.** Toma de muestras en Palmira. **B.** toma de muestras en Totoras, el Cortíjo



Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH

Imagen 2. Pre-enriquecimiento de muestras: **A.** Obtención de muestras representativas del producto. **B.** Pre-enriquecimiento en Agua Peptonada.



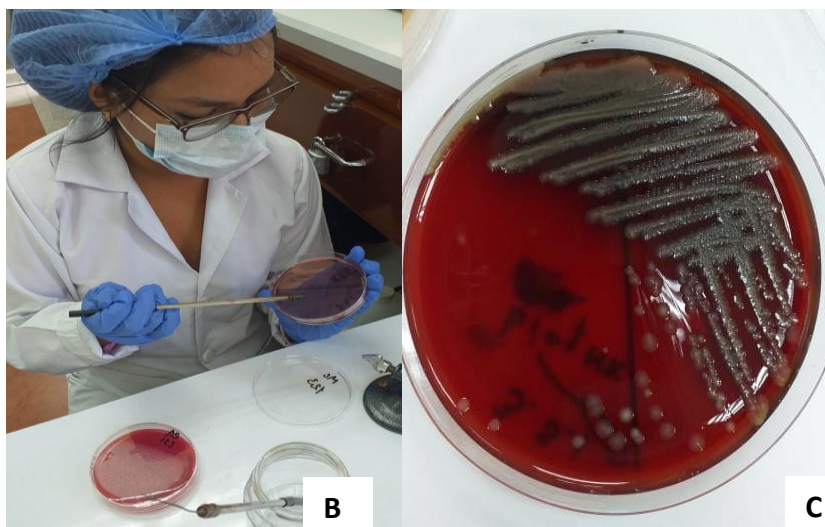
Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH

Imagen 3. Inoculación del cultivo: **A.** Toma de muestra desde el cultivo. **B.** inoculación en Agua Peptonada.



Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH

Imagen 4. Cultivos en MC y AS: **A.** Preparación de medios de cultivos y pruebas bioquímicas
B. Estriado en agar Mc. **C.** Crecimiento bacteriano en AS



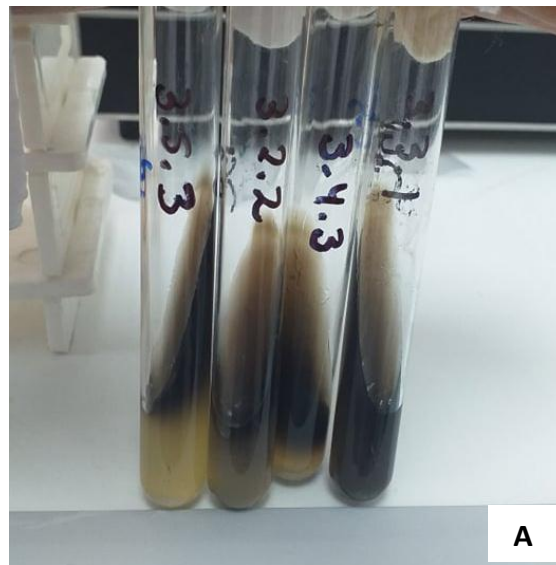
Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH

Imagen 5. Tinción Gram: **A.** Enfoque de bacilos gram negativos.



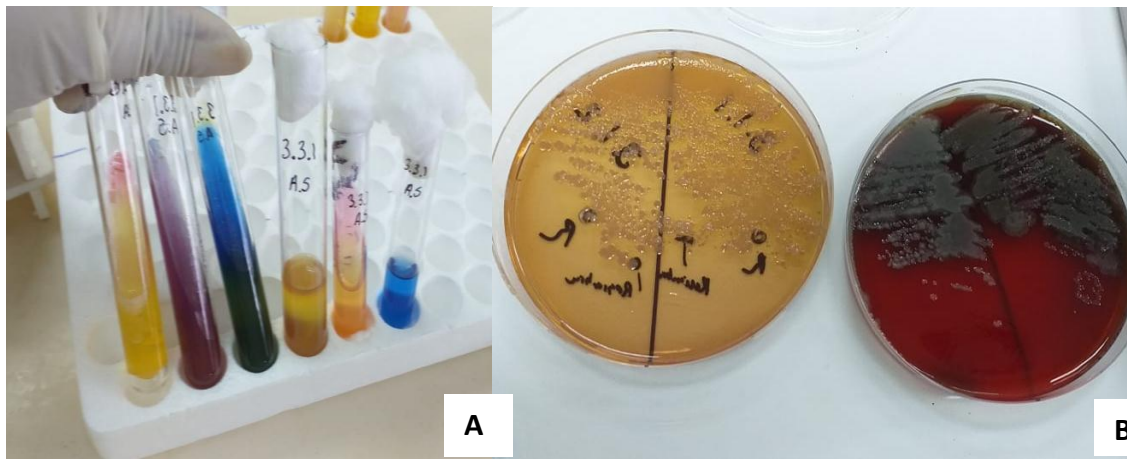
Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH

Imagen 6. Pruebas bioquímicas para Bacterias Gram Positivas: **A.** Bilis-esculina positiva



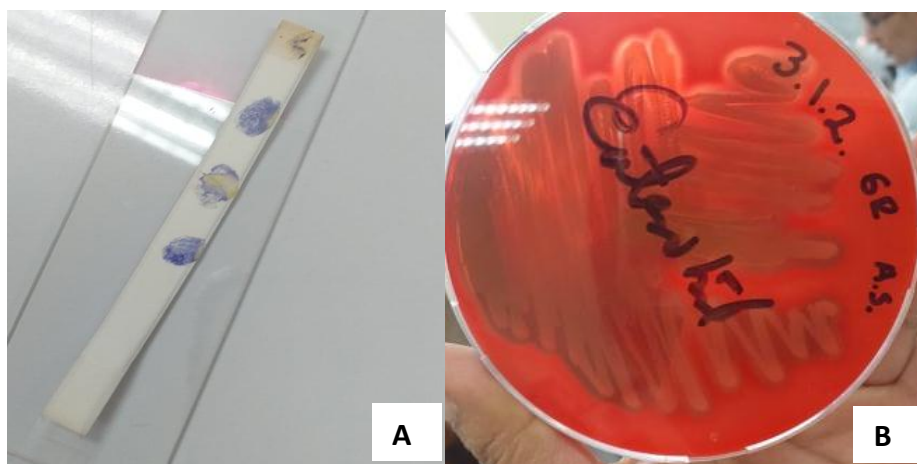
Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH

Imagen 7. Pruebas bioquímicas para Bacterias Gram Negativas: **A.** Batería de identificación bacteriana, de izquierda a derecha: Malonato (positivo), urea (negativa), MIO (motilidad positiva, indol negativo, ornitina positiva), citrato (positivo), Lisina hierro agar (Desaminación, descarboxilación negativa) agar Triple azúcar hierro (lactosa, glucosa, producción de gas positivo) **B.** Crecimiento de Bacterias gramnegativas en MC y AS



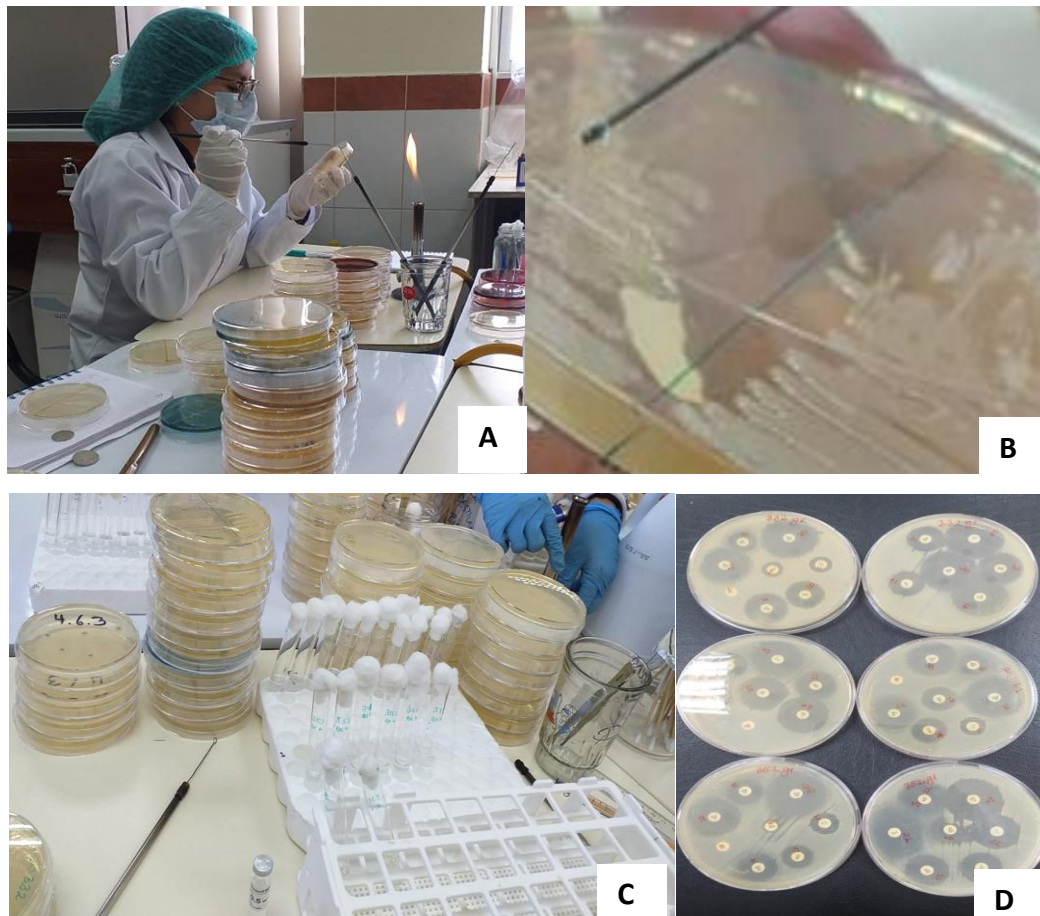
Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH

Imagen 8. Pruebas bioquímicas para Bacterias Gram Negativas No Fermentadoras: **A.** Detección de enzima oxidasa. **B.** Presencia de hemólisis en agar sangre.



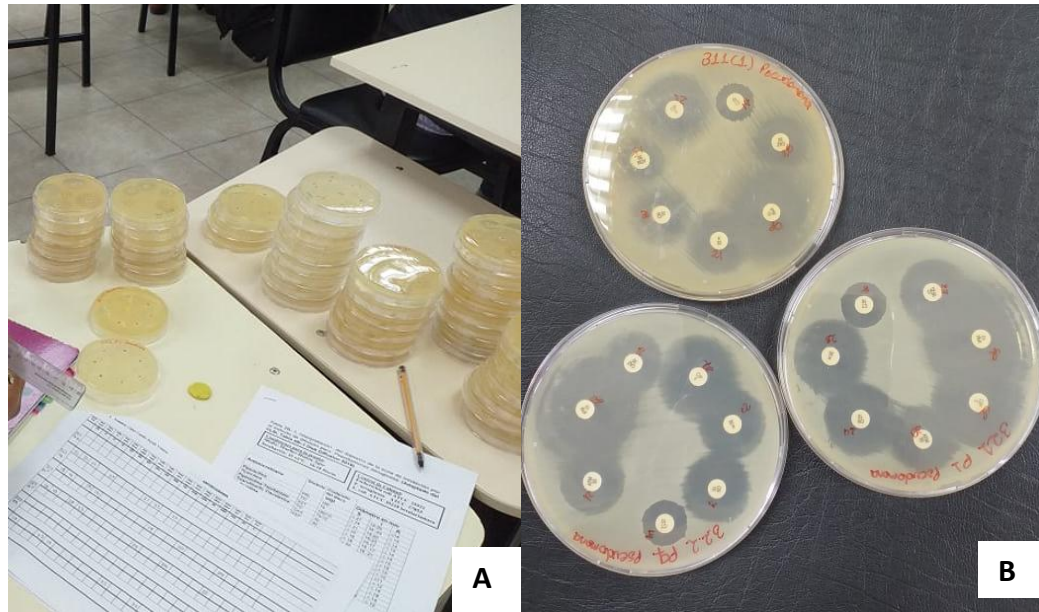
Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH

Imagen 9. Antibiograma según método de Kirby Bauer: **A.** Resiembra en Mueller Hinton para obtención de cepas frescas. **B.** Cepa bacteriana en agar Muller Hinton. **C.** Suspensión de cepas en solución salina fisiológica. **D.** Desarrollo del método Kirby bauer



Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH

Imagen 10. Interpretación de resultados del antibiograma: **A.** Medición del halo de inhibición en placas. **B.** Antibiograma por método de Kirby Bauer



Fuente: López A. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. UNACH