



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

Título: Aislamiento de bacterias patógenas al humano en cultivos agrícolas de la cuenca del río Chambo.

Autora: María Guadalupe Guamán Chabla

Tutora Académica: PhD. Ana Carolina González Romero

Tutora metodológica: MsC. Gisnella María Cedeño Cajas

Riobamba - Ecuador

2019

REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: Aislamiento de bacterias patógenas al humano en cultivos agrícolas de la cuenca del río Chambo. Presentado por Maria Guadalupe Guaman Chabla, dirigido por Dra. Ana Carolina González y MsC. Gisnella Cedeño Cajas, una vez escuchada la defensa oral y realizado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en el cual se ha constado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH. Para constancia de lo expuesto firman:

Mgs. Ximena Robalino
Presidente del Tribunal



Firma

Mgs. Yisela Ramos Campi
Miembro del Tribunal



Firma

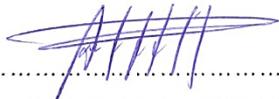
Mgs. Celio García
Miembro del Tribunal



Firma

DECLARACION EXPRESA DE AUTORÍA

Yo, Dra Ana Carolina González Romero y MsC. Gisnella María Cedeño Cajas docentes de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de tutoras del proyecto de investigación con el tema “Aislamiento de bacterias patógenas al humano en cultivos agrícolas de la cuenca del río Chambo”, propuesto por la Srta. Maria Guadalupe Guaman Chabla 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 honor a la verdad facultando a la interesada en hacer uso del presente para los trámites correspondientes.



.....
Dra Ana Carolina González Romero
Docente de la carrera de Laboratorio
Clínico e Histopatológico



.....
MsC. Gisnella María Cedeño Cajas
Docente de la carrera de Laboratorio
Clínico e Histopatológico

AUTORIA DE LA INVESTIGACION

“La responsabilidad del contenido de este proyecto de graduación, nos corresponde exclusivamente a: María Guadalupe Guamán Chabla y Ana Carolina González Romero y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo”



María Guadalupe Guamán Chabla

2350107955

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar gratitud a Dios, por guiarme en este camino de formación y aprendizaje dentro de la prestigiosa Universidad Nacional de Chimborazo.

A mis padres Olga Calle y Milton Tonato quienes han sido pilares fundamentales a lo largo de mi vida.

A mis tutora PhD. Ana Carolina González Romero y Gisnella María Cedeño Cajas, por orientar el desarrollo de este proyecto de grado y el conocimiento impartido a lo largo de mi vida estudiantil.

María Guadalupe Guamán

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme cumplir una meta más y guiar mis pasos en cada etapa de mi vida. A mis padres Olga Calle y Milton Tonato por la fortaleza, apoyo incondicional y amor a lo largo de mi carrera universitaria.

A mi compañero de vida Edwin Dario Chicaiza Guanoluiza, por ser mi fuente de motivación e inspiración para cada día ser mejor, perseverante y cumplir mis ideales.

María Guadalupe Guamán

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	IX
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
CAPÍTULO I ESTADO DEL ARTE	14
Cuenca del río Chambo	14
Bacterias de interés clínico	14
Enterobacterias	15
Cocos grampositivos pertenecientes a la familia Enterococcaceae	18
Resistencia antimicrobiana	18
Tipo de mecanismos de acción de los antimicrobianos	20
Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos	22
Tipos de mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos	23
CAPÍTULO II METODOLOGÍA	25
Tipo de investigación	25
Determinación de población y muestra.	25
Procedimiento	26
Identificación de área de estudio	26
Toma de muestra	26
Aislamiento de bacterias patógenas presentes en la muestra	27
Medición de la resistencia antibiótica en las bacterias aisladas en los cultivos agrícolas ...	28
Procesamiento estadístico	29
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	38
RECOMENDACIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	10
ANEXOS	47

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen N° 1: Resistencia a amoxicilina y cefoxitin en <i>Enterobacter cloacae</i>	35
Imagen N° 2: Resistencia de ceftazidime e imipenem en <i>Citrobacter freundii</i>	36
Imagen N° 3: Resistencia de ceftazidime e imipenem en <i>Proteus vulgaris</i>	36
Imagen N° 4: Resistencia de ceftazidime e imipenem en <i>Enterobacter cloacae</i>	36
Imagen N° 5: Resistencia a vancomicina y penicilina de <i>Enterococcus faecalis</i>	37
Imagen N° 6: Recolección de remolacha, punto de muestreo Chambo.	69
Imagen N° 7: Recolección de lechuga, punto de muestreo San Antonio de Cebadas.	69
Imagen N° 8: Recolección de zanahoria, punto de muestreo Licto.	70
Imagen N° 9: Recolección de frutilla, punto de muestreo Cebadas.	70
Imagen N° 10: Recolección de papa, punto de muestreo Penipe.	71
Imagen N° 11: Recolección de ocas, punto de muestreo Cubijies.	71
Imagen N° 12: Pre-enriquecimiento de los productos agrícolas.	72
Imagen N° 13: Técnica de aislamiento de colonias.	73
Imagen N° 14: Identificación de bacterias mediante batería bioquímica.	74
Imagen N° 16: Identificación de <i>Enterococcus</i>	74
Imagen N° 17: Antibiograma de cepas aisladas de la familia Enterobacteriaceae y Enterococcaceae	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Enterobacterias importantes desde el punto de vista clínico.....	15
Tabla N° 2. Descripción de ubicación y altitud en cada estación de muestreo.	27
Tabla N° 3. Datos de temperatura ambiente obtenidos en cada estación de muestreo.....	30
Tabla N° 4. Distribución porcentual de las bacterias según la coloración de Gram.	31
Tabla N° 5. Bacterias patógenas de los productos agrícolas del río Chambo	32
Tabla N° 6. Distribución de las bacterias patógenas según la estación geográfica de muestreo	33
Tabla N° 7. Patrón de susceptibilidad y resistencia a los antimicrobianos de las bacterias patógenas de la familia Enterobacteriaceae.....	34
Tabla N° 8. Patrón de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana del <i>Enterococcus faecalis</i>	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Sitios básicos de la actividad de los antibióticos.....	20
Figura N° 2. Tipos de mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos.	23
Figura N° 3. Localización de las estaciones de muestreo a lo largo de la cuenca del río Chambo.....	49

RESUMEN

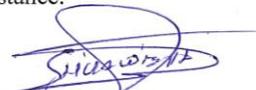
Actualmente la resistencia antimicrobiana se ha convertido en uno de las mayores dificultades en cuanto a tratamiento antibiótico se refiere, debido a la evolución de los microorganismos más propensos en proliferar en diversos ambientes. El presente estudio tiene como propósito, determinar la resistencia antimicrobiana de bacterias patógenas aisladas en los cultivos agrícolas de la cuenca del río Chambo, el cual evidencia la existencia de patógenos multirresistentes, siendo causantes principales de infecciones en el tracto gastrointestinal en la población agrícola. La investigación es descriptiva, presenta un diseño de campo y cohorte transversal. Se ejecutó la recolección de cultivos agrícolas distribuidos en seis puntos geográficos, para el análisis microbiológico fue necesario medir la temperatura ambiente y la altitud. Para el aislamiento e identificación bacteriana se empleó agar Sangre, McConkey y CLED, conjuntamente se empleó pruebas bioquímicas y fisiológicas para clasificar las bacterias por género y especie. Se midió la susceptibilidad y resistencia antimicrobiana mediante la técnica de aislamiento de colonias y empleando el método de Kirby-Bauer. Los resultados adquiridos manifiestan la presencia de 6 bacterias de interés clínico: 5 gramnegativas, enterobacterias (83,3%) entre ellas: *Citrobacter freundii*, *Citrobacter amalonaticus*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella oxytoca* y solamente 1 grampositiva (16,7%): *Enterococcus faecalis* respectivamente. La mayoría de las bacterias mostraron resistencia a carbapenemos y cefalosporinas de 3^{ra} generación, evidenciándose el mecanismo betalactamasa AmpC inducible, en menor cantidad la resistencia frente a cefalosporinas de 2^{da} generación, penicilinas y glucopéptidos. Finalmente se deduce que el río Chambo se encuentra contaminado por bacterias multirresistentes a diversos antibióticos.

Palabras clave: Río Chambo, productos agrícolas, bacterias patógenas, resistencia antimicrobiana.

ABSTRACT

Currently, antimicrobial resistance has become one of the most significant difficulties in terms of antibiotic treatment, due to the evolution of the microorganisms most likely to proliferate in various environments. The purpose of this study is to determine the antimicrobial resistance of isolated pathogenic bacteria in crops in the Chambo river basin, which shows the existence of multiresistant pathogens, being the leading cause of infections in the gastrointestinal tract in the agricultural population. The research is descriptive, presents a cross-sectional field and cohort design. The collection of crops distributed in six geographical points was executed; for the microbiological analysis, it was necessary to measure the ambient temperature and altitude. For bacterial isolation and identification, Blood agar, McConkey, and CLED were used, together with biochemical and physiological tests to classify bacteria by gender and species. The colony isolation technique measured susceptibility and antimicrobial resistance and using the Kirby-Bauer method. The acquired results show the presence of 6 bacteria of clinical interest: 5 gram-negative, enterobacteria (83.3%) among them: *Citrobacter freundii*, *Citrobacter amalonaticus*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus Vulgaris*, *Klebsiella oxytoca* and only one gram-positive (16.7%): *Enterococcus faecalis* respectively. The majority of the bacteria showed resistance to 3rd generation carbapenems and cephalosporins, showing the inducible AmpC beta-lactamase mechanism, to a lesser extent, resistance against 2nd generation cephalosporins, penicillin, and glycopeptides. Finally, it follows that the Chambo River is contaminated by bacteria that are resistant to various antibiotics.

Keywords: Chambo River, agricultural products, pathogenic bacteria, antimicrobial resistance.


Reviewed by: López, Ligia
LINGUISTIC COMPETENCES TEACHER



INTRODUCCIÓN

Es un hecho que la garantía de la seguridad e inocuidad de los alimentos han sido una de las mayores preocupaciones de la humanidad y los antecedentes al respecto pueden rastrearse desde tiempos inmemoriales. La disponibilidad de alimentos de buena calidad es una necesidad indispensable, cuya demanda aumenta a medida que la población adquiere conciencia sobre la preservación de la salud al evitar consumir alimentos contaminados por bacterias patógenas¹.

De este modo los alimentos insalubres que contengan bacterias, virus, hongos parásitos y sustancias nocivas se consideran como la mayor causa de morbilidad, tanto en países industrializados como en vías de desarrollo, generalmente afectando a lactantes, niños y adultos mayores².

En el año 2015, el secretario general de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) Ban Ki Moon, declaró que las enfermedades por consumir alimentos contaminados son una amenaza fundamental para la salud global³. La Organización Mundial de la Salud (OMS), se encuentra colaborando con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en un enfoque a favor de promover la salubridad con el propósito de evitar la difusión de bacterias que afecten al ser humano y fomentar la buenas prácticas de higiene⁴.

A nivel mundial, la OMS dio a conocer las tasas de morbilidad mundial causada por 31 agentes patógenos, es por ello que promueve activamente la prevención de enfermedades transmitidas a través de los alimentos. Se han descrito alrededor de 200 enfermedades de transmisión alimentaria, cuya etiología incluye bacterias, virus, hongos, parásitos, productos químicos y toxinas de origen vegetal. Se estima que anualmente se enferman unos 600 millones de personas (1 de cada 10 habitantes) por ingerir alimentos contaminados. Los niños menores de 5 años cerca de un 40% contraen dicha enfermedad, que provocan cada año 125 000 defunciones²⁻⁵.

El componente principal que más favorece el desarrollo de las bacterias es la temperatura, aunque existen ciertos microorganismos capaces de reproducirse en diversos intervalos de temperaturas⁶. De este modo las bacterias patógenas multirresistentes a climas cálidos y fríos son las causantes de producir las ETA en el Caribe y en toda Latinoamérica⁷.

Ecuador es un país potencialmente agrícola con productos de primera necesidad que además son de exportación a nivel mundial⁸. Es por ello que se implementó un plan para mitigar la aparición de bacterias multirresistentes, proyecto presentado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) con el propósito de ofrecer colaboración a los gobiernos enfocándose al ámbito de salud para formular e implementar planes nacionales multisectoriales para controlar la Resistencia Antimicrobiana (RAM) en la alimentación y la agricultura. Además contará con la cooperación de diferentes países como Bolivia, Cuba, Ecuador, El Salvador, Honduras y República Dominicana⁹. En Quito capital de Ecuador existe un aumento en la tasa de contagio de ETA con un 48%, demostrando la existencia de microorganismos patógenos en los productos alimenticios¹⁰.

En tierras ecuatorianas se identificó diferentes microorganismos que son considerados como agentes patógenos¹¹. En la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, se aisló cepas bacterianas en las que resalta *Escherichia coli* presentando resistencia a gran variedad de fármacos¹². En Quito se estudió la resistencia antimicrobiana de *Salmonella entérica*, donde presentó resistencia a un sinnúmero de antibióticos¹³. En Guayaquil, se aisló cepas de *Escherichia coli* presentes en el fertilizante orgánico destinado al uso de mejorar la calidad de los productos¹⁴.

En el cantón Chambo aproximadamente el 58.2% de la población económicamente activa (PEA) se dedica a la actividad agrícola¹⁵. En publicaciones anteriores se señala que el río Chambo está polucionado con diferentes bacterias multirresistentes, ya que, en él se descargan aguas residuales de industrias, hospitales y viviendas¹⁶.

Cabe destacar que en la investigación realizada por Orozco J y Molina J¹⁷, en las aguas de regadío de la cuenca del río Chambo se aislaron e identificaron “enterobacterias (81,8%) entre estas *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, y *Pseudomonas* (18,2%) *Pseudomonas sp*”. Gran parte de las bacterias encontradas presentaron resistencia a las quinolonas y en menor proporción a las cefalosporinas. Además de otras investigaciones recientes realizadas en la provincia de Chimborazo en las aguas del regadío del río Chibunga, se aisló bacterias patógenas que obtuvieron resistencia antimicrobiana que son promotoras de infecciones gastrointestinales y extraintestinales¹⁸.

A pesar de lo manifestado anteriormente en el río Chambo, no existe investigaciones precedentes que evidencien la presencia de multirresistencia antimicrobiana en bacterias

patógenas que se encuentren en productos agrícolas ubicados en la cercanía del río Chambo, motivo suficiente para realizar esta investigación con el propósito de evitar infecciones en la población agrícola, por lo que sirve para una amplia gama de problemas prácticos en cuanto al cuidado con la administración de alimentos con bacterias patógenas y su multiresistencia antibiótica. La contribución científica que se brindó fue importante para la asociación universitaria y futuros laboratoristas.

La presente investigación permite la identificación de agentes patógenos, que posteriormente se informará a las autoridades competentes pero a la vez se le dará a conocer a la comunidad implicada para que se concienticen y se elaboren medidas preventivas para evitar la adquisición de bacterias multiresistentes. Esta actividad beneficia a la población agrícola a encontrar diferentes formas de mejorar la calidad de sus productos, sin la necesidad de exponer su salud.

El presente estudio se compone por 3 capítulos que se menciona a continuación: Estado del arte, metodología de la investigación y finalmente se tiene los resultados y la discusión.

El capítulo uno da a conocer el estado del arte de la investigación donde se expone la información del río Chambo, productos agrícolas que se cultivan en los alrededores, los microorganismos patógenos que posiblemente se encuentran en los vegetales y la resistencia antibacteriana de los mismos.

En el capítulo 2 se presenta las técnicas y métodos utilizados en la investigación para cumplir con los objetivos establecidos.

Par finalizar se tiene el capítulo 3 donde se expresa los resultados que se obtuvieron en la investigación como las bacterias identificadas en cada producto y sus mecanismos de resistencia. Además, se discutió con otros autores dichos resultados.

OBJETIVOS

Objetivo general

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

Objetivos específicos

1. Recolectar muestras de productos agrícolas cultivados con agua de regadío del río Chambo en diferentes puntos geográficos, para su análisis bacteriológico.
2. Identificar las bacterias patógenas obtenidas en los diferentes productos agrícolas provenientes del río Chambo mediante técnicas microbiológicas.
3. Determinar mediante el método de dilución Kirby-Bauer la resistencia antimicrobiana de las bacterias patógenas identificadas.

CAPÍTULO I

ESTADO DEL ARTE

Cuenca del río Chambo

La cuenca del río Chambo, goza de una extensión aproximada de 3,580 km² y cubre un 54,2 % de la superficie total de la provincia de Chimborazo. Lloret P¹⁹, manifiesta que: “Las aguas del río Chambo atraviesan siete cantones de la provincia siendo estos: Alausí, Guamote, Colta, Chambo, Riobamba, Penipe y Guano”. En la provincia de Chimborazo la cuenca del río Chambo ocupa un 98% que se componen de: zonas naturales, páramos y grandes expansiones de áreas cultivadas, representando el 50% de la superficie total de la subcuenca¹⁹.

La agricultura es la principal actividad económica del cantón Chambo, denominándola “Señora del Agro”, el aprovechamiento por su clima diverso y agradable ofrece condiciones favorables para los cultivos, permitiendo que en Chambo se siembren y produzcan cebolla blanca, col, coliflores, brócoli, remolacha, zanahoria, lechuga y cilantro. Además, bajo invernadero producen tomate de riñón, babaco, pimiento, pepinillo, frutillas y arveja. Los ciclos de cultivo varían según el tipo del producto²⁰.

Bacterias de interés clínico

Jawetz et al²¹, menciona que en su totalidad son bacterias entéricas, provenientes del tracto gastrointestinal de diversos seres vivos entre los que ellos destacan animales y humanos. Las mismas que son denominadas bacterias fecales debido a la contaminación con desechos biológicos.

Ríos S et al²², manifiesta que en su totalidad las bacterias de interés clínico son enterobacterias, las cuales se encuentran en su mayoría en fuentes de agua como son ríos lagos, lagunas, vegetación y diversos tipos de suelos, por lo que están asociados necesariamente con contaminación fecal.

Salinas L, et al²³, establece que son aquellos que causan infecciones al hombre, en gran parte los patógenos fecales pertenecen a las bacterias gramnegativas.

Enterobacterias

De acuerdo a Sherris et al.²⁴ y Jawetz et al²¹, la familia Enterobacteriaceae constituye una población grande y diversa de bacilos gramnegativos, se han descrito más de cincuenta géneros, cientos de especies y subespecies. Son bacterias ubicuas que generalmente se localizan en el suelo, agua y vegetación. Además, forma parte de la microbiota de muchos animales incluido el ser humano²⁴. Estas bacterias pueden causar infecciones a nivel gastrointestinal y urinario. También septicemias u otras manifestaciones que afectan el sistema nervioso central²⁶.

Las especies con importancia clínica se muestran a continuación²⁶⁻²⁸.

Tabla N° 1. Enterobacterias importantes desde el punto de vista clínico

Género	Especies
<i>Escherichia</i>	<i>Coli</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae, oxytoca</i>
<i>Salmonella</i>	<i>choleraesuis, entérica</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes, cloacae, sakazakii</i>
<i>Serratia</i>	<i>Marcencens</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii, amalonaticus, diversus</i>
<i>Yersinia</i>	<i>pestis, enterocolitica, pseudotuberculosis</i>
<i>Proteus</i>	<i>mirabilis, vulgaris</i>
<i>Shigella</i>	<i>flexneri, sonnei</i>

Fuente: Modificado Murray et al., Microbiología médica 8va edición, pág. 253. Y García PA, et al. Enfermedades infecciosas (III), pág 3426-31.

Escherichia: *E. coli* pertenece a la microflora intestinal normal, es el causante principal de gastroenteritis e infecciones extraintestinales²⁴, además de infecciones del tracto urinario, neumonía entre 1 a 3% de los casos, en su gran mayoría meningitis neonatal, infecciones endovasculares ubicadas en válvulas cardíacas, entre otras²⁵.

Klebsiella: la característica microbiológica más peculiar del género *Klebsiella* es la completa ausencia de motilidad y existencia de una cápsula de polisacáridos. Lo cual le otorga a las colonias el aspecto mucoso brillante²⁶. *K. pneumoniae* está presente en el sistema respiratorio y en las heces de casi 5% de las personas sanas, puede producir una

consolidación pulmonar necrosante por hemorragia extensa. *K. Oxytoca* produce infecciones urinarias y bacteriemia con lesiones focales en pacientes débiles²⁴. Además, presenta resistencia intrínseca a la ampicilina, la ticarcilina, la nitrofurantoína, cefalosporinas de tercera y cuarta generación²⁵.

Salmonella: posee un singular género de interés clínico que es la “*Salmonella entérica*”, aunque este género ha sido subdividido en diversas ocasiones y se le aplica nombres de acuerdo a su sistema biológico. Pero también produce invasión al torrente sanguíneo y afecta de manera peculiar a los órganos distantes²⁸⁻²⁹. Koneman³⁰ menciona que la forma correcta para nombrar a esta especie es *Salmonella entérica serovariedad Typhi*, información que es confirmada por Murray y Tortora²⁶⁻²⁹.

Enterobacter: se destaca a tres principales especies de interés clínico entre ellos se tiene: *E. cloacae*, *E. aerogenes* y *E. zakazakii*²⁸. Estas bacterias fermentan la lactosa, son móviles y poseen cápsulas que dan la apariencia mucóide a sus colonias. Generalmente están vinculadas a patologías como neumonía, infecciones del tracto urinario, heridas y dispositivos, son frecuentes en individuos inmunocompetentes²⁴. Dichos microorganismos son causa de la mayoría de las infecciones gastrointestinales alrededor del 65 a 75%²⁵.

Serratia: *Serratia marcescens* se encuentra en ambiente hospitalario, cafeteras, soluciones fisiológicas y otros compuestos supuestamente estériles. Causa infecciones urinarias y respiratorias³⁰.

Citrobacter: el género *Citrobacter* es similar a *Salmonella*, las infecciones producidas por estos patógenos son frecuentes en individuos inmunocompetentes²⁹, presentes en la flora intestinal normal, *C. amalonaticus* puede causar infecciones urinarias y septicemia²⁴. Se ha observado que *C. freundii* y *C. koseri* están asociados con meningitis neonatal y absceso cerebral²⁶. Poseen ciertas similitudes epidemiológicas y clínicas con *Enterobacter*. Frecuentemente existen especies de *Citrobacter* en el agua, alimentos, suelo y microbiota intestinal de ciertos animales²⁵.

Yersinia: el género *Yersinia* posee genes característicos que le permiten la adherencia, actividad citotóxica, inhibición de la migración fagocítica e inhibe la agregación plaquetaria; lo que caracteriza a esta bacteria a producir sepsis asociada a transfusiones, como también gastroenteritis. *Yersinia pestis* causa la fiebre bubónica, conocida en Europa como “muerte

negra”. Se encuentra en las ratas y pulgas, estos son transmitidos a los animales y seres humanos²⁹. *Y. pseudotuberculosis* causa seudotuberculosis, enfermedad que se caracteriza por necrosis local e inflamación granulomatosa en ganglios linfáticos, bazo e hígado³⁰. *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* causan linfadenitis mesentérica aguda, un síndrome que consiste en fiebre y dolor abdominal que a menudo es similar a la apendicitis aguda²⁸⁻³⁰.

Proteus: son patógenos oportunistas dentro de la microbiota intestinal. *Proteus mirabilis* y *Proteus vulgaris* son los miembros aislados más a menudo de este grupo y son unas de las enterobacterias más susceptibles a las penicilinas y resistentes a la ampicilina y cefalosporinas²⁹. Este género de bacterias interviene en bacteriemias, neumonías, lesiones focales en pacientes débiles o en los que reciben infusiones intravenosas²⁴, infecciones urinarias y heridas³⁰. Son parte de la flora normal de una amplia variedad de mamíferos, aves, peces y reptiles²⁵.

Shigella: las especies de *Shigella* causan una enfermedad denominada “disentería bacilar” o shigelosis, éstas bacterias se encuentran solo en humanos y constituyen la segunda causa de diarrea del viajero. Algunas cepas pueden provocar disentería potencialmente mortal³⁰. El estado más característico del síndrome disentérico: es una triada clínica que consiste en dolor abdominal, tenesmo rectal y evacuaciones de pequeño volumen, con moco y sangre²⁸.

Aeromonas y *Vibrios*

Existe un grupo subalterno de anaerobios facultativos y fermentadores. Corresponden a bacilos gramnegativos, pero no menos importantes: *Vibrio* y *Aeromonas*. Las especies de *Vibrio* pueden crecer en una variedad de medios sencillos con un amplio intervalo de temperatura y es capaz de desarrollarse en ausencia de sal. Aunque son sensibles a los ácidos gástricos, se puede multiplicar libremente en el agua³⁰. La infección por *Vibrio cholerae* puede abarcar desde una colonización asintomática o una enfermedad diarreica leve hasta una mucho más grave que rápidamente puede ser mortal. *Vibrio parahaemolyticus* produce gastroenteritis que por lo general, constituye una entidad de resolución espontánea con un inicio explosivo de diarrea acuosa, náuseas, vómitos, espasmos abdominales, cefalea y febrícula³¹.

El género *Aeromonas*, perteneciente a familia Enterobacteriaceae, son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos y fermentadores³²⁻³³. Los patógenos más destacados son *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* y *Aeromonas sobria*. Estos microorganismos son ubicuos en el agua dulce y salobre. Las dos principales enfermedades asociadas a *Aeromonas* son la gastroenteritis e infección de heridas. La gastroenteritis suele aparecer con posterioridad a la ingestión de agua o de comida contaminada, mientras que la infección de heridas se observa después de la exposición a agua contaminada³²⁻³³.

Pseudomona: el género *Pseudomonas* constituye un complejo conjunto de patógenos oportunistas de plantas, animales y el ser humano³⁴. A menudo está presente en pequeñas cantidades en la microflora normal y en la piel del individuo³⁵. Son microorganismos ubicuos que se encuentran en la tierra, materia orgánica en descomposición, vegetación, agua y ambiente intrahospitalario³⁵⁻³⁶. La especie más importante *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista y posee una virulencia particular, causa principal de infección invasora en pacientes hospitalizados con enfermedades subyacentes graves como leucemia, fibrosis quística y quemaduras extensas³⁵.

Cocos grampositivos pertenecientes a la familia Enterococcaceae

Enterococcus spp: son cocos grampositivos que generalmente se presentan en parejas y en cadenas cortas³⁷. Cabe recalcar que existen dos especies de interés clínico en las que se destacan: *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, ya que constituyen frecuentes colonizadores del aparato digestivo del ser humano a pesar de que presentan resistencia intrínseca frente a la vancomicina³⁶. El género *Enterococcus* presenta características morfológicas y fenotípicas como reacción negativa a la catalasa y oxidasa³⁸.

Resistencia antimicrobiana

Conforme a Calderón³⁹, manifiesta que la resistencia a los antimicrobianos se expresa como la capacidad de las bacterias patógenas de tolerar los efectos de diversos antibióticos, los mismos que tienen como propósito la inhibición de la bacteria y la muerte celular. Las bacterias pueden presentar resistencia como resultado de mutaciones en su cromosoma e intercambio de material genético de otras bacterias o fagos.

Según la OMS⁴, declara que “la resistencia a los antimicrobianos es el fenómeno por el cual un microorganismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era

sensible.” Recomienda que en el sector agrícola, se aplique buenas prácticas en todos los eslabones de la producción de alimentos de origen animal y vegetal.

De acuerdo a Prestinaci et al⁴⁰, la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos están expuestos a los antibióticos. Bajo la presión selectiva de los fármacos, de modo que las bacterias naturalmente son resistentes o la adquieren en su medio.

De acuerdo a Acevedo et al⁴¹, explica que las dificultades que engloba la resistencia a antibióticos está íntimamente relacionada con la contaminación por metales pesados naturalmente por el suelo volcánico, en el medio ambiente podría facilitar la resistencia debido a la codificación de manea cromosomal de las bacterias, produciendo así un hábitat apto para la supervivencia de las mismas y favoreciendo la propagación mediante la transferencia de genes de las diferentes poblaciones bacterianas.

Según Alos⁴², define a la resistencia bacteriana como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en altas concentraciones de antibióticos que inhiben y matan a otras de su misma especie. Las enfermedades infecciosas causadas por bacterias multiresistentes se asocian a una tasa alta de morbilidad, mortalidad y el coste de tratamiento a comparación de las bacterias sensibles, esto debido a los mecanismos de variación genética (mutación, recombinación, transposición, intercambio de genes), promoviendo la transferencia de genes resistentes.

Resistencia intrínseca

Una característica específica de las bacterias gramnegativas y positivas es poseer la resistencia intrínseca. Además, de tener la peculiaridad de ser inherente a una especie en particular⁴³.

Ésta es determinada genéticamente y no se correlaciona con la administración del antibiótico. Cabe mencionar algunos ejemplos de microorganismos como *Klebsiella pneumoniae* naturalmente resistente las penicilinas, debido a su producción de beta lactamasas; *Proteus mirabilis* resistente inherente a las tetraciclinas contando con un proceso natural de expulsión del antibiótico debido a los lipopolisacáridos⁴⁴.

Resistencia adquirida

La resistencia adquirida proviene de la composición genética de la bacteria, al ser sensible a un antibiótico deja de ser eficaz, el cambio de esta condición se debe a la existencia de mutaciones o la adquisición de material genético externo a través de plásmidos, transposones e integrones⁴³⁻⁴⁴.

Tipo de mecanismos de acción de los antimicrobianos

A continuación se describirá cada uno de los mecanismos de acción de los antimicrobianos.

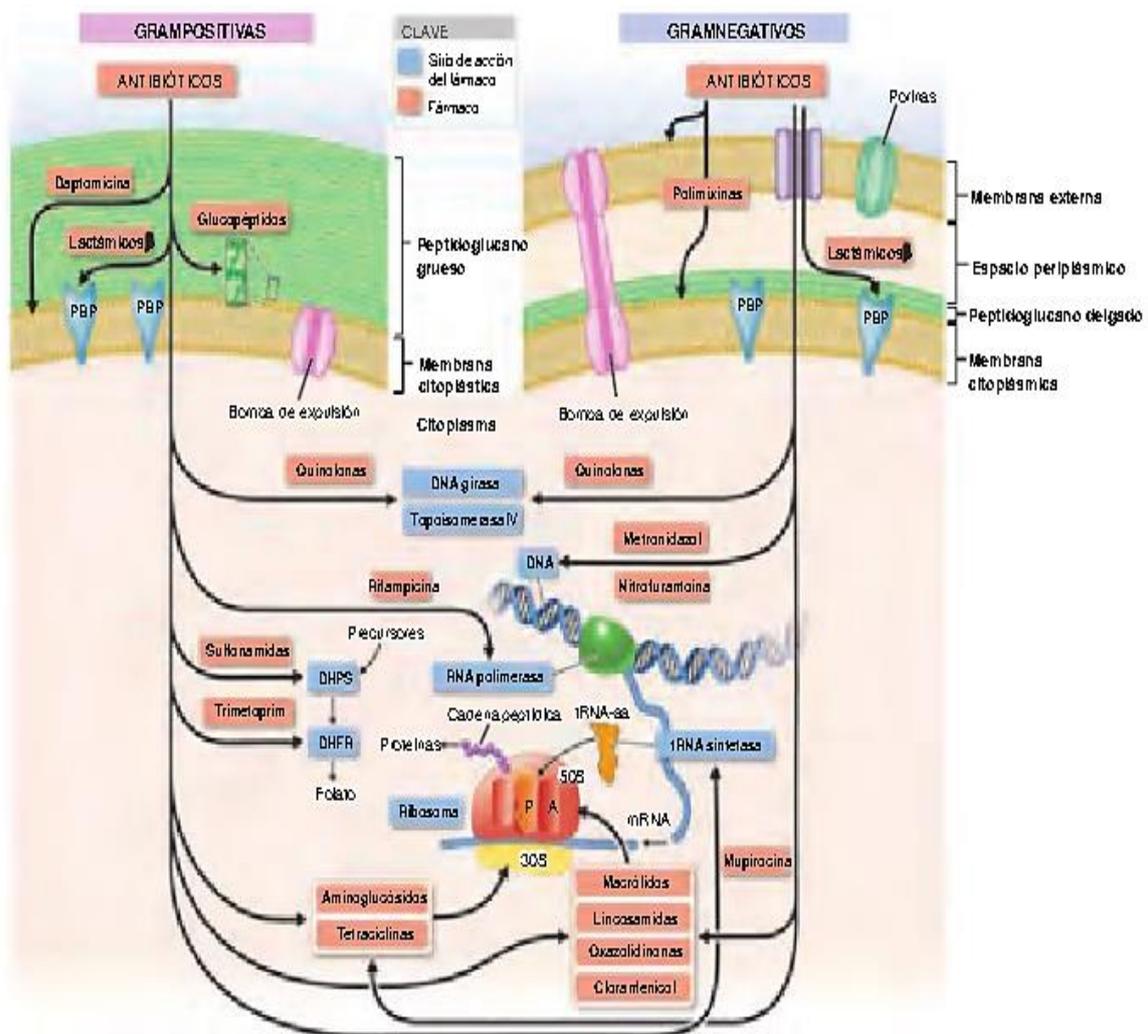


Figura N° 1. Sitios básicos de la actividad de los antibióticos.

Fuente: Kasper D, et al. Tratamiento de enfermedades bacterianas. En: Harrison - Principios de Medicina Interna. 19a Edición. México, D.F.: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2015. p. 930

Inhibición del metabolismo bacteriano

Actúan inhibiendo la vía de la síntesis del ácido fólico, que constituye un cofactor en reacciones de transferencia monocarbónica, interviniendo en la síntesis de algunos ácidos nucleicos como: pirimidina, timidina y todas las purinas (adenina y guanina). También algunos aminoácidos (metionina y serina) y la acetilcoenzima A (CoA). El efecto antibacteriano selectivo proviene de la incapacidad de las células de mamíferos para sintetizar el folato, el cual se lo administra de forma exógena y con la presencia de la actividad antibacteriana puede disminuir las concentraciones causando infecciones. Sulfonamidas y Trimetoprim inhiben la dihidropteroato sintetasa, son análogos estructurales de PABA (ácido paraaminobenzoico), bloqueando la incorporación de la bacteria en el ácido dihidropteroico, el precursor inmediato del ácido fólico⁴⁵.

Inhibición de la síntesis de proteínas

Los antibióticos actúan una vez que atraviesan la membrana bacteriana externa, la pared celular y la membrana citoplasmática; lugar en el cual inhabilitan la síntesis de proteínas, donde se adaptan de manera definitiva a las proteínas ribosómicas de tal forma que impide que el tRNA forme complejos de iniciación⁴⁶. Las proteínas 30S y 50S contienen ARN ribosómico y diversas proteínas llamadas S (small30S) o L (large50S)⁴⁶. Estos lugares se pueden localizar en diferentes partes con la única condición que sean favorables para la unión de los antimicrobianos⁴⁷. Sherris et al⁴⁴, nos afirma que el cloranfenicol impide la formación del enlace peptídico entre aminoácidos. Las tetraciclinas actúan uniéndose a los ribosomas 30S. La eritromicina y los macrólidos impiden la translocación del tRNA.

Inhibición de la síntesis de la pared celular

Diversas bacterias poseen en su pared celular un componente primordial que es la capa de peptidoglucano⁴³, está compuesta de polisacáridos y un polipéptido. Los polisacáridos generalmente están conformados por los aminoglúcidos N-acetilglucosamina y ácido acetilmurámico. Existe una línea de antibióticos conocida como β - lactámicos que reúne cinco grandes grupos de antibióticos de uso clínico: penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, monobactámicos y carbapenémicos; pero también los no β - lactámicos como: vancomicina y bacitracina, los cuales son inhibidores selectivos de la síntesis de la pared celular bacteriana; inhibe el ensamblaje de las cadenas de peptidoglucano. Por lo tanto son

encargadas de producir las autolisinas que ayudan a la degradación de la pared celular, provocado así su muerte⁴⁴.

Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos

La inhibición que existe en la síntesis de los ácidos nucleicos, utilizan generalmente como antimicrobianos los quimioterapéuticos que toman como base las enzimas la topoisomerasa de tipo IV y topoisomerasa de tipo II (girasa) en el ADN⁴⁸. La síntesis de ADN puede verse interrumpida por el ácido p-aminobenzoico, por lo que interfiere en el metabolismo del ácido fólico que es requerido por ciertos microorganismos. En raras ocasiones puede presentar inhibición la ARN polimerasa, logrando así un impedimento en la iniciación de la síntesis de ARN⁴⁴. Existe una línea de antibióticos conocida como Fluoroquinolonas (Ciprofloxacino, ofloxacino) y Rifampicinas (rifampicina)⁴³.

Inhibición en la función de la membrana celular

La membrana celular sirve como barrera selectiva de permeabilidad⁴⁶. Los antimicrobianos actúan como detergentes, introduciéndose dentro de las membranas citoplasmáticas provocando así mayor absorción del microorganismo y posteriormente su muerte⁴⁴. Existen antibióticos como: Polimixina B y Daptomicina bactericidas contra gramnegativas y grampositivas⁴³.

Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos

La resistencia antimicrobiana se presenta como un problema continuo a un nivel mundial. Se hace aún mayor cuando los microorganismos presentan mecanismo de resistencia y a la vez poseen óptimas condiciones de transmisión; no solo a la descendencia sino que también a otras especies. Estos fenómenos de resistencia antimicrobiana son muy variados entre ellos nombramos: bombas de eflujo, alteración del antibiótico en el sitio blanco, alteración en las barreras de permeabilidad, inactivación del antibiótico por modificación o destrucción de la estructura química, siendo las que más destacan debido a la complejidad de su mecanismo de acción⁴⁸⁻⁴⁹.

Tipos de mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos

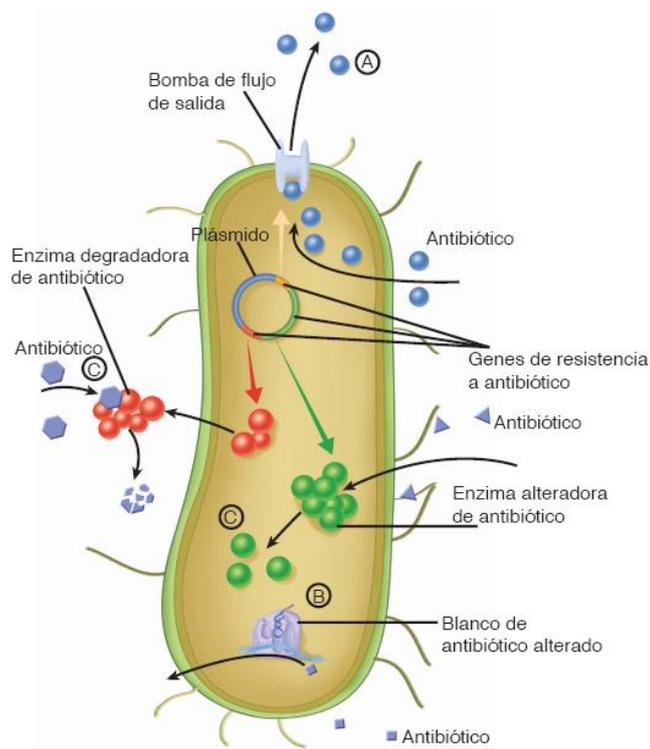


Figura N° 2. Tipos de mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos.

Fuente: Ryan K, Ray G: Tipos de mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos. Sherris: Microbiología Médica. 6a Edición. México, DF: McGraw-Hill p. 49

Tenemos diferentes tipos de mecanismos de los cuales se encuentran:

Bombas de eflujo

Transportan al antimicrobiano que se encuentra en el espacio periplásmico, hacia el exterior de la célula sin modificaciones. Tal proceso es mediado por proteínas transmembranales, con mayor frecuencia en las bacterias Gram negativas. Este mecanismo confiere resistencia a tetraciclinas, quinolonas, cloranfenicol y beta lactámicos⁴⁹.

Alteración del antibiótico en el sitio blanco

Modifica los sitios específicos de la célula bacteriana entre ellas la pared celular, membrana celular y entre otras⁵⁰. Cuando el blanco se altera reduce su afinidad por el antimicrobiano, el efecto inhibitor disminuye de manera proporcional, evitando así una mutación que origine una resistencia⁴³. Por ejemplo, la modificación por mutación de los genes GyrA y GyrB que ofrecen resistencia bacteriana a *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* frente a las

quinolonas⁵⁰. Debido a que los aminoglucósidos se enlazan en su sitio ribosómico y las quinolonas en una de las cuatro subunidades posibles de topoisomerasa⁴⁸.

Alteración en las barreras de permeabilidad

En este mecanismo es importante recalcar la alteración que sufre los receptores bacterianos, los cuales intervienen alterando el correcto funcionamiento de la permeabilidad de la envoltura de la célula bacteriana, provocando la disminución del transporte activo a través de la membrana celular⁴⁹. La causa principal por la que la mayoría de β -lactámicos son menos activos con las bacterias gramnegativas, es la incapacidad de atravesar la membrana externa. Las porinas son las encargadas de admitir la penetración del antibiótico, razón principal por la cual se origina resistencia, al existir alguna mutación en los canales de dicha proteína. Por ejemplo; la resistencia a imipenem que desarrollan las cepas *P. aeruginosa* debido a pérdida de la proteína de la membrana externa que es más importante en su penetración⁴³.

Inactivación del antibiótico por modificación o destrucción de la estructura química

En el presente mecanismo su característica principal es de producir enzimas que rompen la estructura química del antibiótico; las enzimas más conocidas son las beta-lactamasas que hidrolizan el núcleo betalactámico rompiendo el enlace amida⁴⁹. Las enzimas encargadas de la modificación de la estructura son cloranfenicol acetiltransferasa y además las que modifican a los aminoglucósidos, lincosamidas y estreptograminas⁴⁷. Cabe resaltar que un antimicrobiano es específico como la eritromicina que cataliza la hidrólisis del anillo lactona del antibiótico.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

Tipo de investigación

Enfoque mixto: se determinó la existencia de bacterias patógenas aisladas y se realizó tablas estadísticas con la medición de los halos de inhibición de la resistencia antimicrobiana en los productos agrícolas del río Chambo.

Cohorte transversal: se ejecutó en un lugar delimitado (lindante al río Chambo) y tiempo específico, durante el período de abril – julio 2019.

Descriptiva: se recolectó los datos de estudio, en donde se describe la resistencia antibacteriana de las bacterias de interés clínico encontradas en los cultivos agrícolas en sectores cercanos al río Chambo.

De campo: se recolectó las muestras de diferentes puntos geográficos aledaños al río Chambo, se aisló e identificó las bacterias patógenas y su resistencia antimicrobiana de los diferentes productos agrícolas.

No experimental: no se manipuló las variables, es decir, no se alteró las condiciones existentes.

Determinación de población y muestra.

Población: está establecida por los diferentes sectores de producción agrícola, asociadas a vegetales y hortalizas; los cuales son representativos en la zona de influencia de riego del río Chambo. De modo que se identificó 14 colonias bacterianas aisladas de los cultivos agrícolas.

Muestra: se empleó un muestreo por conveniencia debido a la accesibilidad de cantidades permitidas mínimas por parte de los productores. Por consiguiente se recolectó dos productos en cada punto geográfico, teniendo al final 12 muestras para el análisis microbiológico. Aislando e identificando 6 bacterias patógenas.

Técnicas e instrumentos de recolección de datos

- **Técnicas:** Observación directa.
- **Instrumentos:** Guía de observación, cámara fotográfica, protocolo de evaluación de CLSI.

Procedimiento

Identificación de área de estudio

En el presente estudio se utilizó los productos agrícolas encontrados en las cercanías (500m a 1Km) de los puntos de muestras de las aguas del río Chambo, la cual cubre una superficie aproximada de 3.580 Km². El recorrido de este río atraviesa la provincia de Chimborazo el cual consta de cantones como: Penipe, Guamote, Alausí, Chambo, Colta, Riobamba, y Guano²⁰. Donde se fijaron seis puntos para la recolección de los diferentes cultivos agrícolas. (Anexo N° 1, Figura N° 3).

Toma de muestra

Antes de la recolección de los cultivos agrícolas, se identificó seis lugares de muestreo, se tomó en cuenta la temperatura ambiente y la altitud. Se recolectó en bolsas estériles los productos agrícolas, para una mejor calidad de la muestra se recogió productos regados directamente del caudal del río Chambo, posteriormente se selló, se asignó su respectiva codificación a cada bolsa y se conservó en refrigeración hasta el momento de su llegada al laboratorio (Anexo N° 2). Cabe destacar que los vegetales y hortalizas se los obtuvo por duplicado. Cada uno de los productos obtenidos fueron transportados al Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud, en la Universidad Nacional de Chimborazo, establecimiento donde se llevó a cabo análisis microbiológico.

En la tabla 2. Se observa la ubicación de cada punto geográfico de la recolección de los productos agrícolas vertidos con agua de riego de la cuenca del río Chambo conjuntamente con su altitud.

Descripción de ubicación y altitud en cada estación de muestreo. (Tabla N° 2)

Puntos	Estación de muestreo	Ubicación	Altitud
Punto 1	Chambo	A 100 m de la entrada a Chambo	2569
Punto 2	San Antonio de Cebadas	A 120 m Vía Riobamba – Macas	2979
Punto 3	Licto	A 2 m de la Entrada de Licto	2730
Punto 4	Cebadas	A 200 metros de la entrada a Cebadas	2907
Punto 5	Penipe	Entrada de Penipe	2361
Punto 6	Cubijíes	A 50 metros de la entrada a Cubijies	2479

Elaborado por: Guamán María.

Aislamiento de bacterias patógenas presentes en la muestra

Una vez que las muestras de productos vegetales fueron transportadas al laboratorio de Microbiología, se realizó el análisis microbiológico con sumo cuidado para evitar posibles contaminaciones, se desinfectó el área de trabajo con alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 5% y se utilizó el equipo de protección personal necesario.

Del centro del producto vegetal se tomó 25 g (triturado) y posteriormente se realizó el pre-enriquecimiento en 225 ml en agua peptonada e incubado por 24 horas a 37°C. Se tomó 1ml de cultivo, se inoculó en 9 mL de agua peptonada e incubó por 24 horas a 37°C. De esta forma se observará las colonias y se escogerá las sospechosas (Anexo N° 3).

Preparación de medios de cultivo.

Se seleccionaron los agares: MacConkey Acumedia©, Sangre Himedia©, Cistina Electrolito Deficiente (CLED) DifcoTM, Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) DifcoTM y Müller Hinton DifcoTM; que fueron preparados según instrucciones del fabricante.

Todos los medios fueron autoclavados a 15 psi a 121 °C durante 25 minutos, se enfrió y se colocó en cajas monopetry Greiner© estériles, con un volumen aproximado de 15 mL sobre una superficie horizontal y en tubos anteriormente esterilizados un volumen de 5 mL respectivamente. Posteriormente solidificado el medio de cultivo se procedió almacenar en fundas de estériles para evitar la posible contaminación a una temperatura de 2 – 8°C.

Técnica de aislamiento de colonias

La técnica que empleada fue mediante siembra por agotamiento en el agar en McConkey Himedia©, Sangre Himedia©, se incubó en posición invertida durante 24 horas a 37°C en microaerofilia y aerobiosis. El aislamiento de las colonias se realizó a través de resiembra, donde se consiguió colonias puras, utilizando la técnica de agotamiento.

Tinción de Gram

La tinción de Gram es una técnica necesariamente fundamental para diferenciar las propiedades de la pared celular de diferentes bacterias entre ellas gramnegativas y grampositivas. El procedimiento comienza con el empleo de suero fisiológico o solución salina al 0,9% en una placa portaobjetos y se realizó un frotis de las colonias puras obtenidas de los diferentes agares con un palillo estéril. Se dejó secar al ambiente, para evitar las alteraciones de la pared celular de las bacterias producto del calor del mechero, posteriormente se fijó la muestra con calor aproximadamente tres veces. Para la tinción se utilizó el protocolo creado por Hans Christian Gram: El cual consiste en cubrir el frotis de la colonia con cristal violeta 1 minuto, añadir lugol 1 minuto, decolorar el frotis con alcohol cetona aproximadamente por 30 segundos y finalmente adicionar safranina 1 minuto. Cabe recalcar que después de añadir cada colorante se enjuaga con agua no directamente en la muestra. Dejar secar al ambiente y observar al microscopio óptico a 100x usando aceite de inmersión para una mejor calidad de observación⁵¹.

Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias patógenas

Para la identificación de las bacterias patógenas aisladas de los productos agrícolas del río Chambo, se utilizaron diferentes pruebas entre ellas detección de enzimas (coagulasa, oxidasa y catalasa), y bioquímicas como Kligler, Ureasa, Citrato, Malonato, Mio, LIA, además de Bilis esculina. (Anexo N° 5)

Medición de la resistencia antibiótica en las bacterias aisladas en los cultivos agrícolas

Una vez identificadas las bacterias patógenas se evalúa la resistencia y sensibilidad a diferentes antibióticos. Para ello se utilizó el método de Kirby Bauer llamada también difusión en agar. Cantón R. y de la Fuente N.^{52,53}, mencionan que es una “prueba cualitativa que determina si un microorganismo es sensible, intermedio o resistente a los

antimicrobianos probados”. Se utilizaron los siguientes antibióticos en discos: gentamicina de baja carga (CN), kanamicina (K), ácido nalidixico (NA), oxacilina (OX), penicilina (P), sulfa trimetropin (SXT), vancomicina (VA), tetracilina (TE), amoxicilina (AX), azitromicina (AZM), ceftriaxone (CRO), ciprofloxacina (CIP), colistina (CT), imipenem (IMP), ceftazidime (CAZ), aztreonam (ATM), amoxicilina/ácido, clavulánico (AMC), cefoxitin (FOX), cefotaxima (CTX). Para la técnica se preparó una dilución en NaCl 0,89% de cada colonia aislada para así poder confrontarlo a 0,5 de turbidez con el patrón McFarland. Se embebió con la solución anteriormente preparada un hisopo completamente estéril en la suspensión bacteriana y se sembró en Mueller Hinton tratando de cubrir por completo la caja petri de forma uniforme en un intervalo de ángulo de 60° a 70°. Posteriormente se procedió a la colocación de los discos de antibióticos con una pinza estéril a 15 mm del borde y 20 mm de equidistancia. Se incubó las placas 24 horas a 37°C y finalmente la lectura de resultados se realizó mediante el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio “CLSI” por sus siglas en inglés, guía internacional que mide la inhibición: Resistente (R), Sensible (S) o Intermedio (I).

Procesamiento estadístico

Se empleó el sistema operativo Microsoft Excel 2013, donde se logró realizar las tablas de resultados obteniendo así la frecuencia y el porcentaje de cada bacteria aislada en los cultivos agrícolas del río Chambo

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se seleccionaron puntos estratégicos tomando como referencia la longitud del río y las zonas agrícolas de los distintos sectores para la recolección de productos agrícolas cercanos al río Chambo. Los puntos fueron: Chambo, San Antonio de Cebadas, Licto, Cebadas, Penipe y Cubijíes.

En la tabla 3. Se detalla los datos de la temperatura de cada estación de muestreo y su punto de referencia oscila entre los 19°C y 20°C. Dando a conocer a Chambo con una temperatura mayor (21°C) y San Antonio de Cebadas, Penipe y Cubijíes con una menor (19°C) en relación a todos los lugares de muestreo.

Datos de temperatura ambiente obtenidos en cada estación de muestreo durante la recolección de productos agrícolas cercanos del río Chambo. (Tabla N° 3)

Puntos	Producto agrícola	Estación de muestreo	Bacterias aisladas	N° cepas bacterianas	Temperatura Ambiente (°C)
Punto 1	remolacha	Chambo	<i>E. cloacae</i>	2	21
			<i>E. faecalis</i>	1	
Punto 2	lechuga	San Antonio de Cebadas	<i>C. amalonaticus,</i>	1	19
			<i>P. vulgaris</i>	1	
Punto 3	zanahoria	Licto	<i>C. freundii</i>	2	20
Punto 4	frutilla	Cebadas	<i>E. faecalis,</i>	1	20
			<i>P. vulgaris</i>	1	
Punto 5	papas	Penipe	<i>C. freundii</i>	2	19
Punto 6	ocas	Cubijíes	<i>K. oxytoca</i>	2	19
			<i>E. cloacae</i>	1	

Elaborado por: Guamán María.

Según Ríos S et al²³, la existencia de bacterias se manifiesta a los cambios relacionados con las actividades antropogénicas. Madigan M et al⁵⁴, afirman que las bacterias patógenas necesitan una temperatura óptima para su crecimiento que corresponde 37°C, sin embargo existen patógenos que tiene alta probabilidad de desarrollarse en temperatura que oscilan los 5 °C a 65 °C. A exuberantes temperaturas (>65°C) se desnaturalizan los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos de la célula bacteriana. En cambio a bajas temperaturas (<5°C) se disminuye el metabolismo y la membrana se vuelve más rígida.

Orozco J, Molina J¹⁷, en un estudio enfocado al aislamiento de bacterias patógenas en el río Chambo, su temperatura oscila 20°C y 22°C. Presentando similitud con la temperatura donde fue un factor clave para el desarrollo bacteriano.

Varela G et al⁵⁵, OMS/OPS⁶, la temperatura favorable para su multiplicación está establecida por rangos según su capacidad de crecimiento psicrófilas, crecen entre -5 y 30°C, temperatura óptimo de 15°C; mesófilas, crece entre 10 y 45°C, con el óptimo a los 30°C y termófilas, que crecen entre 25 y 80°C, con el óptimo en 55°C.

En la Tabla 4. Se muestra la distribución porcentual de las bacterias aisladas según la coloración Gram, observándose en 4 bacterias Gram negativas (83,3%) y Gram positivas 1 (16,7%) respectivamente.

Distribución porcentual de las bacterias aisladas según la coloración de Gram. (Tabla N° 4)

Técnica de tinción Gram	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Gram negativas	5	83,3
Gram positivas	1	16,7
Total	6	100

Elaborado por: Guamán María.

Ríos S et al²² y Salinas L, et al²³, confirman nuestros hallazgos mencionando que es su mayoría las bacterias de interés clínico encontradas en agua de ríos, vegetación y suelos son enterobacterias que están asociadas a contaminación fecal.

De acuerdo a Murray et al³⁷ y Sherris et al⁵⁶, el género *Enterococcus* no es comúnmente encontrado en agua de río y vegetación más bien indican contaminación fecal. Farkas et al⁵⁷, menciona que principalmente las bacterias vinculadas a la alteración antropogénica son las enterobacterias.

Orozco J, Molina J¹⁷, aislaron e identificaron 9 especies de gramnegativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae equivalente a (81,8 %).

En la tabla 5 se evidencian las diferentes bacterias aisladas de los productos agrícolas de la Cuenca del río Chambo, de un total de 13 colonias aisladas, se identificó 5 bacterias patógenas al humano utilizando pruebas fisiológicas y bioquímicas para gramnegativos y grampositivas.(Anexo N° 4)

Bacterias patógenas aisladas de los productos agrícolas de la Cuenca del río Chambo (Tabla N° 5)

Hallazgo bacteriano				
Familia	Género	Especie	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i> <i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i>	<i>amalonaticus, freundii</i> <i>cloacae</i> <i>oxytoca</i> <i>vulgaris</i>	5	83,3
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	<i>Faecalis</i>	1	16,7
TOTAL			6	100

Elaborado por: Guamán María.

Ríos S et al²², manifiesta que “la existencia de bacterias, parásitos, virus y hongos en el agua surge eventualmente por efecto directo o indirecto de cambios en el medio ambiente.” En su mayoría son bacterias entéricas, existen actividades como son las agropecuarias, existencia de abonos orgánicos con restos fecales de diferentes animales; la utilización inadecuada de aguas residuales en los cultivos y actividad agrícola que favorecen la contaminación del agua afectando la calidad microbiológica de las fuentes acuáticas. Existe muy baja probabilidad de encontrar bacterias grampositivas a excepción del género *Enterococcus* que se debe a contaminación fecal.

Farkas et al⁵⁷, da a conocer diversos patógenos que fueron identificadas como posibles bacterias de preocupación tales como *E. fergusonii*, *K. oxytoca* y *K. pneumoniae*. La contaminación microbiológica de origen fecal animal y humano en las fuentes de agua dulce; presenta un riesgo al introducir elementos genéticos responsables de la resistencia bacteriana que pueden perpetuarse en el medio ambiente.

Kasper et al²⁵, establece que el género *Enterobacter* y *Citrobacter* son patógenos comúnmente encontrados en agua, suelos, vegetación y flora normal de animales, causantes principales de infecciones en el tracto gastrointestinal.

Orozco J, Molina J¹⁷, determinó la presencia de agentes patógenos, lográndose aislar bacterias de interés clínico con resistencia antimicrobiana entre ellas: *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas spp*, y *Enterococcus spp*, en las aguas del río Chambo.

En la tabla 6 se muestra las diferentes bacterias patógenas aisladas en cada uno de los puntos de recolección de cultivos agrícolas que recorre el río Chambo, se observa que en el cantón San Antonio de Cebadas, Licto, Cebadas y Penipe fueron encontradas dos especies (14,29%), mientras que en Chambo y Cubijíes 3 especies (21,42%).

Distribución de las bacterias patógenas según la estación geográfica de muestreo. (Tabla N° 6)

Estación de muestreo		Bacterias patógenas						Frecuencia	Porcentaje (%)
		<i>C. amalonaticus</i>	<i>C. freundii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>k. oxytoca</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>E. faecalis</i>		
Punto 1	Chambo			2			1	3	21,42
Punto 2	San Antonio de Cebadas	1				1		2	14,29
Punto 3	Licto		2					2	14,29
Punto 4	Cebadas					1	1	2	14,29
Punto 5	Penipe		2					2	14,29
Punto 6	Cubijies			1	2			3	21,42
TOTAL								14	100

Elaborado por: Guamán María.

Chambo y Cubijíes fueron las estaciones de muestreo donde se aisló mayor cantidad de bacterias patógenas con un porcentaje de 21,42%, seguido de San Antonio de Cebadas, Licto, Cebadas y Penipe 14,29%,; mismos datos que evidencian la presencia de diferentes especies de bacterias de interés clínico que provocan enfermedades gastrointestinales al ser humano.

Orozco J, Molina J¹⁷, presentaron hallazgos relevantes en cada estación de muestreo como: “Cebadas y Penipe se aisló gran cantidad de especies bacterianas patógenas con un porcentaje 27,2%, seguido de Chambo y Cubijíes 18,1%.”

Bautista, V⁵⁸ y Jaque E, et al⁵⁹, evidencian la existencia de coliformes fecales, las cuales son igual de patógenas en las dos épocas del año tanto lluvias y clima cálido; se presenta coliformes correspondiente a la presencia de *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. Sin embargo, ésta se encuentra próxima a alrededor de actividad humana, actividad ganadera lo que da una alta probabilidad del aumento de crecimiento bacteriano en el río Chambo.

Se midió la resistencia antimicrobiana de las diferentes bacterias aisladas de los productos agrícolas regadas con el agua del río Chambo. Se realizó la interpretación del antibiograma empleando la guía Internacional Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) la cual permite medir fenotípicamente la sensibilidad y resistencia a los antibióticos (Anexo N° 9).

En la tabla 7. Se indica el patrón de susceptibilidad y resistencia a los antimicrobianos, presentando en bacterias como: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* y *Proteus vulgaris* resistencia de ceftazidime (CAZ) e imipenem (IMP); catalogándolo como fenotipo de β -lactamasa AmpC inducible y *Enterobacter cloacae* resistencia a amoxicilina (AX) y cefoxitin (FOX) identificándola como fenotipo de β -lactamasa AmpC plasmídica (Anexo N° 7).

Patrón de resistencia y sensibilidad a antibióticos de las bacterias patógenas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. (Tabla N° 6)

Microorganismo	CN	K	CT	TE	CIP	AN	AMC	CTX
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	I	R	S	S	S	S	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> (Cepa 1)	S	I	S	S	S	S	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> (Cepa 2)	S	S	S	S	S	S	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (Cepa 1)	I	R	S	S	S	S	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (Cepa 2)	S	I	R	I	S	S	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	S	I	S	S	S	S	I	I
<i>Proteus vulgaris</i> (Cepa 1)	I	I	S	S	S	S	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> (Cepa 2)	S	I	S	S	S	S	-	-

CN: gentamicina de alta carga; K: kanamicina; CT: colistin; TE: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; AN: ácido nalidixico. AMC: amoxicilina/ácido, clavulánico; CTX: Cefotaxima.

Elaborado por: Guamán María.

Microorganismo	SXT	CRO	CAZ	IMP	ATM	AX	FOX
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	S	S	S	S	S	R	S
<i>Citrobacter freundii</i> (Cepa 1)	S	S	R	R	S	R	-
<i>Citrobacter freundii</i> (Cepa 2)	I	R	I	S	R	S	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (Cepa 1)	S	S	R	R	S	R	R
<i>Enterobacter cloacae</i> (Cepa 2)	S	S	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella oxytoca</i>	S	S	S	S	S	R	S
<i>Proteus vulgaris</i> (Cepa 1)	S	S	R	R	S	R	-
<i>Proteus vulgaris</i> (Cepa 2)	S	S	S	S	S	R	-

SXT: sulfa trimetropin; CRO: ceftriaxone; CAZ: ceftazidime; IMP: imipenem; ATM: aztreonam. AZM: azitromicina; AX: amoxicilina; FOX: cefoxitin;

Elaborado por: Guamán María.

Los resultados obtenidos muestra que *Enterobacter cloacae* presenta AmpC; este mecanismo se expresa hidrolizando las cefalosporinas de primera (cefalotina) y segunda generación (cefuroxima), incluidas las cefamicinas (cefoxitina y cefotetán). En menor medida las de tercera generación (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima), usualmente son muy poco eficaces hidrolizando las cefalosporinas de cuarta generación (cefepima y ceftipiro) y los carbapenémicos (imipenem y meropenem)⁵⁹⁻⁶⁰.

En el caso de *Enterobacter cloacae* se identificó como fenotipo de β -lactamasa plasmídica (**Imagen N° 1**), debido a que carecen de ampR en su genoma cromosómico; ésta proteína se encarga de unirse al ADN y a la ampC, además actúa como represor de ampC. Generalmente éstas se expresan constitutivamente ampC no inducible⁶¹. Su producción basal puede incrementar debido a las variaciones localizadas en el gen y la existencia de múltiples plásmidos en los genes⁵⁹. Orozco J, Molina J¹⁷, presentó la existencia de betalactamasas de tipo AmpC, en cepas bacterianas de *Enterobacter aerogenes*, la cual se observó una resistencia a amoxicilina (AX) y cefoxitin (FOX).

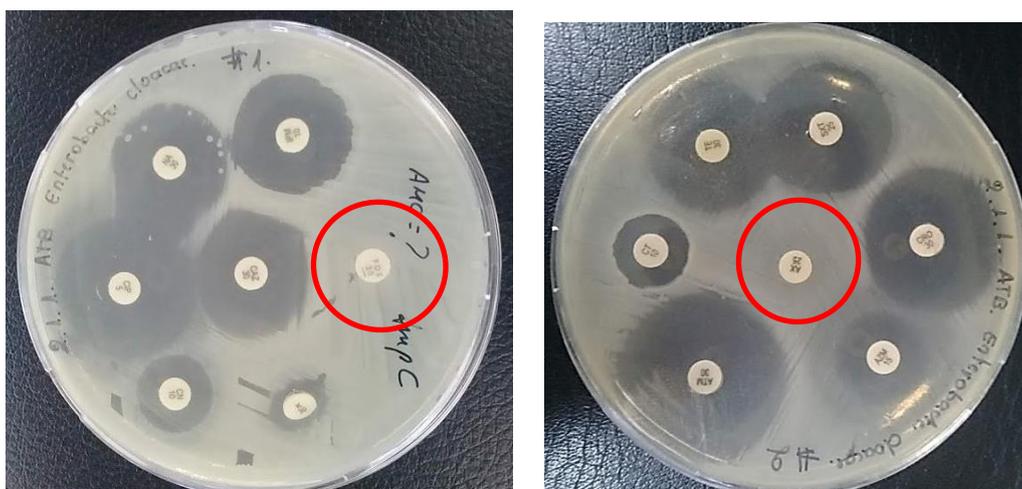


Imagen N° 1: Resistencia a amoxicilina y cefoxitin en *Enterobacter cloacae*.

Enterobacter cloacae, *Citrobacter freundii* y *Proteus vulgaris* son enterobacterias que se identificó como fenotipo de β -lactamasa AmpC inducible⁵⁹ (**Imagen 2, 3, 4**). El grado de inducción depende del tipo de inductor y es máximo con inductores fuertes como la cefoxitina y los carbapenémicos sumada a la pérdida de porinas en la membrana externa, su expresión puede estar desreprimida establemente de forma parcial o total (mutaciones en genes reguladores de tipo ampD y ampR), dando lugar a la producción estable de grandes

cantidades de AmpC. Cabe recalcar que el ácido borónico y sus derivados son inhibidores de β -lactamasas tipo AmpC⁶².



Imagen N° 2: Resistencia de ceftazidime e imipenem en *Citrobacter freundii*.

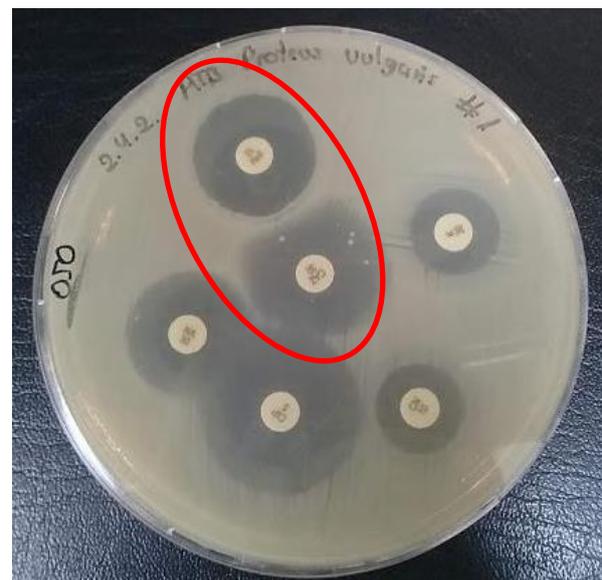


Imagen N° 3: Resistencia de ceftazidime e imipenem en *Proteus vulgaris*.



Imagen N° 4: Resistencia de ceftazidime e imipenem en *Enterobacter cloacae*.

En la tabla 8. Se manifiesta el patrón de resistencia y sensibilidad a antibióticos del género *Enterococcus faecalis*. (Anexo N° 7)

Patrón de resistencia y sensibilidad antimicrobiana del *Enterococcus faecalis* (Tabla N° 6)

Microorganismo	CN	K	TE	CIP	VA	AX	P
<i>Enterococcus faecalis</i>	S	I	S	S	R	S	R

CN: gentamicina de alta carga; K: kanamicina; TE: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; VA: vancomicina; AX: amoxicilina; P: penicilina..

Elaborado por: Guamán María.

Murray et al³⁷ y Sherris et al⁵⁶, afirman que la familia Enterococcaceae, una de las especies más conocidas son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. Cabe recalcar que la combinación con gentamicina de baja carga, presenta una resistencia natural a *Enterococcus faecalis*⁴⁸. Con mayor frecuencia adquiere resistencia a vancomicina, esto debido a una mutación en el gen *vanA* que es transferible, se encuentra localizado en el trasposón Tn1546, generalmente en un plásmido, rara vez se ha transferido al cromosoma. Este trasposón codifica proteínas que intervienen en la resistencia *vanR* y *vanS*, implicadas en la regulación del gen de resistencia *vanA*, son las responsables directas de la resistencia a glucopéptidos⁶³.

(Imagen N° 5)

En una investigación realizada por Mur L y Marcillo K¹⁸, presenta al género *Enterococcus* en las aguas de regadío de los ríos de la provincia de Chimborazo, confirmando así la probable existencia de la familia *Enterococcaceae* en el río Chambo, utilizado como regadío para el cultivo de los diferentes productos vegetales.



Imagen N° 5: Resistencia a vancomicina y penicilina de *Enterococcus faecalis*

CONCLUSIONES

1. Se recolectaron los cultivos agrícolas vertidos con agua de regadío de la cuenca del río Chambo en seis puntos geográficos, estos lugares fueron: Chambo, San Antonio de Cebadas, Licto, Cebadas, Penipe y Cubijés. Para su análisis bacteriológico fue necesario medir la temperatura ambiente de cada estación de muestreo, además de la altitud plasmándolos en la guía de observación conjuntamente con su codificación y dichos valores se presentaron óptimas para el crecimiento bacteriano.
2. Se aisló e identificó de un total de 6 bacterias patógenas al ser humano procedentes de los diferentes productos agrícolas recolectados de los puntos geográficos del río Chambo. Las bacterias fueron identificadas mediante el uso de pruebas fisiológicas y bioquímicas tanto para gramnegativas y grampositivas. La mayor cantidad de bacterias fueron halladas en Cubijés (23,10%), y la familia más presente pertenece a Enterobacteriaceae. (83,3%) entre ellas: *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* y Enterococcaceae (16,7%) la cual fue *Enterococcus faecalis*.
3. Se midió la resistencia antimicrobiana de las bacterias de interés clínico, la mayoría de las cepas de Enterobacterias aisladas se mostraron susceptibles a los antibióticos probados solo un escaso porcentaje mostró resistencia a algunos antibióticos. De modo que, fenotípicamente los resultados para gramnegativos presentaron mecanismos de resistencia β -lactamasa AmpC inducible. Los presentes resultados evidencian la existencia de bacterias patógenas resistentes a antibióticos de uso clínico en los productos agrícolas de la Cuenca del río Chambo, considerándolo así altamente contaminados, además de ser causa principal de múltiples infecciones gastrointestinales.

RECOMENDACIONES

1. En los productos agrícolas recolectados de la Cuenca del río Chambo se hallaron bacterias de interés clínico resistentes a antibióticos, este hallazgo es sumamente importante; ya que se recomienda mayor cautela por parte del Ministerio de Salud Pública perteneciente a la provincia del Chimborazo y el Gobierno Autónomo Descentralizado municipal de Chambo, del empleo de las aguas del río Chambo siendo estas regadas en los cultivos, así como la producción de sus vegetales que son regados por el río.
2. Se recomienda evitar el empleo de fertilizantes en el suelo conjuntamente con materia orgánica, ya que esta acción favorece la proliferación de bacterias y a óptimas condiciones proporciona aumento del crecimiento bacteriano que es fuente de contaminación de los productos vegetales.
3. Se recomienda sensibilizar a la población de la provincia de Chimborazo informando sobre el efecto que conlleva el manipular y consumir alimentos contaminados con bacterias patógenas, estas generalmente son transmitidas de manera fecal a los alimentos de origen vegetal. Las consecuencias se ven reflejadas en las infecciones gastrointestinales, priorizar medidas higiénico-sanitaria a los agricultores.
4. Se sugiere continuar con este tipo de investigaciones para identificar la existencia de bacterias de interés clínico en distintos lugares del Ecuador mediante equipos automatizados, con el fin de facilitar la identificación de género y especie; erradicando así el origen de diferentes tipos de bacterias multiresistentes a antibióticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. López A. Manual Para la Preparación y Venta de Frutas y Hortalizas. 1era edición. Argentina, INTA E.E.A. Balcarce 2003. p 81-92.
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Inocuidad de los alimentos [Internet]. Ginebra: c2017 [actualizado 31 de octubre de 2017; citado 2 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
3. Naciones Unidas. Mensaje del Secretario General con ocasión del Día Mundial de la Salud [Internet]. Ginebra: c2015 [actualizado 7 de abril de 2015; citado 2 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.un.org/es/sg/messages/2015/healthday2015.shtml>
4. Organización Mundial de la Salud (OMS). Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. Ginebra: c2018 [actualizado 15 de febrero de 2018; citado 2 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>
5. Organización Mundial de la Salud (OMS). Who estimates of the global burden of foodborne diseases? 1era edición. Ginebra, WHO Press 2015. p 13-18
6. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Tema de Salud: Inocuidad de los alimentos. Peligros biológicos [Internet]. Ginebra: c2018 [actualizado 15 de febrero de 2018; citado 2 de mayo de 2019]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es
7. Rodríguez H, Barreto G, Sedrés M, Bertot J, Martínez S, Guevara G. Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. Redvet. [Internet]. 2015 [citado 29 de mayo de 2019]; 16(8): p. 1-27 Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/636/63641401002.pdf>
8. Viteri M, Tapia M. Economía ecuatoriana: de la producción agrícola al servicio. Rev. Espacios. [Internet]. 2018 [actualizado 23 de febrero de 2018; citado 8 de mayo de 2019]; 39(32): 30 Disponible en: <https://www.revistaespacios.com/a18v39n32/a18v39n32p30.pdf>
9. Elcomercio.com. FAO ayuda a Ecuador a mitigar bacterias multirresistentes [Internet]. Ecuador: c2017 [actualizado 13 de marzo de 2017; citado 4 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.elcomercio.com/tendencias/fao-cooperacion-ecuador-bacterias-multirresistentes.html>

10. Prensa Quito. Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) [Internet]. Ecuador: c2017 [actualizado 31 de mayo de 2017; citado 4 de mayo de 2019]. Disponible en: [http://prensa.quito.gob.ec/index.php?module=Noticias&func=news_user_view&id=26101&umt=Enfermedades%20Transmitidas%20por%20Alimentos%20\(ETA\)](http://prensa.quito.gob.ec/index.php?module=Noticias&func=news_user_view&id=26101&umt=Enfermedades%20Transmitidas%20por%20Alimentos%20(ETA))
11. Gómez, G. La microbiología de los suelos en el Ecuador, situación actual de la investigación. [Internet]. Ecuador: c2015 [citado 16 de junio de 2019]. Disponible en: <http://www.secsuelo.org/wp-content/uploads/2015/06/1.-La-Microbiologia-de-Suelos.pdf>
12. Troya C, Herrera D, Guevara A, Obregón M, Gaus D, Larcos D, et al. Monitoreo local de resistencia a los antibióticos en *Escherichia coli* en una zona rural de Ecuador: más allá del modelo Biomédico. *Práctica Fam Rural* [Internet]. [actualizado 28 de marzo de 2016; citado 17 de junio de 2019]; 1(1). Disponible en: <http://ojssalud.saludesa.org.ec/index.php/saludrural/article/view/128/190>
13. Villagómez Estrada S, Logacho Pilataxi M, Vinuesa Burgos C. Presencia y Resistencia a los Antimicrobianos de serovariedades de *Salmonella entérica* aisladas en una empresa avícola integrada del Ecuador. *Rev Ecuat Med Cienc Biol* [Internet]. 30 de mayo de 2017 [citado 17 de junio de 2019]; 38(1):11–24. Disponible en: <http://remcbpuce.edu.ec/index.php/remcb/article/view/17>
14. García Y, Calle L, Ramos J. Eliminación de bacterias perjudiciales de un Fertilizante Orgánico (BIOL) mediante un Tratamiento de Foto-degradación [Internet]. [actualizado 04 de enero de 2018; citado 17 de junio de 2019]; 5(17):1–16.
15. Ecuadorencifras.com. Compendio 2016 [Internet]. Ecuador: 2016 [citado 8 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Bibliotecas/Compendio/Compendio-2016/Compendio%202016%20DIGITAL.pdfZ>
16. ElComercio.com. Cuatro ríos de Chimborazo, contaminados. [Internet]. Ecuador: 2010. 14 de julio de 2010 [citado 17 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.elcomercio.com/tendencias/rios-chimborazo-contaminados.html>
17. Molina J, Orozco J. Detección de resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico aisladas en el Río Chambo. Noviembre 2018 - enero 2019 [Internet]. Ecuador: 2019 [actualizado 28 de marzo de 2019; citado 4 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/5557>

18. Mur L, Marcillo K. Resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas aisladas del regadío del río Chibunga [Internet]. 2018 [citado 4 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/5098>
19. Lloret P. Sistematización de Buenas Prácticas Agrícolas y de Riego como Medidas de Adaptación al Cambio Climático En las Cuencas de los Ríos Guayllabamba, Ambato, Chambo y Paute [Internet]. Ecuador: 2014 [citado 8 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://www.asocam.org/sites/default/files/publicaciones/files/fbdd84603ec6706cbc84f590041a90e5.pdf>
20. Consejo de Subcuenca Chambo. Subcuencachambo.wordpress.com [Internet]. Ecuador: 2015 [actualizado 6 de abril de 2015; citado 9 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://subcuencachambo.wordpress.com/diagnostico-de-la-subcuenca/>
21. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Bacilos gramnegativos entéricos (Enterobacteriaceae) En: Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica. 25a edición. Argentina McGraw-hill 2010. p 165-227.
22. Ríos S, Agudelo R, Gutiérrez L. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. Rev. Fac. Nac. Salud Pública [Internet]. 2015 [actualizado 15 de febrero de 2017; citado 9 de mayo de 2019]; 35 (2): 236-47. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v35n2/0120-386X-rfnsp-35-02-00236.pdf>
23. Salinas L, Cárdenas P, Johnson T, Vasco K, Graham J, Trueba G. Diverse Commensal *Escherichia coli* Clones and Plasmids Disseminate Antimicrobial Resistance Genes in Domestic Animals and Children in a Semirural Community in Ecuador [Internet]. Ecuador: 2019 [citado 10 de mayo de 2019]. Disponible en: DOI: 10.1128/msphere.00316-19
24. Ryan KJ, Ray GC. Enterobacterias. En: Sherris Microbiología médica. 5a Edición. México, D.F.: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2011. p. 463–80.
25. Kasper D, Hauser S, Jameson J, Fauci A, Longo D, Loscalzo J. Enfermedades causadas por bacilos entéricos gramnegativo. En: Harrison - Principios de Medicina Interna. 19a Edición. México, D.F.: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2015. p. 1025-35.
26. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Enterobacteriaceae. En: Microbiología médica. 8va. edición. Barcelona: Elsevier; 2017. p. 252–64.

27. Negroni M. Enfermedades Bacterianas. En: Microbiología Estomatológica Fundamentos y Guía Práctica. 2da. edición. Médica Panamericana; 2009. p. 389
28. García PA, Rodríguez MF. Enfermedades infecciosas (III). Infecciones por anaerobios y enterobacterias. *Medicine*. 2010; 10(51): 3426-31.
29. Tortora G, Funke BR, Case CL. Procariontes: Dominios: Bacteria y Archaea. En: Introducción a la microbiología. 12va edición. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2017. p. 313–30.
30. Koneman EW, Winn WC. Enterobacteriaceae. En: Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color. 6ta. edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2008. p. 205–62.
31. Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity and Infection. *Clinical Microbiology* [Internet]. 2010 [citado 15 de mayo de 2019]; 23 (1): 35 Disponible en: DOI: 10.1128/cmr.00039-09
32. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Vibrios y bacterias relacionadas. En: Microbiología médica. 8va edición. Barcelona: Elsevier; 2017. p. 265–71.
33. Frías JA. El género *Aeromonas* como patógeno humano. *Rev Sanid Milit* [Internet]. 10 de octubre de 2017 [citado 17 de mayo de 2019]; 58(4): 321–3. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=74707>
34. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Pseudomonas* y microorganismos relacionados. En: Microbiología médica. 8va edición. Barcelona: Elsevier; 2017. p. 272–8.
35. Ryan KJ, Ray GC. *Pseudomonas* y otros bacilos gramnegativos oportunistas. En: Sherris: microbiología médica. 5a Edición. México, DF: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2011. p. 476.
36. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y bacterias gramnegativas infrecuentes (Enterobacteriaceae) En: Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica. 25a edición. Argentina McGraw-hill 2010. p 227-36.
37. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Enterococcus* y otros cocos grampositivos. En: DRK, editor. Microbiología médica [Internet]. 7a ed. Elsevier; 2014 [citado 18 de mayo de 2019]. p. 205. Disponible en: <http://www.studentconsult.es/bookportal/microbiologia-medica7/murray/obra/9788490224113/500/4999.html>

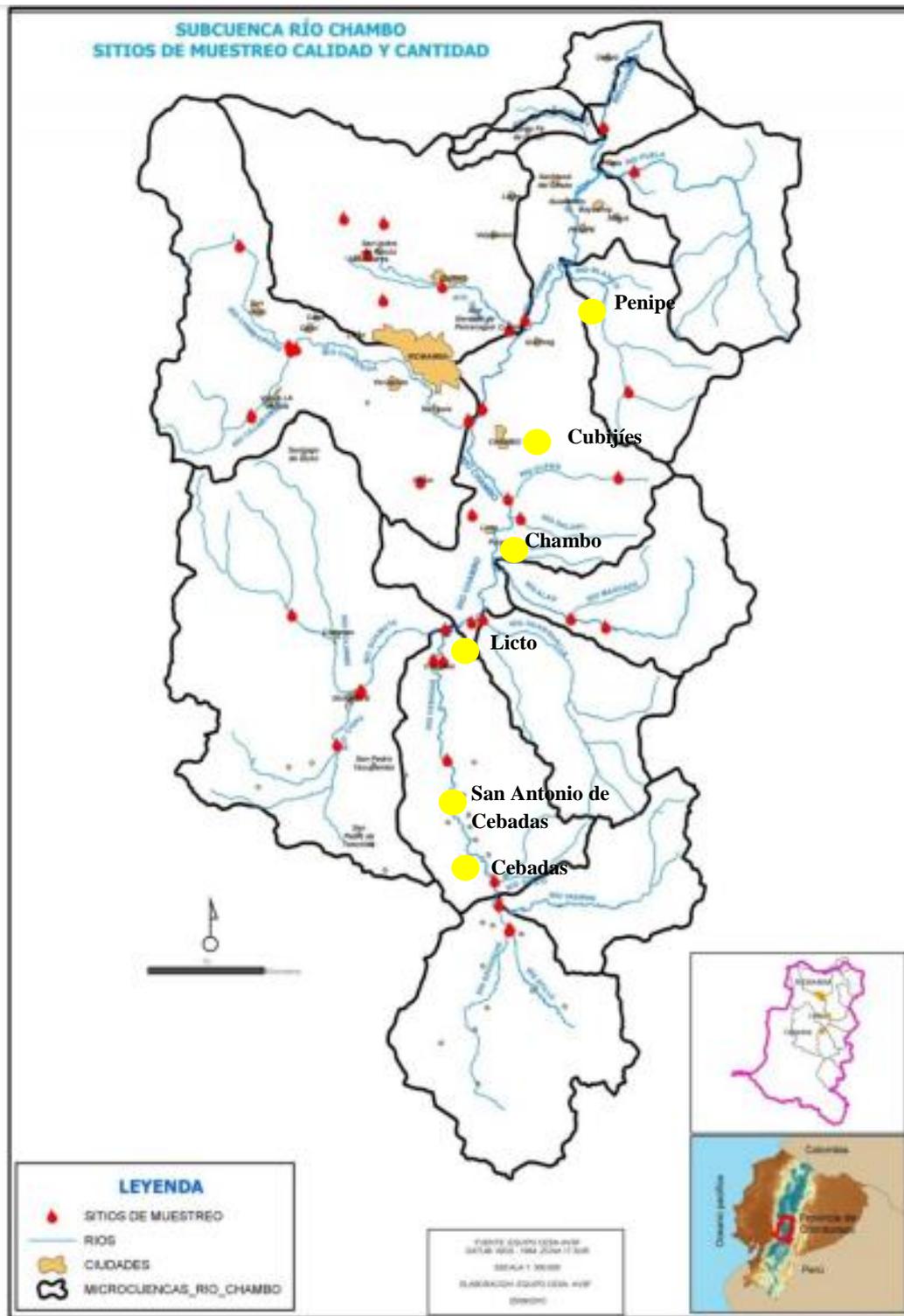
38. Kasper D, Hauser S, Jameson J, Fauci A, Longo D, Loscalzo J. Infecciones causadas por bacterias grampositivas. En: Harrison - Principios de Medicina Interna. 19a Edición. México, D.F.: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2015. p. 971.
39. Calderón G, Aguiar L. Resistencia antimicrobiana: Microorganismos más Resistentes y antibióticos Con menor actividad. Rev. Med. Costa Rica [Internet]. 2016 [actualizado 27 de septiembre de 2016; citado 10 de mayo de 2019]; 73 (621) 757 – 763. Disponible en: <https://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/621/art03.pdf>
40. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. Pathogens and Global Health. [Internet]. ABSA International: 2015 [citado 10 de mayo de 2019]. Disponible en: DOI:10.1179/2047773215y.0000000030
41. Acevedo R, Severiche C, Jaimes J. Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. Rev. P+L. [Internet]. 2015 [actualizado 11 de diciembre de 2015; citado 11 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
42. Alós JI. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2015; 33(10): 692–9. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X14003413>
43. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Agentes antibacterianos. En: Microbiología médica. 8va edición. Barcelona; 2017. p. 162–9.
44. Ryan KJ, Ray GC. Fármacos antibacterianos y resistencia. En: Sherris: microbiología médica. 5a Edición. México, DF: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2011. p. 310-31.
45. Kasper D, Hauser S, Jameson J, Fauci A, Longo D, Loscalzo J. Tratamiento de enfermedades bacterianas. En: Harrison - Principios de Medicina Interna. 19a Edición. México, D.F.: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2015. p. 930-34.
46. Calvo J, Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. 2009 [citado 20 mayo de 2019]; 27(1). Disponible en: DOI: 10.1016/j.eimc.2008.11.001
47. Tortora G, Funke BR, Case CL. Fármacos antimicrobianos. En: Introducción a la Microbiología. 9na edición. Médica Panamericana; 2007. p. 582–94.

48. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Quimioterapia antimicrobiana. En: Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica. 25a edición. Argentina McGraw-hill 2010. p 339-54.
49. Serra M. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana Rev haban cienc méd. [Internet]. 2017 [citado 13 de mayo de 2019]; 16(3): 402-19. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000300011519X2017000300011
50. Vignoli R, Seija V. Principales mecanismos de resistencia antibiótica, 1ra edición, Mc Graw Hill. 2010. p 649-56
51. Rodríguez PA, Arenas R. Hans Christian Gram y su tinción Hans Christian Gram and His Staining [Internet]. 2018 [citado 28 de agosto de 2019]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>
52. Cantón, R. Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica [Internet]. 2010 [citado 18 agosto de 2019]; 28(6). p 375-85 Disponible en: DOI: 10.1016/j.eimc.2010.01.001
53. De la Fuente N, Villarreal J, Díaz M, García A. Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. Rev mex. Cienc. [Internet]. 2015 [citado 20 de agosto de 2019]; 46(2): p. 4-16. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1870-01952015000200007&lng=es&nrm=iso
54. Madigan MT, Brock TD, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH (Daniel H, Stahl DA, et al. Brock. Biología de los microorganismos [Internet]. 14va edición. Pearson; 2015 [citado 21 de agosto de 2019]. p. 1132. Disponible en: http://www.ingebook.com/ib/NPcd/IB_BooksVis?cod_primaria=1000187&codigo_libro=5850
55. Varela G, Grotiuz G. Fisiología y metabolismo bacteriano. 1ra edición, Uruguay; Editorial Cefa. 2002. p. 43-58.
56. Ryan KJ, Ray GC. *Streptococcus y Enterococcus* En: Sherris: microbiología médica. 5a Edición. México, DF: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2011. p. 359.
57. Farkas A, et al. Microbiological contamination and resistance genes in biofilms occurring during the drinking water treatment process. Rev. ELSEVIER. [Internet]. 2013 [citado 22 de agosto de 2019]; 443(2): 932-38. Disponible en: DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.11.068

58. Bautista V. Estudio de la calidad del agua de la cuenca del Río Chambo en época de estiaje. dspace [Internet]. 2014 [citado 23 de agosto de 2019]; p 108. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/3221>
59. Jaque E, Potocí C. Evaluación del Índice de Calidad de Agua (ICA) de la microcuenca del Río Chibunga, en variaciones estacionales, provincia de Chimborazo – Ecuador, durante el periodo 2014. dspace [Internet]. 2015 [citado 23 de agosto de 2019]; p 100. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4077>
60. Calvo J, Cantón R, Fernández F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia. en gramnegativos En: Procedimientos de Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2da. edición. Médica Panamericana; 2011. p. 10–2.
61. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. [Internet]. 2015 [citado 26 de agosto de 2019]. 2010; 54: 969-76. Disponile en: DOI: 10.1128/AAC.01009-09
62. Jiménez G, Hoyos Y, Rodríguez J, Navarro J, Gutiérrez J. Método rápido para la detección de la sensibilidad a cefotaxima en enterobacterias. Rev Argentina de Microbiología. [Internet]. 2016 [citado 26 de agosto de 2019]; 48(4): 320-24. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754116300815>
63. Merlo T., Dabul A, Camargo I.(2015). Different *vanA* Elements in *E. faecalis* and in *E. faecium* Suggest at Least Two Origins of Tn1546 Among VRE in a Brazilian Hospital. [Internet]. 2015. Rev. Microbial Drug Resistance, 21(3), 320–28. Disponible en: DOI: 10.1089/mdr.2014.0077

ANEXOS

Anexo N° 1: Localización de los puntos geográficos para la recolección de productos vegetales del río Chambo.



Fuente: CESA, 2011

Figura N° 3. Localización de las estaciones de muestreo a lo largo de la microcuenca del río Chambo.

Fuente: Cordovéz M. 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. UNACH

Anexo N° 2: Modelo y fichas de observación de cada estación de muestreo a lo largo de la cuenca del río Chambo.

FICHA DE OBSERVACIÓN DE LA TOMA DE MUESTRA

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:

Estudiante

Tutor

Fuente: Cordovéz M. 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. UNACH

FICHA DE OBSERVACIÓN DE LA TOMA DE MUESTRA

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: 211

Nombre del estudiante: María Guadalupe Guamán Chabla

Fecha: 1-01-2019

Muestra: Agua Producto Agrícola Río: _____

Muestra tomada en (lugar): Chambo

Temperatura: Medio Ambiente 21°C 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:



Estudiante



Tutor

FICHA DE OBSERVACIÓN DE LA TOMA DE MUESTRA

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: 2.1.2

Nombre del estudiante: María Guadalupe Guamán Chabla

Fecha: 1-01-2019

Muestra: Agua Producto Agrícola Río: _____

Muestra tomada en (lugar): Chambo

Temperatura: Medio Ambiente 21°C 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:



Estudiante



tutor

FICHA DE OBSERVACIÓN DE LA TOMA DE MUESTRA

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: 12.2/13/17

Nombre del estudiante: María Guadalupe Guzmán Obabela

Fecha: 3-03-2017

Muestra: Agua Producto Agrícola Río: _____

Muestra tomada en (lugar): San Antonio de Cebadas

Temperatura: Medio Ambiente 19°C 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:



Estudiante



Tutor

FICHA DE OBSERVACIÓN DE LA TOMA DE MUESTRA

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: 3.2.2

Nombre del estudiante: Maña Doralupe Guzmán Chahua

Fecha: 3-03-2019

Muestra: Agua Producto Agrícola Río: _____

Muestra tomada en (lugar): San Antonio de Debades

Temperatura: Medio Ambiente 19°C Agua _____ (sólo para agua)

PH: _____ (sólo para agua)

Observación:

Presencia de animales en los cultivos:

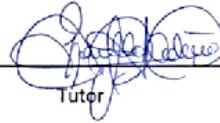
Viviendas colindantes:

Otra fuente que se considere contaminación: _____ Cuál: _____

Realizado por:



Estudiante



Tutor

FICHA DE OBSERVACIÓN DE LA TOMA DE MUESTRA

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: 2.3.1.

Nombre del estudiante: María Guadalupe Guzmán Chabela

Fecha: 7-07-2019

Muestra: Agua Producto Agrícola Río: _____

Muestra tomada en (lugar): Licto

Temperatura: Medio Ambiente 30°C 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:



Estudiante



Tutor

FICHA DE OBSERVACIÓN DE LA TOMA DE MUESTRA

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: 232

Nombre del estudiante: Maná Guadalupe Guzmán Chabela

Fecha: 7-01-2019

Muestra: Agua Producto Agrícola Río: _____

Muestra tomada en (lugar): Lido

Temperatura: Medio Ambiente 20°C 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:



Estudiante



Tutor

FICHA DE OBSERVACIÓN DE LA TOMA DE MUESTRA

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: 241.

Nombre del estudiante: María Guadalupe Guzmán Chelero

Fecha: 7-07-2017

Muestra: Agua Producto Agrícola Río: _____

Muestra tomada en (lugar): Cebadas

Temperatura: Medio Ambiente 20°C Agua _____ (sólo para agua)

PH: _____ (sólo para agua)

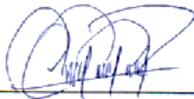
Observación:

Presencia de animales en los cultivos:

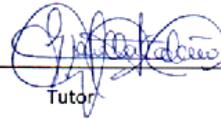
Viviendas colindantes:

Otra fuente que se considere contaminación: _____ Cuál: _____

Realizado por:



Estudiante



Tutor

FICHA DE OBSERVACIÓN DE LA TOMA DE MUESTRA

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: 2.42

Nombre del estudiante: María Beatriz Guzmán Cheble

Fecha: 1.01.2019

Muestra: Agua Producto Agrícola Río: _____

Muestra tomada en (lugar): Cebadas

Temperatura: Medio Ambiente 20°C Agua _____ (sólo para agua)

PH: _____ (sólo para agua)

Observación:

Presencia de animales en los cultivos:

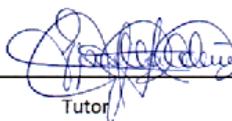
Viviendas colindantes:

Otra fuente que se considere contaminación: _____ Cuál: _____

Realizado por:



Estudiante



Tutor

FICHA DE OBSERVACIÓN DE LA TOMA DE MUESTRA

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: ^{PA 2019 18011/144}
251 ₂₁₋₁₁₋₁₉

Nombre del estudiante: María Guadalupe Escamán Challa

Fecha: 7.04.2019

Muestra: Agua Producto Agrícola Río: _____

Muestra tomada en (lugar): Penipe

Temperatura: Medio Ambiente 19°C 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:



Estudiante



Tutor

FICHA DE OBSERVACIÓN DE LA TOMA DE MUESTRA

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: 2.5.2.

Nombre del estudiante: Maía Guadalupe Guaman Cabello

Fecha: 7.01.2014

Muestra: Agua Producto Agrícola Río: _____

Muestra tomada en (lugar): Penipe

Temperatura: Medio Ambiente 17°C Agua _____ (sólo para agua)

PH: _____ (sólo para agua)

Observación:

Presencia de animales en los cultivos: _____

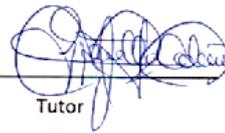
Viviendas colindantes:

Otra fuente que se considere contaminación: _____ Cuál: _____

Realizado por:



Estudiante



Tutor

FICHA DE OBSERVACIÓN DE LA TOMA DE MUESTRA

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: 2.6.1.

Nombre del estudiante: María Guadalupe Escamán Chabela

Fecha: 2-04-2019

Muestra: Agua Producto Agrícola Río: _____

Muestra tomada en (lugar): Cobjitús

Temperatura: Medio Ambiente 19°C 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:



Estudiante



Tutor

FICHA DE OBSERVACIÓN DE LA TOMA DE MUESTRA

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: 3.6.2.

Nombre del estudiante: Meiná Guadalupe Guzmán Chables

Fecha: 3-03-2019

Muestra: Agua Producto Agrícola Río: _____

Muestra tomada en (lugar): Deposito

Temperatura: Medio Ambiente 19°C Agua _____ (sólo para agua)

PH: _____ (sólo para agua)

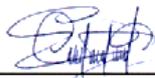
Observación:

Presencia de animales en los cultivos:

Viviendas colindantes: _____

Otra fuente que se considere contaminación: _____ Cuál: _____

Realizado por:



Estudiante



Tutor

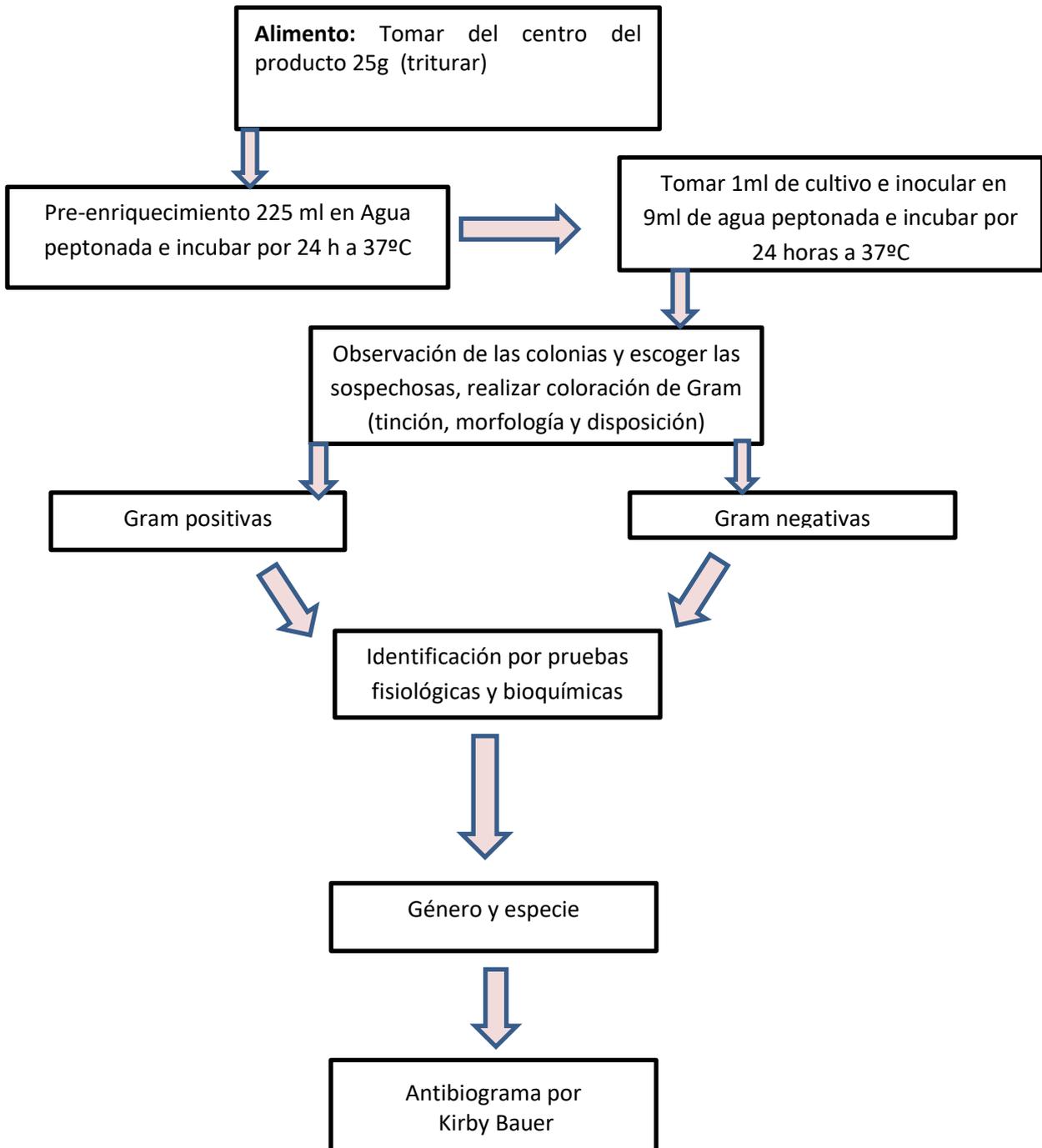
Anexo N° 3. Protocolo para trabajar con productos agrícolas recolectados de la cuenca de río Chambo.

PROTOCOLOS PARA TRABAJAR

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”

Toma de muestra de los productos agrícolas en las cercanías (500m a 1Km) de los puntos de muestras de las aguas del río Chambo.

Recolectar en bolsas estériles los productos agrícolas.



Fuente: Cordovéz M. 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. UNACH

Anexo N° 4. Muestras analizadas, con 14 cepas aisladas y 6 bacterias patógenas identificadas.

LUGAR	N°	CÓDIGO	ALTITUD (m)	T.A. °C	PRODUCTO AGRICOLA	GÉNERO	ESPECIE
Chambo	#1	2.1.1	2569	21°C	Remolacha	<i>Enterobacter</i>	<i>Cloacae</i>
		2.1.2	2569	21°C	Remolacha	<i>Enterobacter</i>	<i>Cloacae</i>
		2.1.2	2569	21°C	Remolacha	<i>Enterococcus</i>	<i>Faecalis</i>
S. A Cebadas	#2	2.2.1	2979	19°C	Lechuga	<i>Citrobacter</i>	<i>amalonaticus</i>
		2.2.2	2979	19°C	Lechuga	<i>Proteus</i>	<i>Vulgaris</i>
Licto	#3	2.3.1	2730	20°C	Zanahoria	<i>Citrobacter</i>	<i>Freundii</i>
		2.3.2	2730	20°C	Zanahoria	<i>Citrobacter</i>	<i>Freundii</i>
Cebadas	#4	2.4.1	2907	20°C	Frutilla	<i>Enterococcus</i>	<i>Faecalis</i>
		2.4.2	2907	20°C	Frutilla	<i>Proteus</i>	<i>Vulgaris</i>
Penipe	#5	2.5.1	2361	19°C	Papas	<i>Citrobacter</i>	<i>Freundii</i>
		2.5.2	2361	19°C	Papas	<i>Citrobacter</i>	<i>Freundii</i>
Cubijíes	#6	2.6.1	2479	19°C	Ocas	<i>Klebsiella</i>	<i>Oxytoca</i>
		2.6.2	2479	19°C	Ocas	<i>Enterobacter</i>	<i>Cloacae</i>
		2.6.2	2479	19°C	Ocas	<i>Klebsiella</i>	<i>Oxytoca</i>

Fuente: Guamán M, Aislamiento de bacterias patógenas al humano en cultivos agrícolas de la cuenca del río Chambo. UNACH

Anexo N° 5: Resultados de las pruebas fisiológicas realizadas en la identificación de Bacterias Gram positivas.

N°	Microorganismos	CAT	BE
1	<i>Enterococcus faecium</i> (Cepa 1)	-	+
2	<i>Enterococcus faecium</i> (Cepa 2)	-	+

CAT: catalasa; BE: Bilis esculina.

Elaborado por: Guamán María.

Anexo N° 6: Resultados del antibiograma realiza a las bacterias gramnegativas de interés clínico conjuntamente con su interpretación según la guía de internacional CLSI.

N°	Microorganismos	CN		K		CT		TE		CIP		AN		AMC		CTX	
		Mm	Int	mm	Int	mm	Int	Mm	Int	Mm	Int	Mm	Int	Mm	Int	mm	Int
1	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	13	I	10	R	14	S	26	S	25	S	19	S	-	-	-	-
2	<i>Citrobacter freundii</i> (Cepa 1)	15	S	16	I	13	S	22	S	27	S	23	S	-	-	-	-
3	<i>Citrobacter freundii</i> (Cepa 2)	19	S	20	S	14	S	24	S	27	S	21	S	-	-	-	-
4	<i>Enterobacter cloacae</i> (Cepa 1)	14	I	11	R	14	S	22	S	26	S	21	S	-	-	-	-
5	<i>Enterobacter cloacae</i> (Cepa 2)	17	S	17	I	0	R	14	I	30	S	24	S	-	-	-	-
6	<i>Klebsiella oxytoca</i>	16	S	16	I	14	S	26	S	29	S	22	S	16	I	25	I
7	<i>Proteus vulgaris</i> (Cepa 1)	14	I	14	I	13	S	21	S	25	S	20	S	-	-	-	-
8	<i>Proteus vulgaris</i> (Cepa 2)	15	S	17	I	14	S	21	S	30	S	21	S	-	-	-	-

CN: gentamicina de alta carga; K: kanamicina; CT: colistin; TE: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; AN: ácido nalidixico. AMC: amoxicilina/ácido, clavulánico; CTX: Cefotaxima.

N°	Microorganismos	SXT		CRO		CAZ		IMP		ATM		AX		FOX	
		Mm	Int	Mm	Int	mm	Int								
1	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	23	S	33	S	24	S	22	S	30	S	0	R	19	S
2	<i>Citrobacter freundii</i> (Cepa 1)	23	S	27	S	21	R	22	R	28	S	0	R	-	-
3	<i>Citrobacter freundii</i> (Cepa 2)	21	I	25	R	24	I	22	S	27	R	0	S	-	-
4	<i>Enterobacter cloacae</i> (Cepa 1)	24	S	27	S	27	R	22	R	30	S	0	R	0	R
5	<i>Enterobacter cloacae</i> (Cepa 2)	21	S	29	S	26	S	28	S	33	S	23	S	21	S
6	<i>Klebsiella oxytoca</i>	25	S	29	S	27	S	27	S	30	S	11	R	29	S
7	<i>Proteus vulgaris</i> (Cepa 1)	22	S	25	S	22	R	20	R	27	S	0	R	-	-
8	<i>Proteus vulgaris</i> (Cepa 2)	19	S	31	S	26	S	19	S	30	S	0	R	-	-

SXT: sulfá trimetropin; CRO: ceftriaxone; CAZ: ceftazidime; IMP: imipenem; ATM: aztreonam. AZM: azitromicina; AX: amoxicilina; FOX: cefoxitin;

Elaborado por: Guamán María.

Anexo N° 7: Resultados del Antibiograma diámetro de los halos formados Bacteria Gram positiva realizado a *Enterococcus faecium*. e Interpretación de acuerdo a la guía Internacional CLSI.

N°	Microorganismos	CN		K		TE		CIP		VA		AX		P	
		mm	Int	Mm	Int	mm	Int	Mm	Int	Mm	Int	Mm	Int	mm	Int
1	<i>Enterococcus faecium</i> (Cepa 1)	10	I	14	I	26	S	16	I	18	S	30	S	25	S
2	<i>Enterococcus faecium</i> (Cepa 2)	16	S	16	I	30	S	21	S	5	R	17	S	0	R

CN: gentamicina de alta carga; K: kanamicina; TE: tetraciclina; CIP: ciprofloxacina; VA: vancomicina; AX: amoxicilina; P: penicilina.

Elaborado por: Guamán M.

Anexo N° 8. Interpretación del diámetro de la zona de inhibición por el método de difusión para Enterobacteriaceae y Enterococcaceae. (Adaptado del CLSI)

Tabla 2'. Interpretación del diámetro de la zona de inhibición por el método de difusión para: Enterobacteriaceae (Adaptado del CLSI, tabla 2 A. Disk Diffusion 2019)

Condiciones para la prueba: Medio: Mueller-Hinton Agar Incubación: 35 ±2°C. 16-18 horas	Control de Calidad: Escherichia coli ATCC 25922 Escherichia coli ATCC 35218 (betalactamasas)
--	---

Antimicrobiano	Símbolo	Contenido del disco (µg)	Diámetro en mm		
			S	I	R
Ampicilina	AMP	10	≥ 17	14 -16	≤ 13
Piperacilina	PIP	100	≥ 21	18 -20	≤ 17
Amoxicilina/Ac. Clav	AMC	20/10	≥ 18	14 -17	≤ 13
Ampicilina/Sulbactam	AMS	10/10	≥ 15	12 -14	≤ 11
Piperacilina/Tazobactam	PTZ	100/10	≥ 21	18 -20	≤ 17
Cefazolina	KZ	30	≥ 23	20 -22	≤ 19
Cefalotina	CF	30	≥ 18	15 -17	≤ 14
Cefepime	FEP	30	≥ 18	15 -17	≤ 14
Cefoxitina	FOX	30	≥ 18	15 -17	≤ 14
Cefotaxima o Ceftriaxona	CTX	30	≥ 26	23 -25	≤ 22
Ceftazidima	CRO	30	≥ 23	20 -22	≤ 19
Ceftazidima	CAZ	30	≥ 21	18 -20	≤ 17
Cefuroxime	CXM	30	≥ 18	15 -17	≤ 14
Aztreonam	ATM	30	≥ 21	18 -20	≤ 17
Imipenem	IMP	10	≥ 23	20 -22	≤ 19
Meropenem	M	10	≥ 23	20 -22	≤ 19
Gentamicina	GN	10	≥ 15	13 -14	≤ 12
Amikacina	AK	30	≥ 17	15 -16	≤ 14
Kanamicina	K	30	≥ 18	14 -17	≤ 13
Ciprofloxacina	CIP	5	≥ 26	22 -25	≤ 21
Levofloxacina	LEV	5	≥ 22	15 -21	≤ 14
Norfloxacina	NOR	10	≥ 17	13 -16	≤ 12
Ac. Nalidixico	NA	30	≥ 19	14 -18	≤ 13
Trimetoprim-Sulfametoxazol	SXT	1.25 /23.75	≥ 16	11 -15	≤ 10
Cloranfenicol	C	30	≥ 18	13 -17	≤ 12
Nitrofurantoina	F	300	≥ 17	15 -16	≤ 14
Fosfomicina	FOS	200	≥ 16	13 -15	≤ 12
Tetraciclina	TE		≥ 15	12 -14	≤ 11

Agrobacterium

≥ 13 — ≤ 12

Agrobacterium - con 1.25 mg de Ac. Nalidixico

Fuente: Hindler J, Schuetz A. CLSI Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Rev. CLSI. [Internet]. [citado 10 de sep de 2019]; 4(1). Disponible en: https://clsi.org/media/2270/clsi_astnewsupdate_june2018_final.pdf

- Tabla 2D. Interpretación del diámetro de la zona de inhibición por el método de difusión para: *Enterococcus* spp. (Adaptado del CLSI, Tabla 2D – M2- Disk Diffusion 2019).

Condiciones para la prueba:
 Medio: Mueller-Hinton Agar
 Incubación: 35 ±°C. 16-18 horas
 24 horas para Vancomicina
 Vancomicina—24 horas

Control de Calidad:
Staphylococcus aureus ATCC 25923

Antimicrobiano		Contenido del disco (ug)	Diámetro en mm		
			S	I	R
Penicilina	P	10 unidades	≥ 15	-	≤ 14
Ampicilina	AMP	10	≥ 17	-	≤ 16
Vancomicina	VA	30	≥ 17	15-16	≤ 14
Eritromicina	E	15	≥ 23	14-22	≤ 13
Tetraciclina	TE	30	≥ 19	15-18	≤ 14
Doxiciclina	DOC	30	≥ 16	13-15	≤ 12
Miniciclina	MC	30	≥ 19	15-18	≤ 14
Ciprofloxacina	CIP	5	≥ 21	16-20	≤ 15
Levofloxacina	LEV	5	≥ 17	14-16	≤ 13
Norfloxacina	NOR	10	≥ 17	13-16	≤ 12
Nitrofurantoina	F	300	≥ 17	15-16	≤ 14
Fosfocina	FOS	200	≥ 16	13-15	≤ 12
Cloranfenicol	CL	30	≥ 18	13-17	≤ 12

Revisado
 OK

Fuente: Hindler J, Schuetz A. CLSI Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Rev. CLSI. [Internet]. [citado 10 de sep de 2019]; 4(1). Disponible en: https://clsi.org/media/2270/clsi_astnewsupdate_june2018_final.pdf

Anexo N° 9. Evidencias fotográficas.



Imagen N° 6: Recolección de remolacha, punto de muestreo Chambo.

Fuente: Guamán M, Aislamiento de bacterias patógenas al humano en cultivos agrícolas de la cuenca del río Chambo. UNACH



Imagen N° 7: Recolección de lechuga, punto de muestreo San Antonio de Cebadas.

Fuente: Guamán M, Aislamiento de bacterias patógenas al humano en cultivos agrícolas de la cuenca del río Chambo. UNACH



Imagen N° 8: Recolección de zanahoria, punto de muestreo Licto.

Fuente: Guamán M, Aislamiento de bacterias patógenas al humano en cultivos agrícolas de la cuenca del río Chambo. UNACH



Imagen N° 9: Recolección de frutilla, punto de muestreo Cebadas.

Fuente: Guamán M, Aislamiento de bacterias patógenas al humano en cultivos agrícolas de la cuenca del río Chambo. UNACH



Imagen N° 10: Recolección de papa, punto de muestreo Penipe.

Fuente: Guamán M, Aislamiento de bacterias patógenas al humano en cultivos agrícolas de la cuenca del río Chambo. UNACH



Imagen N° 11: Recolección de ocas, punto de muestreo Cubijies.

Fuente: Guamán M, Aislamiento de bacterias patógenas al humano en cultivos agrícolas de la cuenca del río Chambo. UNACH

A**B****C****D**

Imagen N° 12: Pre-enriquecimiento de los productos agrícolas para obtención de bacterias. **A)** Preparación de agua peptonada. **B)** Incubación a 24 horas, 37°C, en agua peptonada los vegetales. **C)** Trasvase de agua peptonada a tubos de ensayo estériles. **D)** Trasvase del primer enriquecimiento de productos, a tubos con agua peptonada, incubación 24 horas a 37°C.

Fuente: Guamán M, Aislamiento de bacterias patógenas al humano en cultivos agrícolas de la cuenca del río Chambo. UNACH

A**B**

Imagen N° 13: Técnica de aislamiento de colonias. **A)** Siembra en Agar MacConkey y Sangre. **B)** Incubación a 37°C por 24 horas.

Fuente: Guamán M, Aislamiento de bacterias patógenas al humano en cultivos agrícolas de la cuenca del río Chambo. UNACH

A**B**

Imagen N° 14: Identificación de bacterias mediante batería bioquímica. **A)** Inoculación de cepas bacterianas en la batería bioquímica. **B)** Incubación de bioquímicas a 37°C, por 24 horas.

Fuente: Guamán M, Aislamiento de bacterias patógenas al humano en cultivos agrícolas de la cuenca del río Chambo. UNACH



Imagen N° 15: Interpretación de batería bioquímica. Kliger (K): Determina la fermentación de lactosa, glucosa, productora de gas y H₂S. Ureasa (U): Capacidad de desdoblar la Urea. Citrato(C): Utiliza citrato como fuente de carbono. Malonato (MA): Uso de Malonato como fuente de carbono. Motilidad, Indol y Ornitina (MIO): Motilidad Crecimiento de bacterias, Indol: Presencia de anillo y Ornitina: Actividad enzimática. Lisina Iron Agar (LIA): Diferencia a los microorganismos entéricos sobre la base de su capacidad para formar H₂S.

Fuente: Guamán M, Aislamiento de bacterias patógenas al humano en cultivos agrícolas de la cuenca del río Chambo. UNACH

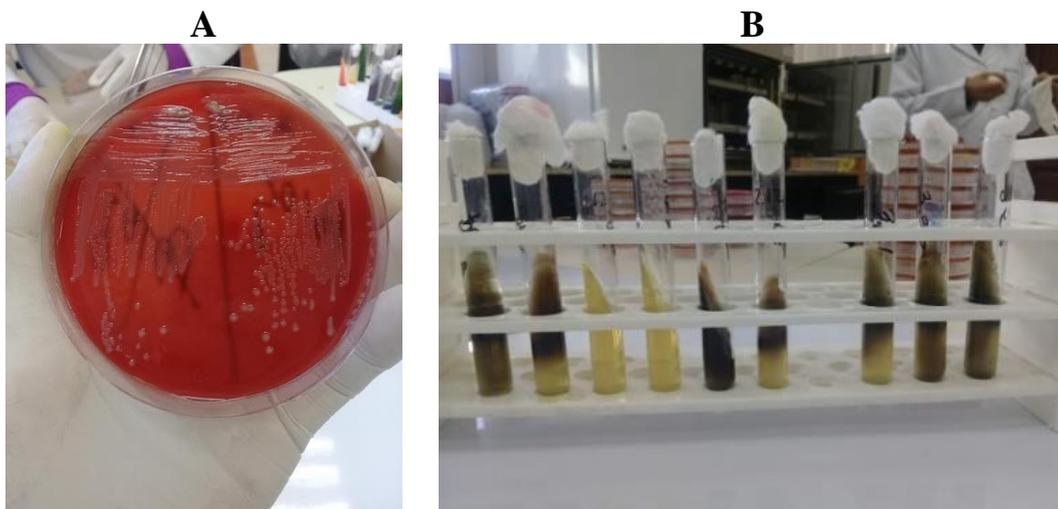


Imagen N° 16: Identificación de *Enterococcus*. **A)** Enterococcus en Agar Sangre, colonias blanquecinas **B)** Empleo del agar bilis esculina específico para Enterococcus..

Fuente: Guamán M, Aislamiento de bacterias patógenas al humano en cultivos agrícolas de la cuenca del río Chambo. UNACH



Imagen N° 17: Antibiograma de cepas aisladas de la familia Enterobacteriaceae y Enterococcaceae

Fuente: Guamán M, Aislamiento de bacterias patógenas al humano en cultivos agrícolas de la cuenca del río Chambo. UNACH

Anexo N° 10: Aprobación del Título del Proyecto de
Investigación.



DECANATO FACULTAD
DE CIENCIAS DE LA SALUD

en movimiento



Riobamba, 14 de mayo de 2019
Oficio No. 0487-RD-FCS-2019

Señorita
GUAMÁN CHABLA MARÍA GUADALUPE
ESTUDIANTE DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD - UNACH
En su despacho. -

De mi consideración:

Cumplo con el deber de informar la resolución de Decanato de fecha: martes 14 de mayo de 2019.

RESOLUCIÓN No. 0487-D-FCS-14-05-2019: Aprobar el tema, perfil y Miembros de Tribunales de la carrera de Laboratorio Clínico (Of. No. 287-CLCH-FCS-2019. Aprobación Comisión de Carrera y CID de la Facultad), de acuerdo al siguiente detalle:

ESTUDIANTES)	TEMA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO	TEMA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN REVISADO Y/O REFORMADO POR LA COMISIÓN Y CID	ÁREA DEL CONOCIMIENTO Y LÍNEA DE INVESTIGACIÓN	TRIBUNAL APROBADO ART. 173 TRABAJO ESCRITO	TRIBUNAL APROBADO ART. 174 SUSTENTACIÓN	INFORME DE LA COMISIÓN DE CARRERA	FECHA DE COHORTE	
							INICIO DE ESTUDIOS	FIN DE ESTUDIOS
Guamán Chabla María Guadalupe	Aislamiento de bacterias patógenas para el hombre en productos agrícolas provenientes de la cuenca del Río Chambo. Abril - Julio 2019	Aislamiento de bacterias patógenas al humano en cultivos agrícolas de la cuenca del río Chambo	Área de conocimiento: Ciencias Línea de investigación: Ciencias de la vida Descripción: Microbiología	TUTOR: PhD. Ana Carolina González Romero TUTORA METODOLÓGICA: MsC. Gisella Cedeño	Presidente: Mgs. Ximena del Rocío Robalino Flores Miembro Mgs. Yisela Carolina Ramos Campi Miembro MsC. Celso Guillermo García Ramírez	APROBADO	Marzo - Agosto 2015	Octubre 2018 - Marzo 2019

Particular que informo para los fines pertinentes.

Atentamente

Dr. Gonzalo Bonilla P.
DECANO DE LA FACULTAD
CIENCIAS DE LA SALUD - UNACH

Adj. Documento de Referencia
C.C.: Archivo

Elaboración de Resoluciones Decanato: 14-05-2019: MsC. Ligia Viteri
Transcripción Resoluciones Decanato: 14-05-2019: Jenny Castelo
Revisado y Aprobado: Dr. Gonzalo Bonilla