



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 Licenciado en Ciencias
de la Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico

TRABAJO DE TITULACIÓN

Detección de bacterias de importancia clínica en el agua del río Guamote, 2019

Autora: Indira Kasandra Tipán Pillajo

Tutora: Lic. Eliana Elizabeth Martínez Durán

Riobamba - Ecuador

2019

Revisión del Tribunal

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: Detección de bacterias de importancia clínica en el agua del río Guamote, 2019; presentado por Indira Kasandra Tipán Pillajo, dirigido por Lic. Eliana Elizabeth Martínez Durán, 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 constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH. Para constancia de lo expuesto firman:

Mgs. Ximena Robalino

Presidente del Tribunal



Mgs. Yisela Ramos Campi

Miembro del Tribunal



MSc. Celio García

Miembro del Tribunal



DECLARACIÓN EXPRESA DE TUTORÍA

Yo, Eliana Elizabeth Martínez Durán docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de tutora del proyecto de investigación con el tema "Detección de bacterias de importancia clínica en el agua del río Guamote, 2019", presentado por la Srta. Indira Kasandra Tipán Pillajo, egresada de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad de Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentra apta para la defensa pública del proyecto. Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad facultando a la interesada en hacer uso del presente para los trámites correspondientes.



Lic. Eliana Elizabeth Martínez Durán

Tutor de proyecto de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

La responsabilidad del contenido del presente proyecto de graduación, nos corresponde exclusivamente a Indira Kasandra Tipán Pillajo y Eliana Elizabeth Martínez Durán. El patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.



Indira Kasandra Tipán Pillajo

060464466-6

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres, hermanos y familiares por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, ya que muchos de mis logros se los debo a ustedes por su inestimable apoyo moral. Y de manera especial a mi querida Universidad Nacional de Chimborazo que me abrió las puertas para alcanzar un logro más en mi vida, con el apoyo incondicional de María del Carmen Cordovéz, Ana Gonzales, Yisela Ramos, y a cada uno de los docentes, amigos que me ayudaron para que la presente investigación sea un éxito.

Indira Tipán

DEDICATORIA

*“Dadle a los seres que amas alas para volar,
raíces para volver y motivos para quedarse”,
Dalai Lama.*

Dedico este trabajo al forjador de mi camino, a mi padre celestial Dios, autor y consumidor de mis anhelos, a la Virgen María Auxiliadora, quien con su manto protector ha guiado mi vida y mis estudios como buena Salesiana.

“Ella lo ha hecho todo”, Don Bosco.

A mis padres Danilo y María por ser los pilares primordiales de mi vida, por enseñarme a luchar por mis sueños, y alentarme día a día a alcanzar nuevas metas, por ser las personas que más amo en el mundo.

Indira Tipán

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS.....	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos	4
CAPÍTULO I. MARCO TEORICO	5
Agua	5
Agua de riego	5
Contaminación del agua de regadío	5
Río Guamote	6
Bacterias con patogenicidad para el hombre transmitido en el agua	7
Enterobacterias	7
<i>Escherichia coli</i> :	7
<i>Klebsiella spp</i> :	8
<i>Salmonella spp. / Shigella spp.</i>	8
<i>Citrobacter spp.</i>	8
<i>Aeromonas spp.</i>	8
<i>Proteus spp.</i>	8
Bacteria no fermentadora	9
<i>Pseudomonas spp.</i>	9
Cocos Gram positivos	9
<i>Enterococcus spp.</i> :.....	9
Bactericida.....	9
Bacteriostático.....	10
Agente antimicrobiano.....	10
Resistente	10
Intermedio	10
Sensible o susceptible	10
Resistencia antimicrobiana.....	11
Resistencia natural o intrínseca	11

Resistencia adquirida extrínseca	11
Tipos de resistencia desarrollada por bacterias frente a los antimicrobianos	11
Bombas de eflujo o expulsión del antibiótico del interior de la célula bacteriana.....	12
Modificación o inactivación del antibiótico mediante enzimas hidrolíticas	12
Bloqueo de la penetración del antibacteriano mediante modificación del sitio activo	12
Alteración o disminución de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana....	13
Biofilmes	13
Sobre-expresión del sitio blanco	13
Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en Gram negativos	13
Resistencia de las betalactamasas tipo AmpC	13
Resistencia a las Quinolonas	14
Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE)	15
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA.....	16
Tipo de Investigación	16
Determinación de la población y muestra	16
Identificación del área de estudio y toma de muestra	17
Procedimiento	17
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
ANEXOS.....	37

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1: Antibiograma: Resistencia a Quinolonas	28
Imagen 2: Antibiograma de <i>Klebsiella oxytoca</i> (Resistencia FOX)	28
Imagen 3: Antibiograma de <i>Klebsiella oxytoca</i> (Resistencia a AMC)	29
Imagen 4: Test de Antibiograma para detección de AmpC (CTX, APB y FOX)	29
Imagen 5: Antibiograma de <i>Citrobacter diversus</i> (AmpC Inducible)	30
Imagen 6. Toma de las muestras en los puntos geográficos: A) Chipó Grande B) Chipó Chico C) Guamote D) Rondador Molino (Chakrawasi) E) Copalillo (Rondan) F) Puente de Guaninche	56
Imagen 7. Medición del pH del agua del río Guamote	72
Imagen 8. Colocación de las muestras en el medio de enriquecimiento Agua Peptonada	72
Imagen 9. Siembra de las muestras en Agar Sangre, Mac Conkey y CLED	73
Imagen 10. A) Resiembra y obtención de cepas más puras. B) Siembra de las cepas puras en la batería bioquímica para su identificación correspondiente.	73
Imagen 11. A) Batería bioquímica utilizada para la identificación bacteriana: Kligler, LIA, SIM, Citrato, Urea.	74
Imagen 12. A) Realización de la dilución de la bacteria según la escala de Mac Farland. B) Inoculación y realización del Antibiograma. C) y D) Observación de resultados del Antibiograma y medición de halos de inhibición de los antibióticos	74

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

Tabla N°1. Descripción de ubicación y altitud en cada estación de muestreo	18
--	----

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Mediciones de temperatura y pH obtenidos de las aguas del río Guamote de acuerdo a cada estación de muestreo.	22
Tabla 2. Bacterias de interés clínico encontradas en las aguas del río Guamote	23
Tabla 3. Distribución de las bacterias de importancia clínica según cada estación de muestreo	24
Tabla 4. Patrón de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de las enterobacteriaceae de bacterias de importancia clínica	26
Tabla 5. Patrón de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de las enterobacteriaceae de bacterias de importancia clínica	27

RESUMEN

La presente investigación se enfocó en determinar bacterias de interés clínico en las aguas del río Guamote, mostrando patógenos causantes de infecciones que podrían conllevar al fallo terapéutico. La contaminación del recurso hídrico el problema que a nivel mundial se ha convertido en el de mayor énfasis, por la proliferación descomunal de bacterias patógenas para el hombre, las mismas que han adquirido resistencia antimicrobiana provocando la ineficacia antibiótica para diversos tipos de enfermedades e infecciones. Se realizó un estudio con un enfoque cualicuantitativo y tipo investigación descriptiva, con un diseño de campo no experimental, y de cohorte transversal, que inició con la recolección de muestras de agua en seis puntos geográficos diferentes, para proceder con la medición de pH, temperatura del ambiente y agua. La identificación bacteriana se realizó con la técnica de Gram mediante la obtención de cepas puras en los agares Sangre, CLED, MacConkey, con su respectiva interpretación de pruebas bioquímicas para clasificar por género y especie a las bacterias previamente aisladas, midiendo por el método Kirby Bauer la susceptibilidad bacteriana e identificando así la presencia de 8 tipos de bacterias de interés clínico: *Aeromonas spp.*, *Enterococcus spp.*, y diversos tipos de Enterobacterias (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter amalonaticus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter diversus*). Llegando a determinar que las bacterias en su mayoría mostraron resistencia a antibióticos como las cefalosporinas de segunda y tercera generación, quinolonas y aminoglucósidos, concluyendo que el Río Guamote muestra una contaminación considerablemente alta de bacterias patógenas resistentes a antibióticos de uso clínico.

Palabras clave: Río Guamote, bacterias, patógenas, resistencia antimicrobiana.

ABSTRACT

The present investigation focused on determining bacteria of clinical interest in the waters of the Guamote River, showing pathogens causing infections that could involve therapeutic failure. The contamination the water resource is the problem that worldwide has become the most significant emphasis, due to the enormous proliferation of pathogenic bacteria for man, which have acquired antimicrobial resistance causing antibiotic inefficiency for various types of diseases and infections. A study was conducted with a qualitative approach and descriptive research type, with a non-experimental field design, and a transversal cohort, which occurred with the collection of water samples at six different geographical points, to proceed with the measurement of pH, the temperature of the environment and water. Bacterial identification was performed using the Gram technique by obtaining pure strains in the Blood, CLED, MacConkey agars, with their respective interpretation of biochemical tests to classify the bacteria previously affected by gender and species, measured by the Kirby Bauer method the bacterial susceptibility and thus identifying the presence of 8 types of bacteria of clinical interest: *Aeromonas spp.*, *Enterococcus spp.*, and various kinds of Enterobacteria (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter amalonaticus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter diversus*). Determining most bacterias demonstrate resistance to antibiotics such as second and third-generation cephalosporins, quinolones, and aminoglycosides, concluding that the Guamote River shows massive contamination of pathogenic bacteria resistant to antibiotics for clinical use.

Keywords: Guamote River, bacteria, pathogens, antimicrobial resistance.




Reviewed by: Marcela González R.
English Professor

INTRODUCCIÓN

A nivel de la superficie terrestre la sustancia que más abunda en su estado líquido en un 71% es el agua, la cual se le puede encontrar tanto dulce en un 2% como salada en un 98% y en sus diferentes estados como son: sólido a nivel de glaciares y nevados, líquida en océanos, lagos, lagunas, ríos, entre otros, y gaseosa en forma de vapor y nubes¹. El agua potable dulce existente aproximadamente es del 2.5 -2.75%, dentro del cual sólo el 0.01% del total corresponde al agua que recorre la superficie terrestre, a este nivel se localiza en mares, lagos, y en la atmósfera².

La contaminación de aguas superficiales en los continentes del África, Asia y América Latina ha mostrado un claro impacto a nivel de la salud mundial; entre las principales causas está el crecimiento de la población, el aumento de las actividades económicas, la expansión e intensificación de actividades agrícolas³, aumentando la cantidad de aguas negras o residuales sin un adecuado tratamiento y cuyo resultado es muy alarmante, siendo el origen de múltiples enfermedades, teniendo en cuenta que el agua de buena calidad es esencial para la vida y el desarrollo de la misma.

Actualmente en el Ecuador se han realizado diferentes estudios de tipo bacteriológico en fuentes hídricas superficiales determinando el nivel de calidad del agua y patogenicidad de las bacterias que afectan clínicamente al ser humano; en la provincia de Pichincha destaca el estudio del manantial termal realizado por Naranjo⁴ en 2015 y a nivel de la provincia de Chimborazo en estudios recientes los ríos Chibunga y Chambo realizados por Mur⁵ y Orozco⁶ respectivamente, encontrándose bacterias patógenas Gram negativos en un 92,30% y Gram positivos en un 7.7%; con resistencia antimicrobiana de interés clínico que son causantes de infecciones importantes para el hombre^{5,6}.

A partir del río Guamote se origina el afluente río Chambo el cual recibe las descargas de las aguas residuales de industrias, hospitales y viviendas que producen 300.000 habitantes de los diferentes cantones de la provincia de Chimborazo, según lo indica el estudio realizado por el Centro de Estudios y Acción Social (CEAS)⁷.

Según la Ley Orgánica de Salud, en el capítulo II correspondiente a los derechos comunes, infecciosos, especiales y de las radiaciones ionizantes y no ionizantes, en el

Art. 104 se establece que *“Todo establecimiento industrial, comercial o de servicios, tiene la obligación de instalar sistemas de tratamiento de aguas contaminadas y de residuos tóxicos que se produzcan por efecto de sus actividades”*⁸. Por tanto se instituye fundamentalmente la conservación, preservación y mantenimiento del recurso hídrico en los diferentes ecosistemas de toda contaminación, restaurando y recuperando a los mismos de desequilibrios producidos por la erosión del suelo y contaminación de las aguas.

El acceso al agua potable disminuye en gran medida el hecho de la expansión de numerosas enfermedades de tipo infeccioso para el ser humano. Se estima que aproximadamente el 70% del agua dulce se destina a la agricultura⁹. En muchos de los casos los caudales de los ríos provienen de fuentes contaminadas o contienen elementos artificiales químicos que provocan la proliferación de bacterias atentando drásticamente la salud de las personas que colindan con el lugar.

La mayoría de las bacterias se desarrollan mejor a un pH neutro o cercano a él, por lo que al encontrarse en un medio acuático contribuye a su proliferación, además otro factor que influye es el ambiental que interviene de forma extrínseco refiriéndonos a la temperatura ya que afecta el desarrollo de los microorganismos siendo capaces de proliferar a diferentes intervalos, desde -8° a + 90°C (17.6 a 194°F), aunque la temperatura óptima para casi todos los patógenos es de 35°C (95°F), como se indica en el artículo presentado según la Organización Panamericana de Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS)¹⁰ sobre los Peligros biológicos.

En el artículo presentado en la OMS¹⁰ sobre el agua y la salud se indica que el principal factor relacionado con la transmisión de diferentes enfermedades como el caso del cólera, disentería, hepatitis A, fiebre tifoidea y poliomiелitis, se debe fundamentalmente al agua contaminada, saneamiento e higiene deficiente, estimando a nivel mundial que 1.5 millones de personas fallecen anualmente por enfermedades diarreicas, considerando la tercera causa de muerte infantil a las enfermedades diarreicas sobre todo en países más pobres.

A nivel del Ecuador se calcula que el 20,7% de la mayoría del agua contaminada presenta a la bacteria patógena *E. coli* según datos de porcentaje del INEC, además la prevalencia de diarrea aguda en niños menores de 5 años es del 21,7%, según la

encuesta Demográfica de Salud¹¹. La pérdida de eficacia de los antibióticos ha provocado drásticamente un incremento notable de infecciones como es el caso de la neumonía, tuberculosis, septicemia, gonorrea o enfermedades de transmisión alimentaria, cada vez son más difíciles y hasta cierto punto imposibles de tratar, se considera que en la actualidad el mundo se encuentra allegado a una era post-antibióticos en el que muchas infecciones y lesiones de bajo grado volverán a convertirse en potencialmente mortales¹².

Por tanto, se debe tomar en cuenta que las bacterias tienden a adaptarse y se comportan como miembros de un ecosistema en el que se encuentren, aquellas bacterias que en el tratamiento tienden a generar resistencia a más de un antibiótico se les denomina como organismos resistentes a múltiples medicamentos (MDRO por sus siglas en inglés), afectando a niños y adultos saludables¹³. Teniendo en cuenta un panorama de la resistencia bacteriana a antibióticos se puede decir que las bacterias con potencialidad patogénica se liberan constantemente en las aguas, la mayoría albergando genes de resistencia antibiótica con el fin de propagarse entre las comunidades bacterianas.

El mismo que se puede considerar como un proceso normal conservado evolutivamente a la resistencia bacteriana que se genera, con el fin de contribuir a la adaptación de las mismas, teniendo acceso a un gran grupo de genes que se extienden a través de las poblaciones bacterianas en elementos genéticos móviles como los plásmidos y traspones¹⁴.

Con el propósito de investigar y prevenir infecciones en la población colindante al sector del caudal del río Guamote, se estableció el presente proyecto de investigación que está estructurado por tres capítulos, además del apéndice, bibliografía y anexos, en el capítulo I se encuentra el estado del arte o marco teórico relacionado al tema en estudio, en el capítulo II la metodología de la investigación, detallando el tipo de investigación usada, y el capítulo III el análisis y discusión de los resultados obtenidos en dicha investigación, de esta manera se detalla la contaminación existente, detectando las bacterias de importancia clínica en el mismo, y posteriormente comunicando a las autoridades competentes con el fin de establecer medidas preventivas con respecto a esta problemática actual, mejorando la calidad del recurso hídrico destinado a las actividades humanas y producción agrícola-ganadera.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar bacterias de importancia clínica en el agua del río Guamote durante el periodo de abril a julio del 2019.

Objetivos específicos

Determinar valores de pH, temperatura de agua y del ambiente de los sectores agrícolas en seis diferentes puntos geográficos del río Guamote.

Clasificar por especie con protocolos microbiológicos las bacterias de interés clínico presentes en el río en estudio.

Determinar la resistencia antibiótica de las bacterias patógenas identificadas mediante el método por difusión Kirby- Bauer.

CAPÍTULO I.

MARCO TEORICO

Agua

El agua es considerada como el elemento más importante y vital para que se origine la vida. Constituida por dos moléculas de hidrógeno y una de oxígeno. Se halla a nivel de la superficie terrestre en su estado líquido en un 71%, tanto dulce en ríos lagos, lagunas, etc., como salada en océanos y mares, en estado sólido encontrada en glaciares-nevados, y gaseosa en forma de vapor y nubes, dentro de los límites de temperatura y presión naturales en la tierra. Aproximadamente el 2.5-2.75% es considerada como agua potable, y tan solo el 0.01% se encuentra a nivel de lagos, pantanos y ríos, según indica Fernández^{1,2}.

Agua de riego

Principalmente en las poblaciones rurales el agua usada para el riego es la proporcionada por ríos, o lagos aledaños a los cultivos. Siendo el riego considerado como aquella técnica que utiliza diferentes bases hidráulicas por medio de tuberías y acequias, por distintos procedimientos o métodos de riego por creación de surcos, sumersión, aspersion, por goteo o riego localizado con el fin de suministrar las necesarias cantidades de agua en los cultivos, para satisfacer aquellas necesidades que no fueron cubiertos mediante la precipitación incrementando la actividad agrícola¹⁵.

Contaminación del agua de regadío

Desde el punto de vista sanitario como un factor fundamental se establece condiciones de tipo bacteriológicas del agua bajo normas de calidad, se considera como agua potable a aquella que no poseen contaminantes a nivel físico, químico, bacteriológico y que no deba representar un peligro para el consumidor y el entorno. Debido a que si se presentasen conllevarían a desencadenar una serie de invasiones y afecciones clínicas para el ser humano, siendo un indicador clave del agua de mala calidad¹⁶.

Según estudios anteriores lanzados por el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) a nivel mundial en los principales ríos de África, Asia y América

Latina entre los años de 1990 y 2010 se ha evidenciado un aumento de la contaminación hídrica en ríos, teniendo en cuenta que entre los factores que influyen para dicho aumento se encuentra el crecimiento poblacional, además de las actividades económicas, la expansión agrícola especialmente por las grandes transnacionales dejando un índice elevado de aguas negras sin tratar, especialmente dejando en los poblados pobres de las zonas rurales de los países, debido a que ellos son los consumidores directos del agua de ríos o lagos³.

En el tema de calidad del agua el Ecuador tiene una deuda muy alta en cuanto a los esfuerzos realizados para la mejora de dicho recurso, en referencia a la contaminación que se presenta como producto de actividades industriales, domésticas, agropecuarias.

En Ecuador se presentan porcentajes estadísticos del recurso hídrico, siendo en el caso de agua de buena calidad en un 79,3% y de agua contaminada de un 20,7%, según datos del INEC¹⁷ de los cuales se considera que el 5,7% de la población rural está a expensa de la insalubridad de ríos por desfogue inadecuado de excretas a través del mismo tanto directa como indirectamente en el caso de letrinas y pozos sépticos mal controlados.

Esto en relación a la contaminación existente de los cuatro principales ríos ecuatorianos que son el Machángara, Guayllabamba, Esmeraldas y Guayas y considerando algunos de los tramos de dichos ríos como biológicamente muertos.

Río Guamote

El Río Guamote, se localiza al centro de la región interandina del Ecuador en la provincia de Chimborazo perteneciente al cantón Guamote con una latitud de -1.8 y una longitud de 78.6167, el caudal se forma a partir del desaguadero subterráneo de la laguna de Colta, fluyendo hacia el sur inicialmente a nivel de páramos de la cordillera Occidental y los cerros Yaruquíes, encontrándose con las aguas de los ríos Columbe y Pulicante, las cuales vienen del nudo de Tiocajas pasando por Cebadas para formar finalmente el río Chambo¹⁸.

El río Guamote es considerado a nivel de la provincia de Chimborazo como uno de los ríos que presenta más contaminación debido a las constantes descargas de las aguas residuales de diferentes tipos de empresas de industria, hospitales, viviendas producidos por más de 300.000 habitantes de poblados aledaños al río⁷.

De acuerdo con el estudio realizado por Borchardt³ cerca de 323 millones de personas presentan riesgo de contraer diferentes enfermedades como: cólera, fiebre tifoidea, hepatitis, polio o diarrea, de los cuales 25 millones se encuentran en América Latina, por agentes patógenos, y orgánicos que disminuyen el oxígeno del caudal y afectan uno de cada siete kilómetros de los ríos.

Bacterias con patogenicidad para el hombre transmitido en el agua

A nivel de las aguas naturales superficiales se pueden encontrar variabilidad microbiológica abarcando diferentes tipos de células procariotas en el caso de bacterias, algas, protozoarios y hongos en el caso de eucariotas, debido a que el agua de tipo superficial, especialmente de los caudales como fuente principal de transmisión de enfermedades diarreicas.

Al enfocarse en las bacterias o microorganismos como bioindicadores de calidad del agua para el consumo humano encontrados en estudios anteriores podemos encontrar generalmente en agua bacterias de la flora saprofitica, Kenneth J., et al¹⁹ intestinal entre las que se encuentran *Bacteroides fragilis*, bacterias mesófilas, coliformes totales y fecales (termotolerantes), *Escherichia coli* y estreptococos fecales.

Enterobacterias

Constituyen una gran cantidad de bacterias de vida libre como de la flora normal del ser humano y animales, vistos a través del microscopio presentan una morfología de cocobacilos grandes o bacilos alongados, filamentosos gramnegativos, no formadores de esporas, fermentan glucosa, reducen los nitratos a nitritos y son oxidasa negativa.

Capaces de crecer con rapidez en condiciones aerobias o anaerobias, y tienen actividad metabólica, son los principales causantes de las infecciones del tracto urinario (ITU) y disentería²⁰. Entre las Enterobacterias se encuentran:

Escherichia coli: habitualmente se halla en la microbiota del tracto gastrointestinal siendo el comensal más abundante, sus colonias en agar MacConkey son rosas, opacas, circulares de 2-4mm de diámetro, convexas de bordes enteros, en agar EMB forman colonias negras verde metálico opacas, brillantes oxidasa negativo, catalasa positivo,

lactosa positiva, pruebas de indol positivo, lisina descarboxilasa, produce gas a partir de la glucosa positiva, es capaz de producir ITU, gastroenteritis, meningitis, sepsis, etc^{19,20}.

Klebsiella spp.: Patógeno frecuente para el hombre, capaz de producir neumonía como en el caso de *Klebsiella pneumoniae*, suele ocasionar infecciones del tracto urinario, infecciones en tracto digestivo y colitis (*Klebsiella oxytoca*) septicemia e infecciones de tejidos blandos posee una prominente cápsula de polisacáridos, en agar MacConkey sus colonias son de color rosado, en Kligger o TSI fermentan lactosa y producen gas, lisina descarboxilasa y citrato positivo, prueba de Voges Proskauer²⁰ es positivo.

Salmonella spp.* / *Shigella spp.: Bacilos móviles con flagelos peritricos, encontrado a nivel intestinal de cualquier tipo de animal homeotermo es decir que mantiene la temperatura corporal dentro de sus límites, la bacteria no desarrolla cápsula (excepto *Salmonella typhi*).

Además, presenta un metabolismo oxidativo y fermentativo producen ácido sulfhídrico (H₂S), glucosa positiva, lactosa negativa, urea negativa, descrito así por Pedraza, Pereira, Soto, Hernández, Villareal²¹ para su correcto aislamiento microbiológico de *Salmonella spp*²¹.

Citrobacter spp. A nivel de la bioquímica y serología es similar a *Salmonella*, se encuentra presente en la flora intestinal normal y a nivel del ambiente, muy ocasionalmente es fuente de infecciones de tipo oportunista, en el caso de *C. freundii* se encuentra coligado a la meningitis neonatal y absceso cerebral¹⁹.

Aeromonas spp. Bacilo móvil, ubicuo que fácilmente es encontrado a nivel del agua, del suelo, ambiente, en artrópodos, mamíferos, moluscos, aves, peces e insectos. De fácil crecimiento en agares microbiológicos,

Pueden ocasionar infecciones de tipo oral, cutánea, por consumo de agua y alimentos contaminados o por estar en contacto con mascotas, aves o animales silvestres, pueden tener afectaciones hepatobiliares, cáncer, neutropenia, sepsis, bacteriemia, entre otros²².

Proteus spp.: Patógeno de tipo oportunista encontrado en la microflora intestinal normal, los referentes más importantes son el *Proteus mirabilis* y *Proteus vulgaris*, que poseen la capacidad de esparcirse en medios de cultivo formando una especie de capa

que impide permanecer en colonias aisladas, siendo una de las características que mejora su identificación en el laboratorio²³.

Bacteria no fermentadora

Pseudomonas spp.: Bacilo oportunista que crece con rapidez en medios de cultivo y las colonias se caracterizan por la producción de piocianina, toxina característica para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*, siendo esta la bacteria con más resistencia a antibióticos, capaz de provocar bacteriemia, artritis, abscesos, heridas, conjuntivitis e infecciones de vías urinarias¹⁸.

Dentro de este grupo el más importante es *Pseudomonas aeruginosa* crece con rapidez en medios de cultivo, es productor de pigmentos, resistentes a muchos antimicrobianos, sus colonias tienen un borde fino, con un brillo metálico característico, con un olor afrutado, en agar sangre es capaz de producir hemólisis y es oxidasa positiva, produce bronquitis, neumonía, sinusitis, otitis externa difusa aguada o también llamada “otitis del nadador”²⁰.

Cocos Gram positivos

Enterococcus spp.: Son cocos Gram positivos que se presentan en cadenas o parejas. Forman parte de la microflora intestinal normal, por lo general no presentan hemólisis, aunque en ocasiones presentan una α -hemólisis.

Tienen la facultad de crecer a temperaturas entre 10 y 45°C, en presencia de bilis e hidrolizan la esculina. Existen al menos 12 de cepas, la principal causante de infecciones enterocócicas de entre un 85 a 90% es el *Enterococcus faecalis* y un 5 a 10% el *Enterococcus faecium*. Siendo frecuentes en infecciones nosocomiales en las unidades de cuidados intensivos (UCI) sobre todo, siendo transmitidos de paciente a paciente por medio del mal lavado de manos²⁴.

Bactericida: Capacidad de un biocida (agente físico o químico) cuya función consiste en producir la muerte a las bacterias, que puede o no ser por medio del efecto lísico o lítico²⁵.

Bacteriostático: Propiedad por la cual un biocida puede inhibir la multiplicación bacteriana, que se reanuda una vez que se remueve el agente, aunque no produce la muerte bacteriana²⁵. Generalmente los organismos son capaces de generar mecanismos defensivos secretando sustancias en contra de las bacterias.

Agente antimicrobiano: Toda aquella sustancia que elimina o inhibe el crecimiento de un amplio espectro de microorganismos de tipo patógeno (bacterias, hongos, parásitos, virus, mohos). Dichas sustancias son por ejemplo desinfectantes, antibióticos y aditivos antimicrobianos como el de zinc²⁴.

Resistente (R):

Según la estandarización del CLSI²⁵ se considera parte de una categorización teniendo en cuenta la zona de inhibición definida por un punto de ruptura que implica que los aislamientos con una concentración mínima inhibitoria (MIC) en o por encima por debajo del punto de ruptura resistente no están inhibidos por las concentraciones usualmente alcanzables del agente con programas de dosificación normales y / o que demuestran MIC o diámetros de zona que caen en el rango en el que es probable que haya mecanismos específicos de resistencia microbiana, y la eficacia clínica del agente contra el aislado no se ha demostrado de manera confiable en los estudios de tratamiento.

Intermedio (I)

Categorización que determina a un punto de corte que incluye aislamientos con MIC o diámetros de zona dentro del rango intermedio que se acercan a niveles de sangre y tejidos generalmente alcanzables y para los cuales las tasas de respuesta pueden ser más bajas que para aislamientos susceptibles, además indica eficacia clínica en sitios del cuerpo donde los medicamentos están fisiológicamente concentrados o cuando se puede usar una dosis de un medicamento más alta de lo normal²⁵.

Sensible o susceptible (S):

Para el CLSI²⁵ 2019, se considera como otra categoría que se define por un punto de ruptura que implica que los aislamientos con un MIC ese encuentra en o por debajo o los diámetros de zona o por encima del punto de ruptura susceptible se inhibiendo por

las concentraciones usualmente alcanzables de agente antimicrobiano cuando la dosis recomendada para tratar el sitio de infección se utiliza, lo que resulta en una probable eficacia clínica.

Resistencia antimicrobiana

La resistencia es aquel efecto o capacidad de un microorganismo para crecer en presencia de un agente, teniendo en cuenta que antes era sensible al mismo²⁴. Existen dos tipos de resistencia la natural y la adquirida teniendo en cuenta los principales mecanismos de resistencia antibiótica señalados por Vignoli R., Seija V.²⁶.

Resistencia natural o intrínseca

Se origina principalmente a nivel de los genes que presenta cada familia, especie o grupo bacteriano, como es el caso de la resistencia de los Gram negativos a la vancomicina²⁶.

Resistencia adquirida extrínseca

Es de tipo variable obtenida por una cepa de una especie bacteriana relacionada a factores externos como es el caso de las bacterias resistentes a las penicilinas, dicha resistencia es de suma importancia clínica y es la que se reporta al médico para que evalúe en el caso de que exista un fracaso terapéutico²⁶.

La farmacorresistencia se da por el uso descontrolado e inadecuado de medicamentos, entre los factores que influyen son las prescripciones erróneas, deficiencias de la prevención y control de infecciones, medicamentos de mala calidad²⁷.

Actualmente se considera que la farmacorresistencia es una de las amenazas más importante a nivel de salud mundial, la seguridad alimentaria y desarrollo, Alós J^{28,29}. Debido al abuso de la ingesta de antibióticos desencadenan infecciones por cepas resistentes como neumonía, tuberculosis, gonorrea, salmonelosis, entre otras.

Tipos de resistencia desarrollada por bacterias frente a los antimicrobianos

La resistencia a los antibióticos, aumenta la ineficacia del mismo para combatir a las bacterias, en algunos casos puede ser un fenómeno temporal, cuando se condiciona al

medio, o puede ser un fenómeno permanente cuando está sujeto a mutaciones, alterando el material genético original, a través de plásmidos, transposones.

Existen diferentes tipos de mecanismos de resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias que se detallan a continuación:

1. Bombas de eflujo o expulsión del antibiótico del interior de la célula bacteriana

Mecanismo transportador de membrana, encargado de la extrusión desde el interior de la célula hacia el exterior de sustancias tóxicas, se encuentran presentes en microorganismos Gram positivos, Gram negativos y eucariotas.

Las bombas de eflujo o expulsión en algunos casos pueden ser específicas para un sustrato, transportando gran variedad de compuestos químicos distintos incluyendo antimicrobianos, las bacterias presentan múltiple resistencia a drogas o antibióticos (MDRO), provocando la disminución de la susceptibilidad a un amplio rango de quimioterápicos químicamente disímiles al mismo tiempo, según manifiesta el artículo sobre la resistencia de bacterias a antibióticos realizado por Cabrera, C., et al³⁰.

2. Modificación o inactivación del antibiótico mediante enzimas hidrolíticas

Mecanismo de las bacterias Gram negativas especialmente, capaz de expresar enzimas hidrolíticas creando cambios en la estructura del antibiótico inactivando su funcionalidad. Las β -lactamasas son las más prevalentes, dado que hidrolizan el anillo β -lactámico del antibiótico, al igual que las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos que modifican al antimicrobiano mediante acetilación, adenilación y fosforilación²⁹.

3. Bloqueo de la penetración del antibacteriano mediante modificación del sitio activo

Se debe a la pérdida de afinidad impidiendo ejercer la acción, las bacterias principalmente las Gram positivas generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos β -lactámicos a nivel de las proteínas unidoras de penicilinas²⁹.

4. Alteración o disminución de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana

Dentro de la resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas, Tafur, J., Torres J. Villegas³¹ indican que esta es la forma más frecuente de resistencia de las bacterias, ya que no pueden reducir la permeabilidad de la bicapa lipídica, por tal motivo, algunas bacterias son capaces de protegerse creando una segunda membrana que rodea la célula, en el caso de las bacterias Gram negativas, que ejercen cambios en el diámetro y/o número de canales proteicos o porinas bloqueando el ingreso del antimicrobiano.

5. Biofilmes

Mecanismo desarrollado por las bacterias caracterizado por la incrustación en una matriz polimérica fabricada por ellas mismas y adheridas a la superficie, con el objetivo de protegerse de la luz ultravioleta, deshidratación, acción de los antibióticos, fagocitosis y amenazas ambientales^{29, 30}.

6. Sobre-expresión del sitio blanco

Mecanismo descrito solamente en aislados clínicos de micobacterias, se debe principalmente a la duplicación génica o las mutaciones de los promotores implicados en la transcripción de estos genes. La inducción de la resistencia al clavulanato se debe por la hiperproducción de betalactamasas con referencia principalmente al gen *Tem*, de esta forma se considera la sobreexpresión del blanco del antibiótico²⁹.

Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en Gram negativos

Resistencia de las betalactamasas tipo AmpC

Se caracterizan por su espectro de hidrólisis en especial a las cefalosporinas de 1, 2, 3,4, generación y por su perfil de inhibición, las AmpC plasmídicos se encuentran en algunas especies de las Enterobacterias como es el caso de *Klebsiella spp*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, etc., que tienen gran importancia clínica y epidemiológica³¹. Para su detección se utiliza uno de los métodos más económicos y sencillos el de difusión del doble disco por sinergia utilizando cloxacilina o ácido fenil-borónico y discos de cefotaxima y ceftazidima³².

La producción de betalactamasas AmpC puede ser constitutiva o inducible tomando en cuenta el grado de expresión del gen *bla* AmpC. Cabe destacar que las enzimas AmpC en especial las plasmídicas se asocian a fracasos de tipo terapéutico por tal motivo es esencial su investigación por medio de métodos de detección fenotípica con una lectura del antibiograma.

La resistencia a Cefoxitin en el caso de *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* que no poseen el gen *AmpC* es un claro indicio de presencia de betalactamasas AmpC plasmídicas de importancia epidemiológica por su potencial de diseminación. Es de relevancia que los laboratorios de microbiología implementen la detección fenotípica de betalactamasas tipo AmpC, detectando bacterias con AmpC natural que presenten resistencia a las cefalosporinas o en caso cepas productoras de BLEE conjuntamente con AmpC.

Resistencia a las Quinolonas

Las quinolonas conjuntamente con los betalactámicos son de mayor uso antibiótico, ejercen su acción principalmente bloqueando las topoisomerasas (ADN-girasa) II y IV en el ADN, que presentan dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* en el caso de la ADN-girasa.

En la actualidad se ha podido apreciar que las Enterobacterias presentan una disminución de sensibilidad a las quinolonas siendo sensibles al ácido nalidíxico, relacionando con presencia de genes plasmídicos de resistencia a quinolonas^{33, 34}.

La sensibilidad al ácido nalidíxico y Ciprofloxacino en los resultados es de notabilidad en la detección de mecanismos de resistencias a quinolonas en el caso de Enterobacterias, *Haemophilus spp.*, *Neisseria spp.*, en el cual se puede utilizar el método de difusión de los discos siendo una alternativa de rutina más económico o el método de las tiras de Etest siendo una herramienta idónea por su amplia escala de concentraciones, aunque elevado costo.

Cuando en los resultados se presente alto nivel de resistencia al ácido nalidíxico y sensibilidad a Ciprofloxacino, se sospecha de una mutación a nivel del gen *gyrA*, siendo de suma importancia informar el riesgo de mutaciones con resistencia a las fluoroquinolonas, ya que se puede tratar de un fallo terapéutico³².

Según lo que indica el CLSI el fallo terapéutico con fluoroquinolonas solo se alerta en caso de infecciones extraintestinales por *S. entérica.*, sin embargo EUCAST en su artículo “Expert rules in antimicrobial susceptibility testing, 2008” reconsideran dicha información e indican que se debe informar de fallo terapéutico también en el caso de resistencia al ácido nalidíxico al resto de Enterobacterias o al menos interpretarse como “intermedio” sobre todo en el caso en las que por el lugar de la infección no accedan bien las fluoroquinolonas³⁴.

Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

El mecanismo de resistencia a los antibióticos betalactámicos más común en el caso de bacterias Gram negativas es la producción de enzimas betalactámicas (BLEE), cuya función es la inactivación del antibiótico mediante la hidrólisis del anillo betalactámico, entre las diversas clasificaciones se encuentran las TEM y SHV, derivadas de betalactamasas con menor espectro de hidrólisis, la familia CTX-M, entre otras³⁴.

Su oportuna detección ayuda a la elección del antibiótico más adecuado para el tratamiento de la infección. Entre las formas de detección BLEE más rápida y económica se encuentra la difusión con disco, no solo por la resistencia de algunos o todos los sustratos sino también por el efecto sinérgico “huevo” producido entre las cefalosporinas de espectro ampliado o los monobactámicos y el ácido clavulánico, todas estas pruebas fenotípicas requieren como mínimo de 48 horas, aunque existen métodos cromogénicos para el aislamiento selectivo e identificación presuntiva de BLEE³⁴.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

Tipo de Investigación

Enfoque cuali-cuantitativo: El presente trabajo fue de tipo cualitativo porque se procedió a la observación directa de los lugares de toma de muestra y de las siembras diarias para la purificación de colonias de las diferentes muestras recogidas, y de tipo cuantitativo ya que se procedió a medir la resistencia antimicrobiana, y sus resultados fueron procesados mediante el uso de la hoja de cálculo Excel 2013.

Cohorte transversal: el presente proyecto de investigación se estableció delimitando el lugar de estudio (Río Guamote) y tiempo específico comprendido durante el período de abril a julio del año 2019.

Nivel o alcance descriptivo: la información recolectada se obtuvo de forma conjunta sobre las variables de estudio, ya que, se describió la resistencia antimicrobiana de las bacterias patógenas presentes en las aguas de riego del Río Guamote.

Diseño de campo: se recolectaron las muestras de los diferentes puntos geográficos del río Guamote, donde se aislaron e identificaron las bacterias patógenas y con su respectiva resistencia antimicrobiana, sin ninguna alteración o manipulación de las variables a, es decir, no se alteraron las condiciones existentes.

No experimental: no hubo la manipulación de variables, es decir, no se alteraron las condiciones existentes.

Determinación de la población y muestra

Población: 19 colonias de bacterias presentes en el agua del río Guamote.

Muestra: se tomaron en cuenta las 15 cepas bacterianas aisladas en el agua del río Guamote.

Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Técnica de tipo cualitativo: Observación directa.

Instrumento de tipo cualitativo: Guía de observación.

Técnica de tipo cuantitativo: Observación sistemática.

Instrumento de tipo cuantitativo: Tablas de registro de datos.

Materiales: sistema de triple embalaje (frascos estériles, cooler o caja de transporte de muestras y gradilla), demográfico, asas de platino, micropipetas automáticas, puntas amarillas y azules, pipetas Pasteur, mechero de Bunsen, cajas bipetri Phoenix estériles, placas portaobjetos, probeta de 250 mL Brand, Erlenmeyer de 500 y 1000 mL, Vasos de precipitación de 50, 100 y 200 mL, Hisopos estériles, Tiras indicadoras de pH, termómetro, regla.

Equipos: Cámara de Flujo Laminar Biobase, Estufa bacteriológica, Autoclave, microscopio, refrigeradora, balanza analítica, plancha de calentamiento, computador portátil, cámara fotográfica.

Reactivos: Agua destilada, agua oxigenada, suero fisiológico, colorantes cristal violeta, lugol, decolorante Alcohol-cetona, safranina, aceite de inmersión, Agar sangre, Agar McConkey, tiras de oxidasa, Agar CLED, Agar SS, Agar Urea, Agar Citrato de Simmons, Agar MIO, Agar LIA, Agar Kligler, alcohol al 70% y discos de Antibiograma.

Identificación del área de estudio y toma de muestra

En el presente proyecto investigativo se localizaron varios puntos geográficos para la toma de muestra de regadío del río Guamote, localizado al centro de la región interandina del Ecuador en la provincia de Chimborazo perteneciente al cantón Guamote con una latitud de -1.8 (Anexo 1).

Procedimiento

Toma de muestra

Para el procedimiento del proyecto de investigación a nivel de laboratorio con respecto a la toma de muestra se procedió a identificar cada uno de los puntos clave para la recolección en donde se midió y anotó en la ficha de observación también algunos parámetros importantes, como es la altitud, temperatura del ambiente y del agua, y el pH (Anexo 2). Con la utilización de frascos plásticos de boca ancha estériles, llenándolos las $\frac{3}{4}$ partes.

Para una correcta toma de la muestra se procedió a colocar dicho frasco contra corriente al río en estudio, enjuagándolo por lo menos en tres ocasiones con la misma agua antes de obtener la toma final, posteriormente se tapó el recipiente debidamente etiquetado, de cada punto se obtuvieron tres muestras, las mismas que se transportaron mediante el sistema de triple embalaje, para su análisis correspondiente en el Laboratorio de Microbiología, de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la UNACH.

Tabla 1. Descripción de ubicación y altitud en cada estación de muestreo

Puntos Geográficos	Estaciones de muestreo	Ubicación	Altitud (msnm)
Punto 1	Chipo Grande	A 200m de la Carretera Panamericana	3.189
Punto 2	Chipo Chico	A 175m de la Carretera Panamericana Troncal de la Sierra	3.157
Punto 3	Guamote	Centro de Guamote A 128m de la Carretera Panamericana	3.025
Punto 4	Rondador Molino (Chakrawasi)	A 505m de la Carretera Panamericana	2.962
Punto 5	Copalillo (Rondan)	A 160m de la Carretera Panamericana	2.913
Punto 6	Puente de Guaninche	Vía Riobamba Macas	2.855

Fuente: Datos obtenidos de muestras de agua del río Guamote, 2019.

Preparación de medios de cultivo

Se prepararon los siguientes medios de cultivo como es el medio de enriquecimiento agua peptonada, agar Sangre medio universal y el agar McConkey que es un medio de cultivo selectivo para el aislamiento de bacterias Gram negativas y diferencial para las

bacterias fermentadoras de lactosa; Agar Kliger, Agar Urea, Agar Citrato de Simmons, Agar MIO, Agar LIA, para la realización de las pruebas bioquímicas correspondientes y el Agar Müller Hinton para el antibiograma.

Los mismos que previamente a su uso fueron autoclavados 15 PSI a 121°C por 15 minutos y plaqueados aproximadamente cuando la temperatura del medio estuvo entre 45-50°C, logrando un grosor del agar más o menos de 4 a 5 mm en las cajas Petri estériles, para finalmente dejarlos enfriar y solidificar para almacenarlos a una temperatura de 2 a 8°C.

Aislamiento de las bacterias patógenas presentes en las muestras

Previo a la realización del correcto procesamiento de las muestras en el laboratorio se implementó la asepsia respectiva, previniendo la contaminación lo más posible de las mismas, utilizando conjuntamente la campana esterilizada de bioseguridad con flujo laminar con luz ultravioleta por 20 minutos (Anexo 3).

Técnicas para el aislamiento de las colonias

La técnica utilizada es la siembra por agotamiento en el agar para el correcto aislamiento y purificación de colonias bacterianas, y su respectiva incubación a 37°C por 24 horas en la estufa en posición invertida con su respectiva codificación.

Técnica de Gram

Una vez obtenido el crecimiento bacteriano se seleccionan las colonias más puras y tomando una de ellas con un palillo de madera estéril, se la disuelve colocando previamente con una gota de suero fisiológico y homogenizando en una placa portaobjeto etiquetada, dejándola secar al aire libre, y se fija la muestra, para su tinción respectiva, siguiendo el protocolo tradicional de Hans Christian Gram:

Se empieza colocando por un minuto con el cristal violeta, luego de 1 minuto de exposición, cubrir la placa con lugol o solución yodada por 1 minuto, se procede a la decoloración 30 segundos con alcohol acetona o hasta que el lavado deje de tener color violeta, y finalmente añadiendo por 1 minuto la safranina, teniendo en cuenta que en cada adición de reactivo/decolorante se procede a lavar con agua corriente, para su

posterior visualización microscópica con lente húmedo de 100X; teniendo en cuenta que las bacterias Gram negativas se tiñen de color rojo o rosa, mientras que las Gram positivas de una coloración azul oscuro; Koneman³⁵.

Pruebas bioquímicas para identificación bacteriana

Para la realización de la identificación bacteriana en el caso de las bacterias Gram positivas se procedió a observar la presencia o no de hemólisis, la prueba de la catalasa, y bilisesculina, en el caso de las bacterias Gram negativas se le realizaron pruebas bioquímica con medios de cultivos como Agar Urea, Agar Citrato de Simmons, Agar MIO, Agar LIA, Agar Kligler, en el caso de las bacterias que fueron no fermentadoras de la lactosa se le aplicó la prueba de oxidasa, para así llegar a la clasificación de género y especie.

Método de difusión en disco de Kirby Bauer

También conocido como método de difusión del disco en agar o antibiograma, generalmente se lo realiza en agar Müller Hinton, para determinar pruebas de susceptibilidad bacteriana frente a un antimicrobiano, en el que se utiliza un inóculo que es normalizado mediante estándares de turbidez según la escala de Mac Farland.

Es un método de tipo cualitativo, que orienta al tratamiento y no se suele aplicar en el caso de microorganismos de difícil o lento crecimiento ni a microorganismos anaerobios.

Medición de resistencia antibiótica en bacterias patógenas

Finalmente a las bacterias que se identificaron (Anexo 4,5) se les procedió a realizar su respectivo antibiograma y mecanismos de resistencia, mediante el método de difusión en disco de Kirby Bauer, con el uso del agar Müller Hinton, mediante la dilución en NaCl 0,9% de cada colonia bacteriana tomando en cuenta la escala de turbidez estándar de 0,5 de Mc Farland, procediendo así a difundirlo por toda la superficie del agar con un hisopo estéril y la colocación de los discos de antibióticos, con la ayuda de pinzas estériles, e incubando de forma invertida a 37°C por 24 horas de incubación y finalmente su lectura correspondiente para determinar así si la bacteria es sensible, intermedia o resistente según CLSI²⁵, 2019.

Los discos de antibióticos que se utilizaron son: Oxacilina (OXA), Penicilina (P), Sulfatrimetroprim (STX), Vancomicina (VA), Tetraciclina (TE), Amoxicilina (AMX), Bacitracina diferencial, Azitromicina, Ceftriaxona(CTX), Ciprofloxacino (CIP), Colistin (COL), Imipenem (IMP), Ceftazidima (CAZ), Aztreonam (ATM), Ácido Nalidíxico (NAL), Gentamicina (GE), Kanaplicina (K), Novobiocin.

Análisis Estadístico de Datos

De los resultados obtenidos se procedió a la realización de tablas descriptivas con referencia a la frecuencia y porcentaje, aplicando hojas de cálculo pertenecientes al sistema operativo Microsoft Office 2013.

Consideraciones bioéticas

No existen conflictos bioéticos por cuanto las muestras no son de origen humano.

CAPÍTULO III.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estratégicamente fueron seleccionadas seis estaciones geográficamente para la toma de muestra de las aguas del río Guamote, tomando en cuenta a los sectores agrícola-ganaderos aledaños.

Tabla 1. Mediciones de temperatura y pH obtenidos de las aguas del Río Guamote de acuerdo a cada estación de muestreo.

Estación de muestreo	T Ambiente(°C)	T Agua (°C)	pH Agua	Bacterias	
				Gram +	Gram -
1. <i>Chipo Grande</i>	12	13.5	7	0	1
2. <i>Chipo Chico</i>	8	13	7	1	1
3. <i>Guamote</i>	15	16	8	0	3
4. <i>Rondador Molino (Chakrawasi)</i>	15	12	8	0	3
5. <i>Copalillo (Rondan)</i>	18	14	7	0	3
6. <i>Puente de Guaninche</i>	13	13	8	0	3
			Total	1	14

Fuente: Datos obtenidos de muestras de agua del río Guamote, 2019.

Análisis: En la Tabla N°1 se detallan las mediciones realizadas en el sector en referencia a la temperatura del ambiente, temperatura y pH del agua en estudio, de acuerdo a cada estación geográfica preestablecida observando así que las mediciones de pH son de 7 a 8, con una temperatura que oscila entre los 12 a 16°C.

De esta forma se determina en este estudio que los factores ambientales tales como son los físicos y químicos, variación de temperatura y pH tienden a influir en la velocidad del crecimiento bacteriano, esto se ve reflejado en los puntos geográficos con menos altitud, en el caso de los puntos 3 Guamote, 4 Rondador Molino (Chakrawasi), 5 Copalillo (Rondan) y 6 Puente de Guaninche con una temperatura ambiente de entre 13-18°C, y una temperatura del agua que oscila entre los 13 a 16°C a un pH neutro de 7 y ligeramente alcalino de 8.

Teniendo en cuenta que aquellas bacterias de importancia clínica para el hombre tienen facilidad de crecer a una temperatura óptima de 37°C, considerándoles en el grupo de los estenotérmicos, ya que a temperaturas altas existen variaciones a nivel bacteriano afectando lípidos, proteínas y ácidos nucleicos ocasionando su desnaturalización e incluso lisis y a inferiores temperaturas el agua se congela y crea cristales que lisan la membrana volviéndola rígida, disminuyendo el metabolismo microbiano y retrasando su crecimiento.

Además, siendo el pH un factor fisicoquímico también interfiere el crecimiento bacteriano teniendo en cuenta la tolerancia limitada de las bacterias a cambios bruscos de pH que pueden lisanla, por tal motivo se debe tomar en cuenta que a un pH neutro de 7 es óptimo para el desarrollo en especial si se trata de bacterias neutrofílicas patógenas para el hombre.

Discusión: Relacionando los valores obtenidos en esta investigación con respecto a la investigación de Naranjo⁴ en aguas termales, difieren en los resultados de temperatura y pH, mostrando así que se obtuvo valores óptimos para el crecimiento bacteriano de microorganismos mesófilos, cuando la corriente se encuentra en su estado natural, a diferencia del agua utilizada para el manantial termal que se encuentra con pH ácido y temperatura elevada apto para el crecimiento de microorganismos termófilos y mesófilas.

Tabla 2. Bacterias de interés clínico encontradas en las aguas del Río Guamote

Hallazgo Bacteriano			
Familia	Especie	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	80%
	<i>Klebsiella oxytoca</i>		
	<i>Citrobacter amalonaticus</i>		
	<i>Citrobacter diversus</i>		
	<i>Proteus mirabilis</i>		
	<i>Proteus vulgaris</i>		
Enterococcaceae	<i>Enterococcus spp.</i>	1	6.7%
Aeromonadaceae	<i>Aeromonas spp.</i>	2	13.3%
Total		15	100%

Fuente: Datos obtenidos de muestras de agua del río Guamote, 2019.

Análisis: En la Tabla 2 se detallan las bacterias patógenas aisladas e identificadas en la investigación del Río Guamote obteniéndose: 6 especies de la familia Enterobacteriaceae (80%), 1 especie de la familia Aeromonadaceae (13.3%) siendo Gram negativas y 1 cepa de la familia Enterococcaceae (6.7%) como Gram positiva.

Discusión: Relacionando los estudios realizados en el río Chibunga Jaque y Potoci³⁶ en el 2015 sobre la calidad del agua, se ratifican los resultados obtenidos, demostrando de esta forma que las bacterias que afectan al hombre tienden a pertenecer en su mayoría a la familia Enterobacteriaceae, del grupo coliformes en su mayoría, teniendo en cuenta su capacidad de multiplicación en el medio ambiente asociándose principalmente a condiciones de temperatura, pH y materia orgánica, encontradas en mayor frecuencia a nivel de fuentes hídricas contaminadas como es el caso de los ríos antes mencionados de la provincia de Chimborazo.

Tabla 3. Distribución de las bacterias de importancia clínica según cada estación de muestreo

Bacterias Patógenas										
Estación de muestreo	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>C. amalonaticus</i>	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus. vulgaris.</i>	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Aeromonas spp.</i>	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Punto 1. Chipo Grande	3/1								1	6.7
Punto 2. Chipo Chico			3/1				1		2	13.3
Punto 3. Guamote		1	1					1	3	20
Punto 4. Rondador Molino (Chakrawasi)			1		1			1	3	20
Punto 5. Copalillo (Rondan)					3				3	20
Punto 6. Puente de Guaninche				2		1			3	20
Total									15	100%

Fuente: Datos obtenidos de muestras de agua del río Guamote, 2019.

Análisis: En la Tabla N°3, se representa detalladamente por cada estación geográfica las bacterias de interés clínico identificadas, observándose así en el sector de punto 3 Guamote, punto 4 Rondador Molino, punto 5 Copalillo y punto 6 Puente de Guaninche,

3 especies aisladas por cada punto de toma de muestra con un (20%), mientras que en el punto Chipó Grande (6.7%) y Chipó Chico (13.3%) inicialmente se aislaron 4 y 3 bacterias respectivamente que presentaron un mismo patrón de sensibilidad y resistencia siendo así consideradas como la misma cepa.

Discusión: Al relacionar los datos obtenidos en los resultados de investigación de ríos del Ecuador con la de otros autores como en el caso de la investigación de Orozco y Molina⁶ en el Río Chambo, se observan similitudes en las cepas bacterianas aisladas, mostrando que los coliformes fecales son los que con más frecuencia se encuentran, considerándolos como un indicativo clave de la contaminación del río Guamote, en especial en aquellos lugares aledaños a las actividades humanas y ganaderas.

Tabla 4. Patrón de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de las enterobacteriaceae de bacterias de importancia clínica.

Puntos de Toma de Muestra	Cód.	Microorganismo	CN	K	CT	TE	CIP	AN	SXT	CRO	CAZ	IPM	VA	ATM	AZM	AX	AMC	FOX	P	CTX
Punto 1. Chipo Grande	1.1	<i>K. pneumoniae</i>	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	R	R	R	-	S
	1.2	<i>K. pneumoniae</i>	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	-	S	S	R	R	R	-	I
	1.3	<i>K. pneumoniae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	R	R	R	-	S
Punto 2. Chipo Chico	2.1	<i>C. amalonaticus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	-	S	-	-
	2.2.1	<i>C. amalonaticus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	-	S	-	-
	2.2.2	<i>Enterococcus spp.</i>	S	S	-	S	S	-	-	-	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-
	2.3	<i>C. amalonaticus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	-	-
Punto 3. Guamote	3.1	<i>K. oxytoca</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	R	R	R	-	-
	3.2	<i>Aeromonas spp.</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	-	S	S	R	-	-	-	-
	3.3	<i>C. amalonaticus</i>	S	I	S	S	I	R	S	S	S	I	-	S	S	R	-	-	-	-
Punto 4. Rondador Molino (Chakrawasi)	4.1	<i>P. mirabilis.</i>	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	-	S	R	S	-	-	-	-
	4.2	<i>C. amalonaticus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	-	-
	4.3	<i>Aeromonas spp.</i>	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	-	S	S	R	-	-	-	-
Punto 5. Copallillo (Rondan)	5.1	<i>P. mirabilis.</i>	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	-	S	R	S	-	-	-	-
	5.2	<i>P. mirabilis.</i>	S	S	R	R	R	R	I	S	S	I	-	S	R	I	-	-	-	-
	5.3	<i>P. mirabilis.</i>	S	I	S	R	I	S	R	S	I	I	-	S	R	S	-	-	-	-
Punto 6. Puente de Guaninche	6.1	<i>P. vulgaris</i>	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	-	S	R	R	-	-	-	-
	6.2	<i>C. diversus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	R	-	-	-	-
	6.3	<i>C. diversus</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	-	-

GE: Gentamicina; **K:** Kanamicin; **CT:** Colistin; **TE:** Tetraciclina; **CIP:** Ciprofloxacino; **AN:** Ácido Nalidíxico; **STX:** Trimetroprim; **CRO:** Ceftriazone; **CAZ:** Ceftazidima. **IPM:** Imipenem; **VA:** Vancomicina; **ATM:** Aztreonam; **AZM:** Azitromicina **AX:** Amoxicilina; **AMC:** Amoxicilina/A. Clavulánico; **FOX:** Cefoxitin; **P:** Penicilina; **CTX:** Cefotaxima; **Antibiograma para Gram Positivas:**  Resistencias  Antimicrobianas  Presencia del efecto de Resistencia Natural  AmpC Inducible presentando sensibilidad

Fuente: Datos obtenidos de muestras de agua del río Guamote, 2019.

Tabla 5. Patrón de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana de las enterobacteriaceae de bacterias de importancia clínica.

Puntos de Toma de Muestra	Cód.	Microorganismo	Tipo de Resistencia
Punto 1. Chipo Grande	1.1 1.2 1.3	<i>K. pneumoniae</i>	Resistencia <i>AmpC</i>
Punto 3. Guamote	3.1 3.3	<i>K. oxytoca</i> <i>C. amalonaticus</i>	Resistencia <i>AmpC</i> Resistencia a las quinolonas mutación gen <i>gyrA</i>
Punto 5. Copalillo (Rondan)	5.2	<i>P. mirabilis.</i>	Resistencia a las quinolonas mutación gen <i>gyrA</i>
Punto 6. Puente de Guaninche	6.2	<i>C. diversus</i>	Resistencia Natural <i>AmpC</i> Inducible

Fuente: Datos obtenidos de muestras de agua del río Guamote, 2019.

Análisis: En la Tabla 4 y 5 se puede observar que los resultados de las Enterobacterias muestran que en el punto 1 Chipo Grande presentó mayor resistencia a los antibióticos probados, observando así mecanismos de resistencia *AmpC* en los 3 aislamientos pertenecientes a la misma cepa de *Klebsiella pneumoniae* y en la cepa de *Klebsiella oxytoca* correspondiente al punto 3 Guamote; además se observaron resistencia a las quinolonas por parte de los microorganismos *Citrobacter amalonaticus* y *Proteus mirabilis*, en el punto 3 y 5 respectivamente, ocurriendo así mutaciones a nivel del gen *gyrA* que codifican la subunidad a de la ADN girasa confiriendo la resistencia antimicrobiana y una resistencia *AmpC* inducible de tipo natural por parte del *Citrobacter diversus* encontrado en el punto 6 Puente de Guaninche.

Discusión: En la investigación realizada las resistencias antimicrobianas encontradas se relacionan más a las de tipo *AmpC* y a las quinolonas siendo similares a los reportados por Mur⁵, Orozco⁶ y Navarro et al³⁴ quienes en sus respectivas investigaciones dieron a conocer resultados similares, como es el caso de *C. amalonaticus* y *P. mirabilis*, **(Imagen 1)** ya que presentan resistencia al ácido nalidíxico y sensibilidad al Ciprofloxacino, indicando una posible mutación en el gen QRDR, que es un determinante de resistencia a quinolonas, afectando al gen *gyrA* del ADN girasa

respectivamente, si se diera el caso se produciría una inhibición en la replicación del ADN, conllevando a una resistencia antibiótica a las quinolonas.



Imagen 1: Antibiograma: Resistencia a Quinolonas (*C. amalonaticus* y *P. mirabilis*)

Otro de los resultados obtenidos es la resistencia a AmpC por parte de los 3 aislamientos pertenecientes a la misma cepa de *Klebsiella pneumoniae*, *K oxytoca*, pertenecientes al punto 1y 3 respectivamente, este tipo de resistencias se puede apreciar por presentar resistencia a AMC (Amoxicilina/A. Clavulánico) y Resistencia a FOX (Cefoxitin), (**Imagen 2 y 3**).



Imagen 2: Antibiograma de *Klebsiella oxytoca* (Resistencia FOX)



Imagen 3: Antibiograma de *Klebsiella oxytoca* (**Resistencia a AMC**)



Imagen 4: Test de Antibiograma para detección de AmpC (CTX, APB y FOX)

Este tipo de resistencia AmpC observadas (**Imagen 4**) principalmente se encuentran en las Enterobacterias de relevancia clínica y para su detección se utiliza el método de difusión usando cloxacilina o ácido fenil-borónico y discos de cefotaxima y ceftazidima.



Imagen 5: Antibiograma de *Citrobacter diversus* (**AmpC Inducible**)

En el resultado (**Imagen 5**) del Antibiograma de *Citrobacter diversus* se detectó una resistencia natural, ya que este microorganismo sintetiza una β -lactamasa de tipo AmpC inducible.

Por consiguiente puede haber resistencia intratratamiento con penicilinas, cefalosporinas 1ra, 2da, 3ra generación y monobactámicos, además se puede apreciar un efecto de sinergia en forma de una D, ocasionada a partir de que el antibiótico Imipenem indujo a la Ceftazidima, cabe destacar que este tipo de resistencias en el caso de *Citrobacter* spp., es muy frecuente e intrínseca o natural, ya que es una resistencia característica propia de cada familia o grupo bacteriano por ende no tiene importancia clínica.

CONCLUSIONES

1. Se determinó los valores de pH, temperatura del agua y del ambiente concluyendo que tienden a influir en la velocidad del crecimiento bacteriano, encontrando así el mayor crecimiento bacteriano con un 20% respectivamente de los puntos: 3 Guamote, 4 Rondador Molino, 5 Copalillo y 6 Puente de Guaninche, con una temperatura del agua que oscila entre los 13 a 16°C y del ambiente de entre 13-18°C, con un pH neutro de 7 y ligeramente alcalino de 8, aislando por cada punto de toma de muestra 3 cepas bacterianas correspondientes a *Klebsiella oxytoca*, *C. amalonaticus*, *P. mirabilis*, *Proteus. vulgaris* *C. diversus*, *Aeromonas spp.*
2. Según protocolos microbiológicos se identificó y clasificó en 8 tipos de bacterias patógenas mediante las pruebas bioquímicas para Gram negativas y Gram positivas, aislando así: *Aeromonas spp.*, *Enterococcus spp.*, y diversos tipos de Enterobacterias (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter amalonaticus*, y *Proteus mirabilis*), siendo las dos últimas las que mayor frecuencia presentaron en la investigación.
3. Además, se determinó la resistencia antibiótica mediante el método Kirby- Bauer en las Enterobacterias aisladas identificando mecanismos de resistencia a las quinolonas con mutación de gen *gyrA*, resistencia de tipo *AmpC* consideradas de importancia clínica y resistencia natural *AmpC* Inducible que no es de relevancia clínicamente.

RECOMENDACIONES

1. Con los resultados obtenidos se recomienda dar a conocer a las autoridades municipales del cantón Guamote para que tomen las medidas pertinentes promoviendo la descontaminación y mejora del agua, por medio de mediciones de pH, temperatura de agua y del ambiente, ya que son factores que interfieren en la proliferación bacteriana, con el fin de evaluar la calidad del recurso hídrico constantemente.
2. Para la clasificación de bacterias se recomienda revisar protocolos microbiológicos y los estándares de rendimiento para pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos del Instituto de normas clínicas y de laboratorio, área microbiología: CLSI actualizado ya que sirve de gran ayuda en la identificación y determinación de la resistencia o sensibilidad de los diferentes tipos de bacterias.
3. Se sugiere realizar más investigaciones de este tipo a nivel de los ríos no sólo de la provincia de Chimborazo, sino también a nivel de todo el Ecuador, para determinar presencia de poblaciones bacterianas resistentes a antibióticos de uso clínico, para conocer la calidad de los ríos del país y el grado de la contaminación que presente.
4. Se recomienda posteriormente realizar estudios de identificación bacteriana con baterías API y equipos automatizados que brinden una mejor clasificación por género y especie, además de identificar la resistencia antimicrobiana a nivel molecular para correlacionar los resultados de mecanismos de resistencia en las bacterias de importancia clínica presentes en el río Guamote.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fernández C A. El agua: un recurso esencial. *Química Viva* [Internet]. 2012 [citado 1 de mayo de 2019]; 11(3): 145-150. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/863/86325090002.pdf>
2. Administración Nacional de Acueductos y Alcantarillados (ANDA) [Internet]. El Salvador: ANDA; c2014 [citado 1 mayo 2019]. Fuentes de Agua. [aprox. 2 pantallas]. Disponible en: <http://www.anda.gob.sv/calidad-del-agua/fuentes-de-agua/>
3. Rojas A G. [Internet]. Nueva Delhi: El País, Central European Summer Time: 2016 [citado 1 mayo 2019]. La contaminación aumenta en la mayoría de los ríos de América Latina, África y Asia. Disponible en: https://elpais.com/elpais/2016/09/01/ciencia/1472719506_387465.html
4. Naranjo C., Medina G. Estudio microbiológico del manantial termal del balneario “Termas la Merced” ubicado en la parroquia La Merced perteneciente a la provincia de Pichincha. [Internet]. 2015 [citado 16 mayo de 2019]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4454/1/56T00565%20UDCTFC.pdf>
5. Mur L, Marcillo K. Resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas aisladas del regadío del río Chibunga [Internet]. 2018 [citado 2 mayo de 2019]. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/5098>
6. Orozco J, Molina J. Detección de resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico aisladas en el Río Chambo. [Internet]. 2018 [citado 2 mayo de 2019]. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/5557/1/UNACH-EC-FCS-LAB-CLIN-2019-0007.pdf>
7. El Comercio.com. Cuatro Ríos de Chimborazo, contaminados. EC. [Internet]. 2010 [citado 2 mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.elcomercio.com/tendencias/rios-chimborazo-contaminados.html>
8. Ley Orgánica de Salud del Ecuador. 2017 [Internet]. Ediciones Legales, [citado 2 de mayo de 2019] Disponible en: <http://www.lexis.com.ec/wp-content/uploads/2018/07/LI-LEY-ORGANICA-DE-SALUD.pdf>
9. Secretaría Nacional del Agua. Línea base para el monitoreo de la calidad de agua de riego en la demarcación hidrográfica del Guayas [Internet]. 2010 [citado 15 mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.agua.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/07/LineaBaseDHG.pdf>

10. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antibióticos. [Internet]. 2018 [citado 13 mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos>
11. Raffino, M. E. Agricultura. Concepto.de. [Internet]. 2019 [citado 12 mayo de 2019]. Disponible en: <https://concepto.de/agricultura/>
12. Serra, M. A. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. [Internet]. La Habana; 2017 [citado 13 mayo de 2019]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000300011
13. Tendencias de la Salud. [Internet]. Madrid: c2017 [citado 2 de mayo 2019]. Las bacterias se comportan como miembros de un ecosistema. [aprox. 4 pantallas]. Disponible en: https://www.tendencias21.net/Las-bacterias-se-comportan-como-miembros-de-un-ecosistema_a44161.html
14. Acevedo RL, Severiche CA, Jaimes JC. Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. Producción + Limpia [Internet]. 2015 [citado 2 de mayo de 2019]; 10(2): 156. Disponible en: <http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/pl/article/view/906/629>
15. Losada Villasante. El Riego: Fundamentos Hidráulicos. 4ªed. España: MP. 2009.
16. Arriaza, A.E. Waight, S. Contreras, C. E. Ruano, A. B., López A. y Ortiz D. Determinación bacteriológica de la calidad del agua para consumo obtenida de filtros ubicados dentro del campus central de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Revista Científica. (Guatemala) 2015; 25 (2): 21-29.
17. Instituto nacional de estadística y censos. Medición de los indicadores ODS de Agua, Saneamiento e Higiene (ASH) en el Ecuador [Internet]. 2016 [citado 18 mayo de 2019]. P 189-202. Disponible en: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/EMPLEO/2017/Indicadores%20ODS%20Agua,%20Saneamiento%20e%20Higiene/Presentacion_Agua_2017_05.pdf
18. Enciclonet.com. Guamote río. [Internet]. 2019 [citado 13 mayo de 2019]. Disponible en: <http://www.encimurrayclonet.com/articulo/guamote-rio/>
19. Kenneth J., Ray C., Nafees A., Lawrence D, Plorde J. Sherris Microbiología Médica, 5ta edición, McGraw Hill.2010. p 431-474
20. Jawetz, Melnick, Adelberg. Microbiología Médica. 25ªed. McGraw Hill.2011. p 210, 330-352
21. Pedraza, Pereira, Soto, Hernández, Villareal. Aislamiento microbiológico de Salmonella spp. Y herramientas moleculares para su detección. Rev. Art.

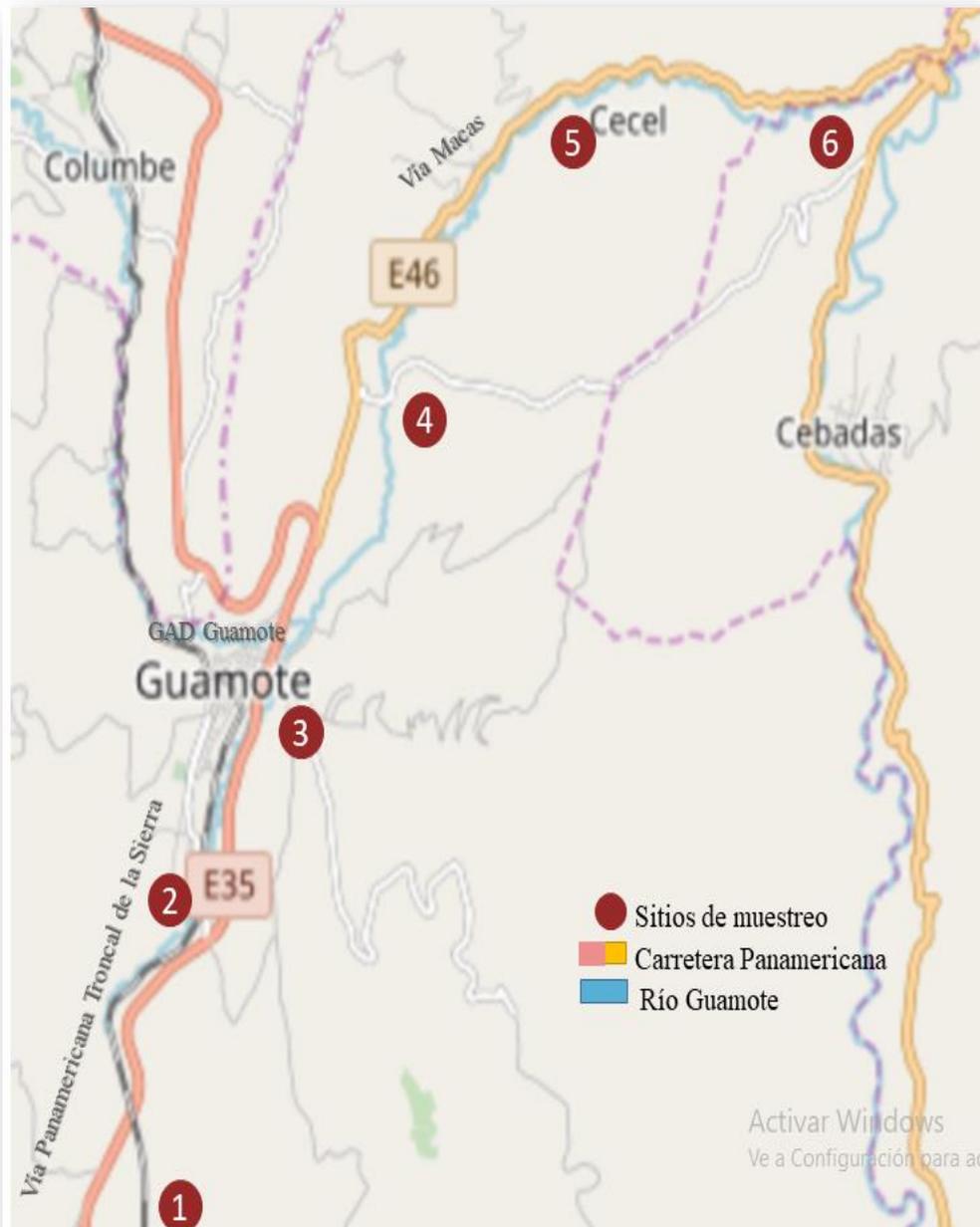
- Pública [Internet]. 2014[citado 14 mayo de 2019]. 30(1)73-94. Disponible en: <http://rcientificas.uninorte.edu.co/index.php/salud/article/viewFile/5458/4766>
22. Silva F. O. *Aeromonas* spp. Santiago abr. 2011 Rev. Child Infect 2011; 28(2): 157-158
 23. García A., Rodríguez F. Enterobacterias: *Proteus* spp. España-Medicine. 2010;10(51):3426-31
 24. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Enterococcus y otros cocos grampositivos. En: DRK, editor. Microbiología médica [Internet]. 7. A ed. Elsevier; 2014 [citado 14 de mayo de 2019]. p. 205. Disponible en: https://www.academia.edu/28415243/Microbiología_Médica_-_Murray
 25. Bazemore, E - Centers for Disease Control and Prevention. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (CLSI). USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019. 296 p. English.
 26. BioCote.com. Qué es la tecnología antimicrobiana. [Internet]. 2019[citado 14 mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.biocote.com/es/what-is-an-antimicrobial/>
 27. Manual de Microbiología Agrícola [Internet]. 2013[citado 18 mayo de 2019]. P 189-202. Disponible en: <http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/glosario13.pdf>
 28. Vignoli R., Seija V. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. [Internet]. 2019[citado 14 mayo de 2019]. P 649-662. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>
 29. Alós J. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. [Internet]. 2015 [citado de 2 mayo 2019]; 33 (10):693 Disponible en: DOI: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-resistencia-bacteriana-los-antibioticos-una-S0213005X1400341>
 30. Cabrera C., M. Sc. 1, Gómez R., B. Sc. 2, Zúñiga A., B. Sc. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Rev. Colombia médica [Internet]. 2007. [citado de 2 julio 2019] 38(2). Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cm/v38n2/v38n2a07.pdf>
 31. Rojas G, Ulate L. Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. Revista médica de Costa Rica y Centroamérica LXXIII [Internet]. 2016; [citado 2 de julio de 2019]; 621(73): 758. Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/621/art03.pdf>

32. Tafur, J., Torres J. Villegas M. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas Rev. Centro Internacional de Investigaciones Médicas, Colombia [Internet]. 2008. [citado de 2 julio 2019] 12(3). Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v12n3/v12n3a07.pdf>
33. Rodríguez J. Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. Enero 2005 Rev. ELSEVIER 23(1): 25-31
34. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. Enferm Infecc Microbiol Clinic. 2011; 29 (7):524–34.
35. Koneman E, Allen S, Dowell VR, Sommers H. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires, Argentina 1983; p 145-150.
36. 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 [Internet]. 2014; [citado 2 de julio de 2019]; Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4077/1/236T0132%20UDCTFCI.pdf>

ANEXOS

Anexo N°1:

Localización geográfica de las estaciones para la toma de muestra en las aguas del Río Guamote



Anexo N°1. Localización geográfica de las estaciones para la toma de muestra en las aguas del Río Guamote

Fuente: Google Maps Ecuador

Anexo N°2:

Ficha de Observación de los diferentes puntos de Toma de
Muestra

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”

N° 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

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: 01

Nombre del estudiante: Indira Kasandra Tipú Pillajo

Fecha: 09-07-2019

Muestra: Agua Producto Agrícola _____ Río: Guamate

Muestra tomada en (lugar): Chipo Grande

Temperatura: Medio Ambiente 12 Agua 13,5 (sólo para agua)

PH: 7 (sólo para agua)

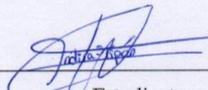
Observación:

Presencia de animales en los cultivos: _____

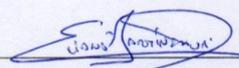
Viviendas colindantes:

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: 02

Nombre del estudiante: Inclira Kasancho Tipán Pillajo

Fecha: 09-07-2019

Muestra: Agua Producto Agrícola _____ Río: Guamote

Muestra tomada en (lugar): Chipo Chico

Temperatura: Medio Ambiente 8 Agua 13 (sólo para agua)

PH: 7 (sólo para agua)

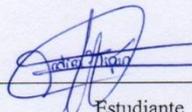
Observación:

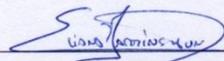
Presencia de animales en los cultivos: _____

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”

N° de muestra: 03

Nombre del estudiante: Indira Tipán Piñero

Fecha: 09-07-2019

Muestra: Agua Producto Agrícola _____ Río: Guamate

Muestra tomada en (lugar): Guamate

Temperatura: Medio Ambiente 15 Agua 16 (sólo para agua)

PH: 8 (sólo para agua)

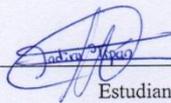
Observación:

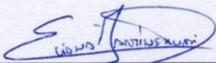
Presencia de animales en los cultivos:

Viviendas colindantes:

Otra fuente que se considere contaminación: Cuál: Resechos comunes

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”

N° de muestra: 04

Nombre del estudiante: Irishka Kasandra Tipaño Pillejo

Fecha: 09-07-2019

Muestra: Agua Producto Agrícola _____ Río: Guamate

Muestra tomada en (lugar): Rondador Molino (Chakrawasi)

Temperatura: Medio Ambiente 15 Agua 12 (sólo para agua)

PH: 8 (sólo para agua)

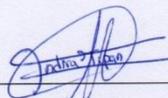
Observación:

Presencia de animales en los cultivos:

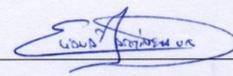
Viviendas colindantes:

Otra fuente que se considere contaminación: Cuál: Resechos Comunes

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”

N° de muestra: 05

Nombre del estudiante: Indira Kasandra Tipiño Pillajo

Fecha: 09-07-2019

Muestra: Agua Producto Agrícola _____ Río: Guamate

Muestra tomada en (lugar): Copallito (Borclan)

Temperatura: Medio Ambiente 18 Agua 14 (sólo para agua)

PH: 7 (sólo para agua)

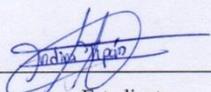
Observación:

Presencia de animales en los cultivos:

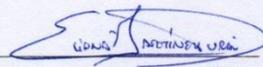
Viviendas colindantes:

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: 06

Nombre del estudiante: Jadira Kasandra Tijón Pilayo

Fecha: 09-07-2019

Muestra: Agua Producto Agrícola _____ Río: Guamate

Muestra tomada en (lugar): Puente de Guaminche

Temperatura: Medio Ambiente 13 Agua 13 (sólo para agua)

PH: 8 (sólo para agua)

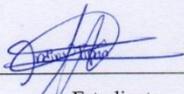
Observación:

Presencia de animales en los cultivos: _____

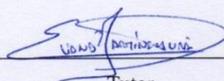
Viviendas colindantes: _____

Otra fuente que se considere contaminación: _____ Cuál: _____

Realizado por:



Estudiante



Tutor

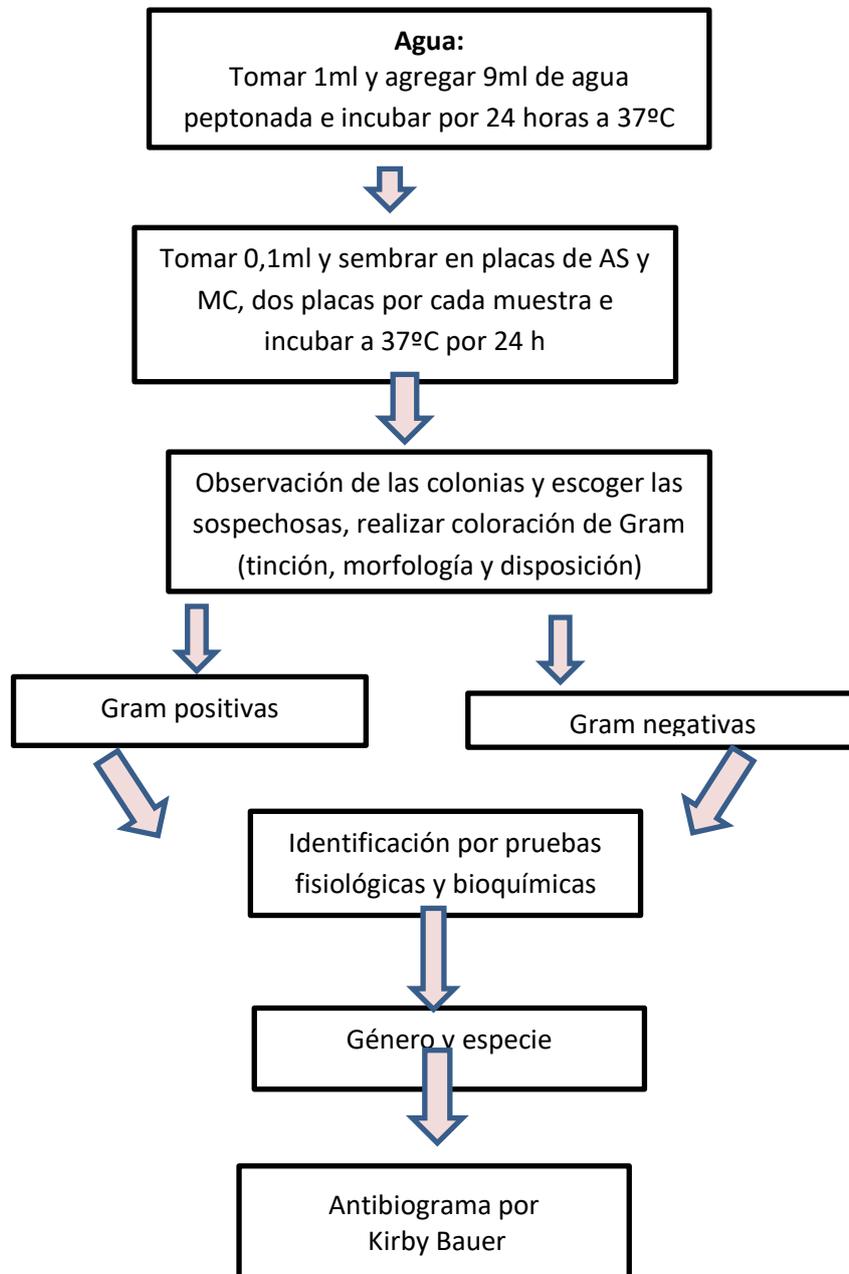
Anexo N°3:

Protocolo para el procesamiento de muestras en agua de
río

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 agua de los regadíos del río Guamote en frasco estéril.



Anexo N°4:

Resultados de antibiograma con interpretación según guía
internacional CLSI

Anexo N°4: Resultados del antibiograma realizado a las bacterias gramnegativas de interés clínico conjuntamente con su interpretación según la guía de internacional CLSI 2019.

Código	Microorganismo	mm/ Int	CN	K	CT	TE	CIP	NA	SXT	CRO	CAZ	IPM	VA	ATM	AZM	AX	AMC	FOX	P	CTX
1.1	<i>K. pneumoniae</i>	mm	10	17	13	30	38	34	24	36	26	25	-	38	22	0	0	0	-	32
		Int.	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	R	R	R	-	S
1.2	<i>K. pneumoniae</i>	mm	15	15	14	30	33	22	8	26	27	24	-	24	24	0	0	0	-	25
		Int.	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	-	S	S	R	R	R	-	I
1.3	<i>K. pneumoniae</i>	mm	17	18	14	28	32	32	17	28	26	29	-	35	23	0	0	0	-	32
		Int.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	R	R	R	-	S
2.1	<i>C. amalonaticus</i>	mm	20	20	16	29	39	28	28	35	36	37	-	40	17	20	-	28	-	-
		Int.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	-	S	-	-
2.2.1	<i>C. amalonaticus</i>	mm	17	18	16	32	34	32	23	33	28	32	-	38	21	25	-	23	-	-
		Int.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	-	S	-	-
2.3	<i>C. amalonaticus</i>	mm	19	19	17	22	35	23	22	36	34	35	-	40	21	26	-	24	-	-
		Int.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	-	S	-	-
3.1	<i>K. oxytoca</i>	mm	17	18	13	25	33	21	26	29	25	26	-	32	15	0	0	0	-	30
		Int.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	R	R	R	-	S
3.2	<i>Aeromonas spp.</i>	mm	16	17	15	30	32	33	21	34	26	20	-	38	31	0	-	-	-	-
		Int.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	-	S	S	R	-	-	-	-

3.3	<i>C. amalonaticus</i>	mm	16	15	15	29	23	0	17	42	30	21	-	42	23	7	-	-	-	-
		Int.	S	I	S	S	I	R	S	S	S	I	-	S	S	R	-	-	-	-
4.1	<i>P. mirabilis.</i>	mm	17	19	0	7	32	22	20	34	32	28	-	36	8	29	-	-	-	-
		Int.	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	-	S	R	S	-	-	-	-
4.2	<i>C. amalonaticus</i>	mm	17	17	14	24	32	24	26	30	26	30	-	32	18	24	-	-	-	-
		Int.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	-	-
4.3	<i>Aeromonas spp.</i>	mm	16	15	14	29	40	36	21	26	21	20	-	36	22	8	-	-	-	-
		Int.	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	-	S	S	R	-	-	-	-
5.1	<i>P. mirabilis.</i>	mm	19	21	0	8	34	23	8	28	32	27	-	36	9	28	-	-	-	-
		Int.	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	-	S	R	S	-	-	-	-
5.2	<i>P. mirabilis.</i>	mm	17	18	0	8	21	10	15	24	32	21	-	28	11	14	-	-	-	-
		Int.	S	S	R	R	R	R	I	S	S	I	-	S	R	I	-	-	-	-
5.3	<i>P. mirabilis.</i>	mm	17	16	15	8	23	21	0	31	20	22	-	40	10	30	-	-	-	-
		Int.	S	I	S	R	I	S	R	S	I	I	-	S	R	S	-	-	-	-
6.1	<i>P. vulgaris</i>	mm	17	18	0	5,5	28	20	22	34	30	26	-	35	8	13	-	-	-	-
		Int.	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	-	S	R	R	-	-	-	-
6.2	<i>C. diversus</i>	mm	17	17	13	17	30	21	25	26	24	29	-	26	14	0	-	-	-	-
		Int.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	R	-	-	-	-
6.3	<i>C. diversus</i>	mm	16	17	15	8	31	25	22	32	28	30	-	34	22	28	-	-	-	-
		Int.	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	-	-	-	-

GE: Gentamicina; **K:** Kanamicin; **CT:** Colistin; **TE:** Tetraciclina; **CIP:** Ciprofloxacino; **AN:** Ácido Nalidíxico; **STX:** Trimetroprim; **CRO:** Ceftriazone; **CAZ:** Cefotaxidima;
IPM: Imipenem; **VA:** Vancomicina; **ATM:** Aztreonam; **AZM:** Azitromicina **AX:** Amoxicilina; **AMC:** Amoxicilina/A. Clavulánico; **FOX:** Cefoxitin; **P:** Penicilina;
CTX: Cefotaxima; **Resistencia Natural:** **Resistencias antimicrobianas:**

Fuente: Datos obtenidos de muestras de agua del río Guamote, 2019.

Anexo N°5:

Resultados de antibiograma de Gram positivos con
interpretación según guía internacional CLSI

Anexo N°5: Resultados del antibiograma realizado a la bacteria grampositiva de interés clínico conjuntamente con su interpretación según la guía de internacional CLSI 2019.

Código	Microorganismo	mm/ Int	CN	K	TE	CIP	VA	AX	P
2.2.2	<i>Enterococcus spp.</i>	mm	23	25	28	26	17	28	20
		Int.	S	S	S	S	S	S	S

K: Kanamicin; **TE:** Tetraciclina; **CIP:** Ciprofloxacino; **VA:** Vancomicina; **AX:** Amoxicilina; **P:** Penicilina; **GE:** Gentamicina de baja carga

Fuente: Datos obtenidos de muestras de agua del río Guamote, 2019.

Anexo N°6:

Interpretación de zona de inhibición para
Enterobacteriaceae y Enterococcus según el CLSI

- 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

Reduccion
 OK

Tabla 2ª. 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
Ampicillin/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 CRO	30	≥ 26 ≥ 23	23 -25 20 -22	≤ 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
Tetreaciclina	TE		≥ 15	12 -14	≤ 11

Aztreonam

≥13 - ≤12

Amoxicilina → con el diámetro de la Ampicilina

Anexo N°7:

Artículo sobre los principales mecanismos de resistencia
antibiótica

35 Principales mecanismos de resistencia antibiótica

R. Vignoli, V. Seija

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un tema amplio, que puede ser considerado desde distintos ángulos. Queremos resaltar tres perspectivas fundamentales, pues consideramos que el futuro médico debe saber en todo momento a que nos estamos refiriendo en cada uno de ellos, para darle la interpretación correcta a la información que habitualmente le llega a las manos, ya sea a través de las comunicaciones científicas, como de los informes del laboratorio. De este modo podemos referirnos a mecanismos de resistencia individuales, resistencia poblacional y resistencia poblacional en microorganismos que están produciendo una infección.

Resistencia individual: se refiere a la interacción molecular entre una célula bacteriana con todo su arsenal genético y metabólico, y un antibiótico determinado.

Se estudian aquí las distintas herramientas con que cuenta una bacteria para evitar la acción del antibiótico en cuestión. Al referirnos a arsenal genético y metabólico queremos señalar que no siempre es suficiente con que el microorganismo posea un gen que codifica un mecanismo de resistencia en particular. Ese gen o esos genes deben ser expresados en cantidad y calidad suficiente, y muchas veces deben interactuar distintos mecanismos de resistencia para alcanzar la supervivencia bacteriana. Como ejemplo se puede destacar la expresión en *E. coli* de su betalactamasa de clase C (tipo Amp-C). El gen que codifica para esta enzima capaz de romper distintos antibióticos betalactámicos (ver más adelante) se encuentra naturalmente codificado en el cromosoma de dicha bacteria, sin embargo la expresión de esta enzima es mínima debido a que este microorganismo carece del promotor natural (Amp-R). De este modo, si bien *E. coli* posee un gen capaz de producir un efectivo mecanismo de resistencia, su escasa expresión (asociada a la acción residual de algún promotor que se encuentre corriente arriba en el cromosoma bacteriano) hace que el microorganismo pueda comportarse como sensible a ampicilina.

Resistencia poblacional: representa el comportamiento in vitro de un inóculo bacteriano preestablecido (una población bacteriana) enfrentado a determinada concentración de un antibiótico, por un período de tiempo determinado. Estos son los tipos de estudios que en general se realizan en el laboratorio clínico. Los resultados finales de estos estudios darán un informe de sensibilidad o resistencia, que son muy importantes para la orientación terapéutica del paciente, pero que no siempre coinciden con el éxito terapéutico. Así, en un paciente que presenta una infección urinaria baja (cistitis) producida por una cepa de *E. coli*, en ocasiones puede obtenerse un tratamiento eficaz con ampicilina, pese a que los estudios in vitro muestran que es resistente a la misma. Esto es debido a que los betalactámicos se concentran

más de 100 veces en la vejiga que en el plasma, por lo que alcanzan niveles que exceden las posibilidades de resistencia bacteriana. En el otro extremo, un coco grampositivo como *S. aureus* o *S. pneumoniae*, que in vitro es sensible a eritromicina, no puede ser combatido con este antibiótico si se encuentra produciendo una bacteriemia, debido a que los macrófidos alcanzan una concentración plasmática insuficiente.

Resistencia poblacional en microorganismos que están produciendo una infección: en este caso hablamos de eficacia terapéutica y juegan otros factores, como el sitio de infección, las propiedades farmacocinéticas del antibiótico (donde se encuentran incluidas la dosis y el fraccionamiento diario del mismo), el estado inmunológico del paciente, el tamaño del inóculo bacteriano, etc. La recuperación del estado de salud del paciente, es el parámetro que determina la efectividad del tratamiento.

Estos tres conceptos forman peldaños de una escalera que se debe transitar para alcanzar el objetivo final, que es la erradicación de una enfermedad infecciosa de origen bacteriano, en un paciente en particular. Dado que los antibióticos van a actuar directamente sobre el microorganismo productor de la infección (y por defecto también contra la flora normal), parece lógico pretender que el estudiante de medicina deba entender las bases de la interacción antibiótico-microorganismo, para que más adelante en la carrera pueda diseñar planes terapéuticos con el menor costo posible. Solo por este capítulo vamos a considerar que el único costo en cuestión es la aparición de resistencia bacteriana.

Precisamente la interacción antibiótico-bacteria se refiere al juego entre los mecanismos de acción de los antibióticos y los mecanismos de resistencia bacterianos.

El primer componente de este binomio ya fue analizado en el capítulo 34, por lo que en esta instancia nos referiremos a los mecanismos de resistencia bacterianos a los antibióticos.

Tipos de resistencia

La resistencia antibiótica puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. Por ejemplo, todos los gérmenes gramnegativos son resistentes a la vancomicina, y esta situación no es variable. La resistencia adquirida es variable y es adquirida por una cepa de una especie bacteriana. Así, existen cepas de neumococo que han adquirido resistencia a la penicilina, cepas de *Escherichia coli* resistentes a la ampicilina, cepas de estafilococos resistentes a la metilicina. Esta resistencia adquirida es la que estudiamos en el laboratorio e informamos al clínico. La resistencia adquirida es la que puede llevar a un fracaso terapéutico cuando se utiliza un antibiótico supuestamente activo sobre el germen que produce la infección.

Genética de la resistencia

Las bacterias son capaces de adquirir resistencia en función de su variabilidad genética.

Nuevos mecanismos de resistencia pueden ser adquiridos mediante mutación o mediante transferencia de material genético entre células bacterianas de especies relacionadas o diferentes. Estos genes de resistencia pueden estar codificados en el material genético cromosómico o extracromosómico (plásmidos). Tener presente estos elementos tiene implicancias epidemiológicas e incluso en algunos casos terapéuticas, como se verá más adelante.

SISTEMATIZACIÓN

La gran mayoría de los mecanismos de resistencia pueden agruparse en tres categorías.

primera y la última la realizan enzimas con actividad transglicosilasa y transpeptidasa (más conocidas como PBP de Penicilin Binding Protein), que se encuentran ubicadas en la membrana citoplasmática con su sitio activo hacia el espacio periplásmico. Las principales PBP denominadas en general PBP I, II y III (debido a que son las de mayor peso molecular), tienen en sus extremos carboxi y amino terminal las funciones transpeptidasas y transglicosilasas. Sin embargo, solo la función de transpeptidasa es inhibible por betalactámicos. La separación del lípido II se produce por acción de una pirofosfatasa que rompe el enlace pirofosfato, dejando al bactoprenol libre para comenzar otra vez el ciclo (figura 3).

Las transpeptidasas reconocen la estructura estereoquímica del dipéptido Dala-Dala, y mediante clivaje de la última alanina liberan la energía necesaria para realizar el entrecruzamiento con el mDAP en gramnegativos o el puente peptídico intermediario de los grampositivos. La regulación de este mecanismo de síntesis es de modo tal, que la inhibición de la transpeptidación inhibe todo el mecanismo de síntesis de pared.

MECANISMOS DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS

Los tres grandes mecanismos ya descritos pueden ponerse en juego; trastornos en la permeabilidad, alteración del sitio blanco de acción e hidrólisis enzimática.

Los trastornos de permeabilidad se corresponden fundamentalmente con la disminución de la expresión de porinas. Como ya se ha dicho, no es un mecanismo que por sí mismo promueva altos niveles de resistencia, pero puede ser muy importante en conjunción con distintos tipos de betalactamasas.

Modificación del sitio blanco de acción: como ya fue dicho, el sitio blanco de los betalactámicos son las diferentes PBP. La información genética de estas proteínas se encuentra codificada en el genoma bacteriano y no en plásmidos. Sin embargo, elementos que regulan la expresión de esos genes sí puede ser codificada en un plásmido. Pueden distinguirse distintas alternativas para que se produzca una PBP que presente menor afinidad por los antibióticos. La expresión de un gen alternativo, que codifique una PBP básicamente distinta a la existente, es el caso de *S. aureus* meticilinorresistente, donde la expresión del gen *mecA* produce una PBP alternativa PBP2' que es menos afín a la totalidad de los betalactámicos. Con esto se quiere decir que la expresión del gen *mecA* genera la resistencia a la totalidad de los betalactámicos, independientemente de los resultados in vitro. Este sería el típico caso donde la regulación es mediada por plásmidos.

Formación de genes mosaico, por incorporación de fragmentos de material genético de otro microorganismo: este proceso generado por transformación y recombinación homóloga, genera genes en parches, cuya secuencia queda constituida en parte por la información preexistente, y en parte por la recientemente adquirida. Ejemplos de esto son algunas de las PBP de *S. pneumoniae* resistente a penicilina y las PBP modificadas de *Neisseria gonorrhoeae*, donde se han detectado fragmentos con secuencias de alta homología con las PBP de *N. lactamica*.

Hidrólisis enzimática: este mecanismo implica la inactivación de los betalactámicos como consecuencia de la acción de enzimas que reciben el nombre de betalactamasas, y es el principal mecanismo de resistencia a betalactámicos. Estas enzimas son un claro ejemplo de la plasticidad de la genética bacteriana. Probablemente originadas de un reducido grupo de enzimas cromosómicas, constituyen hoy una familia de proteínas de gran disimilitud, que ha requerido numerosas clasificaciones con el intento de poderlas agrupar. Las evidencias disponibles tienden a asignarle en un comienzo, alguna función particular en la síntesis de pared, sobre todo en bacterias gramnegativas. Estas hipótesis surgen de experimentos realizados en *Salmonella*, la cual no codifica en su cromosoma betalactamasas de clase C. Cuando se

Por último *vanZ* confiere resistencia a teicoplanina, por un mecanismo no dependiente de la modificación del pentapéptido, aún desconocido.

La codificación de estos genes esta asociada a un trasposón, y se la encuentra tanto en el cromosoma como en plásmidos. Este tipo de resistencia se corresponde con cambios en el sitio blanco.

QUINOLONAS E INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL ADN

Mecanismo de resistencia: básicamente son de dos tipos, por alteración del sitio blanco y por alteración de la permeabilidad. En los últimos años se ha descrito un mecanismo de resistencia plasmídico y trasmisible, que consiste en la acción de una proteína producto del gen *qnr*, que actuaría bloqueando el sitio blanco de acción. Las alteraciones del sitio blanco se producen por mutación espontánea a nivel cromosómico por alteración de una de las subunidades de la enzima denominada A (la ADN girasa está constituida por dos subunidades A y dos subunidades B). Estas enzimas mutadas tienen menor afinidad por el antibiótico. La aparición de una mutación puntual tiene una probabilidad de ocurrencia de 1×10^{-6} a 1×10^{-9} y es en sí un fenómeno estocástico, independiente de la presencia de antibióticos. La presión de selección que ejercen estos, favorecen la diseminación y prevalencia de aquellas cepas más adaptadas a las condiciones que le impone el fármaco.

Las alteraciones de permeabilidad incluyen la modificación de expresión de porinas y un sistema de bombas de eflujo que promueve la excreción del fármaco hacia el medio extracelular. Estas bombas descritas primero para grampositivos, también se hallan en gramnegativos asociadas a porinas de la membrana externa, lo que genera un canal directo entre el citoplasma y el exterior, evitando el espacio periplásmico. La energía de activación depende de un contrartransporte de protones, y como ya se ha dicho, constituyen un mecanismo inespecífico de multiresistencia, que incluye resistencia a tetraciclinas, eritromicina, cloranfenicol y quinolonas. Este sistema es habitualmente utilizado por las bacterias para la exportación de diversas sustancias como toxinas (por ejemplo hemolisinas) y sideróforos.

AMINOGLUCÓSIDOS

Mecanismos de resistencia: los tres grandes mecanismos de resistencia ya nombrados son encontrados contra estos antibióticos. El más importante es la inactivación enzimática, seguido por alteración de la permeabilidad y lejos en tercer lugar, limitado a la estreptomycinina y la espectinomycinina, puede observarse una mutación puntual en el sitio de acción de estos agentes, la proteína de la subunidad 30s denominada proteína S12.

Inactivación enzimática: diversas enzimas pueden inactivar estos antibióticos por acción a distintos niveles. Así, pueden acetilar, adenilar o fosforilar, por intermedio de acetiltransferasas, adeniltransferasas y fosfortransferasas. Estas enzimas tienen un perfil diferente de aminoglucósidos sobre los que actúan, pero la presencia de más de una enzima dificulta este análisis, incluyendo la aparición de enzimas bifuncionales como las presentes en enterococos que poseen actividad de acetil y fosforiltransferasas. Las enzimas pueden ser cromosómicas o plasmídicas y se expresan constitutivamente, independientemente de la presencia de antibiótico.

La inactivación enzimática se produce en el proceso de transporte del antibiótico hacia el interior de la célula para alcanzar el ribosoma. La resistencia a cada aminoglucósido es el resultado del balance entre dos velocidades: la de captación intracelular y la de inactivación enzimática. La velocidad de inactivación depende de la afinidad de la enzima por el antibiótico. La resistencia a los aminoglucósidos tiene una incidencia variable a nivel mundial, debido al predominio diferente de las enzimas inactivantes como consecuencia de la presión

de selección ejercida por el uso de determinados aminoglucósidos. El predominio de enzimas que inactivan la estreptomycin y kanamicina ha llevado a desplazar el uso de estos fármacos. En general la mayor incidencia de resistencia se da en enterobacterias.

Alteraciones de la permeabilidad: los aminoglucósidos entran a la célula bacteriana por un mecanismo complejo que implica la adherencia a moléculas de carga negativa, como residuos del LPS, cabezas polares de fosfolípidos y proteínas aniónicas de membrana externa. Luego de esta adherencia por rearreglo del LPS se produce la entrada al espacio periplásmico del agente. Al llegar a la membrana citoplásmica se produce el ingreso al citoplasma, por un sistema de transporte acoplado al gradiente protónico. Dicho gradiente depende de la actividad de las cadenas respiratorias aerobias, lo cual explica la inactividad de estos agentes frente a anaerobios. Precisamente las modificaciones de este gradiente electroquímico, dificultan la entrada del agente a la célula. Mutaciones cromosómicas espontáneas, generan alteraciones de este potencial o de la cadena de electrones.

MACRÓLIDOS

Mecanismos de resistencia: básicamente implican los grandes mecanismos ya mencionados. En bacilos gramnegativos donde el fármaco no es muy activo, se observan trastornos en la permeabilidad. El mecanismo de eflujo activo ya ha sido mencionado y es mediado por plásmidos. Dos tipos de alteraciones del sitio blanco pueden producir resistencia a macrólidos: a) mutaciones puntuales a nivel cromosómico de la proteína L15; b) inducción de una enzima metilante que metila el ARNr 23s de la subunidad mayor, lo que altera la afinidad del receptor no solo por los macrólidos, sino también por lincomicinas y estreptograminas. Estos antibióticos son químicamente diferentes pero comparten mecanismos de acción y de resistencia, así como cierto espectro de acción. Este mecanismo puede encontrarse asociado a plásmidos y trasposones.

Por último, se ha detectado inactivación enzimática por estererasas o fosfotransferasas fundamentalmente en enterobacterias, aunque se desconoce su importancia clínica.

Bibliografía

- Ayala J. Genética molecular de la pared microbiana. Nuevos blancos susceptibles de inhibición. En: Vicente M, editor. Avances en Ingeniería Genética. Series Nuevas Tendencias. —. Madrid:CSIC; 1994;9191-224.
- Matagne A, Lamotte J, Frere J. Catalytic properties of Class A b lactamases: efficiency and diversity. *BiochemJ.* 1998;330:581-98.
- —. Mecanismos de resistencia. En: Madel, Douglas, Bennet, editores. Principles and Practice of Infectious Diseases. 4ta ed. —;—;—.
- Medeiros A. Quality and Resistance. *Clinical Microbiology and Infection. Update b-lactamases.* 1997;3(sup 4):452-459.
- Rasmussen B, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing b-lactamases Antimicrob. Agents. *Chemotherm.* 1997 Feb;41(2):223-32.
- Wang Z, Fast W, Valentine A, Bencovic S. Metallo b lactamase: Structure and mechanism. *Current opinion in Chemical Biology.* 1999;3:614-22.

Anexo N°8:

Resistencia intrínseca de las Enterobacterias según las zonas de inhibición (Enterobacterias, No Enterobacterias y *Enterococcus* spp.,) correspondiente al CLSI 2019

Appendix B
Intrinsic Resistance

Appendix B. Intrinsic Resistance

Intrinsic resistance is defined as inherent (not acquired) antimicrobial resistance, which is reflected in wild-type antimicrobial patterns of all or almost all representatives of a species. Intrinsic resistance is so common that susceptibility testing is unnecessary. For example, *Citrobacter* spp. are intrinsically resistant to ampicillin.

These tables can be helpful in at least three ways: 1) they provide a way to evaluate the accuracy of testing methods; 2) they aid in the recognition of common phenotypes; and 3) they can assist with verification of cumulative antimicrobial susceptibility test data. In the tables, an "R" occurring with an antimicrobial agent/organism combination means that strains should test resistant. A small percentage (1% to 3%) may appear susceptible due to method variation, mutation, or low levels of resistance expression.

Each laboratory should decide which agents to test and report in consultation with institutional leaders representing infectious diseases practitioners, the pharmacy and therapeutics and infection control committees of the medical staff, and the antimicrobial stewardship team. If tested, the result for an antimicrobial agent/organism combination listed as having intrinsic resistance should be reported as resistant. Consideration may be given to adding comments regarding intrinsic resistance of agents not tested. See Appendix A, footnote "a."

B1. Enterobacteriaceae

Antimicrobial Agent	Ampicillin	Amoxicillin-clavulanate	Ampicillin-sulbactam	Piperacillin	Ticarcillin	Cephalosporins I: Cefazolin, Cephalexin	Cephams: Cefotaxim, Cefotetan	Cephalosporin II: Cefuroxime	Impenem	Tetracyclines	Tigecycline	Nitrofurantoin	Polymyxin B Colistin	Aminoglycosides
Organism														
<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R						
<i>Citrobacter koseri</i>	R			R	R									
Enterobacter cloacae complex ^a	R	R	R	R	R	R	R	R						
<i>Escherichia coli</i>						There is no intrinsic resistance to β -lactams in this organism.								
<i>Escherichia hermannii</i>	R			R	R									
<i>Hafnia alvei</i>	R	R	R			R	R							
<i>Klebsiella (formerly Enterobacter) aerogenes</i>	R	R	R			R	R	R						
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R				R									
<i>Morganella morganii</i>	R	R				R		R	^b		R	R	R	
<i>Proteus mirabilis</i>						There is no intrinsic resistance to penicillins and cephalosporins in this organism.								
<i>Proteus penneri</i>	R					R		R	^b	R	R	R	R	
<i>Proteus vulgaris</i>	R					R		R	^b	R	R	R	R	
<i>Providencia rettgeri</i>	R					R			^b	R	R	R	R	
<i>Providencia stuartii</i>	R					R			^b	R	R	R	R	^c

Appendix B. (Continued)

B1. Enterobacteriaceae (Continued)

Antimicrobial Agent	Ampicillin	Amoxicillin-clavulanate	Ampicillin-sulbactam	Piperacillin	Ticarcillin	Cephalosporins I: Cefazolin, Cephalexin	Cephams: Cefoxitin, Cefotetan	Cephalosporin II: Cefuroxime	Imipenem	Tetracyclines	Tigecycline	Nitrofurantoin	Polymyxin B Colistin	Aminoglycosides
Organism	There is no intrinsic resistance to β -lactams in these organisms; refer to WARNING below for reporting.													
<i>Salmonella</i> and <i>Shigella</i> spp.	R	R	R			R	R	R				R	R	
<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R			R	R	R				R	R	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	R			R	R	R				R	R	
Abbreviation: R, resistant.														

WARNING: For *Salmonella* spp. and *Shigella* spp., aminoglycosides, first- and second-generation cephalosporins, and cephamycins may appear active *in vitro*, but are not effective clinically and should not be reported as susceptible.

NOTE 1: Cephalosporins III, cefepime, aztreonam, ticarcillin-clavulanate, piperacillin-tazobactam, and the carbapenems are not listed, because there is no intrinsic resistance in *Enterobacteriaceae*.

NOTE 2: *Enterobacteriaceae* are also intrinsically resistant to clindamycin, daptomycin, fusidic acid, glycopeptides (vancomycin, teicoplanin), lipoglycopeptides (oritavancin, telavancin), linezolid, tedizolid, quinupristin-dalfopristin, rifampin, and macrolides (erythromycin, clarithromycin, and azithromycin). However, there are some exceptions with macrolides (eg, *Salmonella* and *Shigella* spp. with azithromycin).

NOTE 3: Information in boldface type is new or modified since the previous edition.

Footnotes

- a. *E. cloacae* complex includes ***Enterobacter asburiae***, ***Enterobacter cloacae***, and ***Enterobacter hormaechei***. Other members of the complex include ***Enterobacter kobei*** and ***Enterobacter ludwigii***, for which antimicrobial susceptibility testing data are not available.
- b. *Proteus* species, *Providencia* species, and *Morganella* species may have elevated minimal inhibitory concentrations to imipenem by mechanisms other than by production of carbapenemases. Isolates that test as susceptible should be reported as susceptible.
- c. *P. stuartii* should be considered resistant to gentamicin, netilmicin, and tobramycin but not intrinsically resistant to amikacin.

Appendix B. (Continued)
B4. Enterococcus spp.

Organism	Antimicrobial Agent	Cephalosporins	Vancomycin	Teicoplanin	Aminoglycosides	Clindamycin	Quinupristin-dalfopristin	Trimethoprim	Trimethoprim-sulfamethoxazole	Fusidic Acid
<i>E. faecalis</i>		R*			R*	R*	R	R	R*	R
<i>E. faecium</i>		R*			R*	R*		R	R*	R
<i>E. gallinarum</i> / <i>E. casseliflavus</i>		R*	R		R*	R*	R	R	R*	R

Abbreviation: R, resistant.

* Warning: For *Enterococcus* spp., cephalosporins, aminoglycosides (except for high-level resistance testing), clindamycin, and trimethoprim-sulfamethoxazole may appear active *in vitro*, but are not effective clinically and should not be reported as susceptible.

NOTE: These gram-positive bacteria are also intrinsically resistant to aztreonam, polymyxin B/colistin, and nalidixic acid.

Anexo N°9:

Evidencias Fotográficas



Imagen 6. Toma de las muestras en los puntos geográficos: A) Chipó Grande B) Chipó Chico C) Guamote D) Rondador Molino (Chakrawasi) E) Copalillo (Rondan) F) Puente de Guaninche.

Fuente: Tipán I., Proyecto “Detección de bacterias de importancia clínica en el agua del río Guamote, 2019”

Imagen 7. Medición del pH del agua del río Guamote



Fuente: Tipán I., Proyecto “Detección de bacterias de importancia clínica en el agua del río Guamote, 2019”

Imagen 8. Colocación de las muestras en el medio de enriquecimiento Agua Peptonada



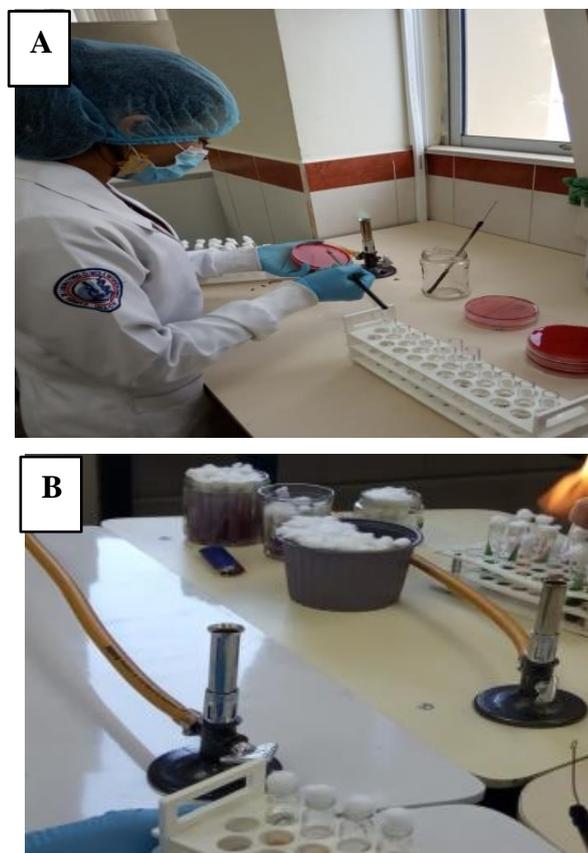
Fuente: Tipán I., Proyecto “Detección de bacterias de importancia clínica en el agua del río Guamote, 2019”

Imagen 9. Siembra de las muestras en Agar Sangre, Mac Conkey y CLED



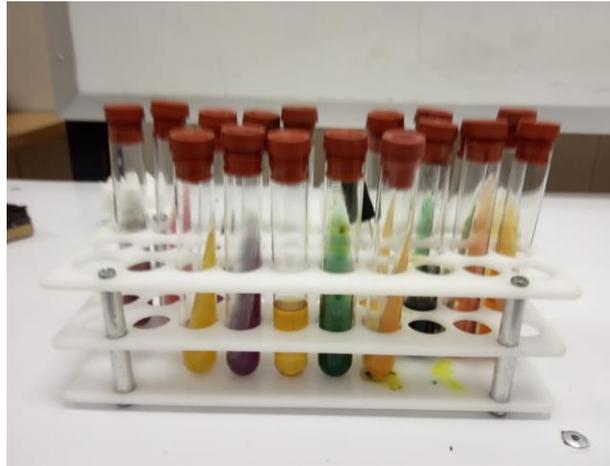
Fuente: Tipán I., Proyecto “Detección de bacterias de importancia clínica en el agua del río Guamote, 2019”

Imagen 10. A) Resiembra y obtención de cepas más puras. B) Siembra de las cepas puras en la batería bioquímica para su identificación correspondiente.



Fuente: Tipán I., Proyecto “Detección de bacterias de importancia clínica en el agua del río Guamote, 2019”

Imagen 11. A) Bateria bioquímica utilizada para la identificación bacteriana: Kligler, LIA, SIM, Citrato, Urea.



Fuente: Tipán I., Proyecto “Detección de bacterias de importancia clínica en el agua del río Guamote, 2019”

Imagen 12 A) Realización de la dilución de la bacteria según la escala de Mac Farland
B) Inoculación y realización del Antibiograma. C) y D) Observación de resultados del Antibiograma y medición de halos de inhibición de los antibióticos



Fuente: Tipán I., Proyecto “Detección de bacterias de importancia clínica en el agua del río Guamote, 2019”

Anexo N°10:

Aprobación del Tema de Proyecto de Investigación



DECANATO FACULTAD
DE CIENCIAS DE LA SALUD

en movimiento



Riobamba, 14 de mayo de 2019
Oficio No. 0491-RD-FCS-2019

Señorita
TIPÁN PILLAJO INDIRA KASANDRA
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. 0491-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(S)	TEMA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO	TEMA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN REVISADO Y/O REFORMADO POR LA COMISIÓN Y CID	ÁREA DEL CONOCIMIENTO O 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
Tipán Pillajo Indira Kasandra	Detección de resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas al hombre en el Río Guamote. Abril – Julio 2019	Detección de bacterias de importancia clínica en el agua del río Guamote, 2019	Área de conocimiento: Ciencias de investigación: Ciencias de la vida Descripción: Microbiología	TUTOR: Lic. Eliana Elizabeth Martínez Durán	Presidente: Mgs. Ximena del Rocío Robalino Flores Miembro Mgs. Yisela Carolina Ramos Campi MsC. Celio Guillermo García Ramírez	APROBADO	Octubre 2015 – Febrero 2016	Abril – Agosto 2019 (8vo Semestre)

Particular que informo para los fines pertinentes.

Atentamente,



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