

**Evaluación de la presencia de resistencia a Ceftriaxona, Amikacina y
Oxacilina en tres microorganismos en vertimientos de agua residual del
Hospital de Suba II Nivel E.S.E en Bogotá**

**NAYIBETH LORENA FLOREZ DUQUE
TATIANA SANCHEZ CORTES**

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BOGOTÁ D.C.
2017**

**Evaluación de la presencia de resistencia a Ceftriaxona, Amikacina y
Oxacilina en tres microorganismos en vertimientos de agua residual del
Hospital de Suba II Nivel E.S.E en Bogotá**

**NAYIBETH LORENA FLOREZ DUQUE
TATIANA SANCHEZ CORTES**

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniera Ambiental

**Director
JOHAN ALEXANDER ÁLVAREZ BERRÍO
Ingeniero Ambiental y Sanitario
Msc. Toxicología**

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

BOGOTÁ D.C.
2017

Nota de aceptación

Firma Director de Tesis

Firma del jurado

Firma del jurado

Dedicatoria

En primer lugar a Dios, por ser la guía en cada una de mis decisiones, por llenarme de paciencia y sabiduría para saber continuar pese a las adversidades.

A mis padres William Sánchez Avendaño y Milena Cortes Ramos, por siempre darme su apoyo incondicional, comprensión y amor, gracias por su esfuerzo y sacrificio para ayudarme a culminar mis estudios, me han enseñado a valorar lo más mínimo, son los mejores padres que existen.

A mi hermana Lina María Sánchez Cortés, la persona que más amo en la vida, la mejor amiga del mundo y a la que siempre querré darle el mejor ejemplo.

A mi compañera de tesis Nayibeth Lorena Flórez Duque, por su dedicación y paciencia a lo largo de la realización de nuestro trabajo de grado, me quedan excelentes recuerdos y una gran amistad.

Tatiana

Dedicatoria

Esta tesis se la dedico a Dios que siempre me mantuvo por buen camino y me puso en el, personas maravillosas que siempre apoyaron para poder continuar.

A mis padres Maritza Duque Bolaños y Wilson Flórez Alvarado, que me dieron fuerzas para nunca desistir a pesar de las adversidades, gracias a sus grandes valores morales me han dado todo lo que soy como persona, mis principios, mi carácter, mi empeño y mi perseverancia para conseguir mis objetivos, porque no perdieron la fe en mí y siempre me apoyaron con los recursos necesarios para cumplir mis sueños.

A mi hermano Jonathan Steven Flórez Duque porque con su amor y comprensión me ayudaron en los momentos difíciles.

A mi compañera de tesis Tatiana Sánchez Cortes porque además de ser una excelente profesional es una gran amiga, que con su compañía lleno de felicidad momentos difíciles, y con su persistencia se logró obtener un buen trabajo.

Lorena

Agradecimientos

Los más sinceros agradecimiento al director de tesis el Ingeniero Johan Alexander Álvarez Berrio, por su esfuerzo, orientación y dedicación, las cuales fueron más que suficientes para el desarrollo de la investigación. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda.

Al docente Rafael Gabriel Barragán González, por sus conocimientos, paciencia, persistencia, manera de trabajar y motivación, fundamentales para el desarrollo de esta investigación de igual forma ha sido capaz de ganarse nuestra admiración y cariño, nos sentimos en deuda por todo lo recibido durante este periodo de tiempo.

A ustedes dos les agradecemos inculcar en nosotras mayor seriedad, responsabilidad y rigor académico, fundamentales para la formación como investigador

A la facultad de estadística de la Universidad Santo Tomas, especialmente al docente Diego Fernando Lemus Polania y al estudiante Edinson Javier Díaz Prieto, por su colaboración y conocimiento para obtener los resultados esperados y satisfactorios.

Al Biólogo Alan Gonzales Abelló, Laboratorista de la universidad Santo Tomas por ser una excelente persona y facilitarnos los materiales y equipos de laboratorio.

Al Médico General Johan Oswaldo Parra Olarte por su colaboración en la adquisición de algunos materiales necesarios para el proceso de la investigación.

A los docentes de la Facultad de Ingeniería Ambiental de la universidad Santo Tomas que contribuyeron a nuestra formación como ingenieras, especialmente al docente Camilo Blanco por brindarnos su asesoría en el ámbito de la salud ambiental, fundamental para dar cumplimiento a nuestros objetivos

A nuestros amigos y colegas por haber hecho de nuestra etapa universitaria un trayecto de vivencia que nunca vamos a olvidar

Finalmente agradecemos a Jonathan Camilo Ortiz, operario de la planta de tratamiento de agua residual en el Hospital de Suba por su acompañamiento y su gran colaboración durante el tiempo de muestreo

Resumen

El Hospital de Suba cuenta con un sistema de tratamiento para los efluentes y lodos provenientes de los servicios médicos allí prestados; razón por la cual se realizó la evaluación de resistencia tomando 12 muestras puntuales de agua residual antes y después del tratamiento; se aplicó el método de dilución y el método de difusión de Kirby–Bauer con el fin de encontrar tres microorganismos resistentes a la Ceftriaxona (CEFT), Amikacina (AMIK) y Oxacilina (OXA); antibióticos comúnmente usados en los centros hospitalarios para tratar infecciones como: la meningitis, infecciones pulmonares, de piel, sangre, huesos, órganos reproductores y vías urinarias.

De acuerdo a los resultados obtenidos el impacto que se da por la descarga de aguas residuales hospitalarias a los medios receptores de las mismas, debido a la difícil degradación de este tipo de contaminantes; genera un problema ambiental y de salud pública. La resistencia microbiana ha venido aumentando debido a la falta de control y vigilancia a nivel global, generando condiciones adecuadas para la propagación de los genes de resistencia de un microorganismo a otro.

Palabras clave: Resistencia bacteriana, antibióticos, Amikacina, Ceftriaxona, Oxacilina, halo de inhibición, planta de tratamiento de agua residual PTAR.

Abstract

The Suba Hospital has a treatment system for effluents and sludges coming from the medical services provided there; for this reason, the resistance evaluation was performed taking 12 spot samples of residual water before and after treatment. The dilution method and the Kirby-Bauer diffusion method were applied in order to find three microorganisms resistant to Ceftriaxone (CEFT), Amikacin (AMIK) and Oxacillin (OXA); Antibiotics commonly used in hospital settings to treat infections such as: meningitis, lung, skin, blood, bone, reproductive and urinary tract infections.

According to the results obtained, the impact of hospital wastewater's discharge to the receiving means of the same, due to the difficult degradation of this type of contaminants; generates an environmental and public health problem. Microbial resistance has been increasing due to the lack of control and surveillance at the global level, generating adequate conditions for the propagation of resistance genes from one microorganism to another.

Keywords: Bacterial resistance, antibiotics, Amikacin, Ceftriaxone, Oxacillin, inhibition halo, wastewater treatment plant WWTP.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Resumen	6
Lista de Imágenes.....	11
Lista de gráficas	12
Lista de tablas.....	13
Lista de ecuaciones.....	14
Lista de abreviaturas y símbolos.....	15
Lista de anexos.....	16
Introducción.....	17
1. Objetivos	19
1.1 Objetivo General.....	19
1.2 Objetivos Específicos	19
2. Marco teórico	20
2.1 Antecedentes	20
2.2 Antibióticos y la resistencia.....	22
2.2.1 Ceftriaxona	22
2.2.2 Amikacina.....	23
2.2.3 Oxacilina.....	23
2.3 Resistencia bacteriana	24
2.3.1 Natural.....	24
2.3.2 Adquirida	24
2.4 Mecanismos de transferencia	25
2.5 Mecanismos de resistencia.....	25
2.6 Bacterias	27
2.6.1 <i>Enterobacter cloacae</i>	27
2.6.2 <i>Pantoea spp</i>	27
2.6.3 <i>Citrobacter freundii</i>	28
2.6.4 <i>Aeromonas hydrophila</i>	29
2.6.5 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	29

2.6.6	<i>Enterobacter gergoviae</i>	30
2.7	Evaluación del riesgo en resistencia microbiana.....	30
3.	Marco legal.....	31
4.	Marco contextual	32
4.1	Ubicación.....	32
4.2	Sistema de tratamiento de agua residual en el Hospital de Suba	33
4.2.1	Entrada.....	34
4.2.2	Caja de aforo	34
4.2.3	Trampa de grasa	35
4.2.4	Tanque de homogenización.....	35
4.2.5	Tanque de ajuste de pH	35
4.2.6	Floculador.....	35
4.2.7	Sedimentador	36
4.2.8	Filtro de arena	36
4.2.9	Filtro de carbón activado	36
4.2.10	Tanque espesador de lodos y prensa de lodos	36
4.2.11	Bomba.....	37
4.2.12	Tanque eyector.....	37
4.2.13	Compresor.....	37
4.2.14	Tablero de control.....	37
5.	Metodología	38
5.1	Revisión y análisis de la información secundaria existente	38
5.2	Diseño experimental	38
5.3	Toma de muestras.....	41
5.4	Cadena de custodia.....	42
5.5	Preparación de medios.....	43
5.6	Preparación del antibiótico para el medio	44
5.7	Dilución seriada	45
5.8	Siembra en los medios	45
5.9	Aislamiento de la bacteria seleccionada	46
5.10	Suspensión del inóculo.....	46
5.11	Método de difusión de discos según Kirby-Bauer	47

5.11.1	Preparación de los discos.....	47
5.11.2	Preparación de medio con los discos	49
5.12	Identificación de las bacterias.....	49
5.13	Implicaciones en el medio ambiente y en la salud.	49
6.	Impacto social.....	54
7.	Resultados	55
7.1	Numero de muestras	55
7.2	Análisis estadístico	55
7.2.1	Análisis estadístico de conteo de bacterias heterótrofas aerobias viales	55
7.2.2	Análisis estadístico del método de difusión.....	60
7.3	Conteo de bacterias heterótrofas aerobias viales	63
7.1.1	Recuento de totales	64
7.1.2	Recuento de resistentes.	65
7.4	Método de difusión	69
7.5	Bacterias identificadas.....	75
7.6	Implicaciones en el medio ambiente y la salud por microorganismos resistentes a los antibióticos.....	76
7.7	Riesgo de prevalencia de bacterias resistentes	78
8.	Análisis de resultados.....	80
9.	Conclusiones	83
10.	Recomendaciones	84
11.	Bibliografía.....	85

Lista de Imágenes

Imagen 1: Tipos de transferencia de resistencia.	25
Imagen 2: Inactivación del antibiótico.	26
Imagen 3: Alteración del sitio blanco.....	26
Imagen 4: Alteración de la barrera de permeabilidad.....	26
Imagen 5: Ubicación del Hospital de Suba II Nivel Empresa Social del Estado.	32
Imagen 6: Diagrama de flujo de la PTAR Hospital de Suba. Fuente: Las autoras.....	34
Imagen 7: Tanque homogenización PTAR.....	35
Imagen 8: Tanque de ajuste de pH.....	35
Imagen 9: Tanque floculador y sedimentador.	36
Imagen 10: Filtro de arena y carbón activado.	36
Imagen 11: Caja de inspección y ducto de agua de salida de la PTAR.....	37
Imagen 12: Toma de muestras en el tanque de almacenamiento de agua residual y caja de inspección de salida de la PTAR.....	41
Imagen 13: Etiqueta para cada una de las muestras de agua residual.	42
Imagen 14: Transporte de muestras de agua desde Hospital de Suba.....	42
Imagen 15: Antibiótico antes y después de su preparación.	44
Imagen 16: Dilución seriada carga bacteriana.	45
Imagen 17: Siembra de las diluciones en los medios.....	45
Imagen 18: Siembra por agotamiento.	46
Imagen 19: Suspensión del inóculo	46
Imagen 20: Análisis de Varianza para un modelo Poisson, reportado por el software R-Project.	57
Imagen 21: Análisis de Varianza para un modelo Poisson, reportado por el software R-Project.	58
Imagen 22: Prueba de Tukey para comparación múltiple entre antibióticos, reportado por el software R-Project.	58
Imagen 23: Prueba de Tukey para comparación múltiple entre puntos de toma de muestra, reportado por el software R-Project.....	59
Imagen 24: Análisis de varianza para el modelo.....	62
Imagen 25: Prueba de Tukey para comparación múltiple entre antibióticos, reportado por el software R-Project	63
Imagen 26: Prueba de Tukey para comparación múltiple entre concentraciones, reportado por el software R-Project.	63
Imagen 27: Representación esquemática de flujo de bacterias resistentes a antibióticos en diferentes ecosistemas y sus áreas de uso.....	78

Lista de gráficas

Gráfica 1: Interacción entre antibiótico y punto de toma de muestra, reportado por el software R-Project.	39
Gráfica 2: Interacción entre punto de toma de muestra y antibiótico, reportado por el software R-Project.	39
Gráfica 3: Interacción entre antibiótico y concentración, reportado por el software R-Project.	40
Gráfica 4: Interacción entre antibiótico y concentración, reportado por el software R-Project.	40
Gráfica 5: Línea de tendencia de la relación entre los tamaños de los halos de inhibición según su concentración.	52
Gráfica 6: UFC/ml de las placas con antibiótico comparadas con las placas sin antibiótico (tratamientos), reportado por el software R-Project.	56
Gráfica 7: UFC/ml con respecto a los puntos de toma de muestra (factores), reportado por el software R-Project.	56
Gráfica 8: Tamaño de los halos de inhibición (cm) comparados entre antibióticos, reportado por el software R-Project.	60
Gráfica 9: Tamaño de los halos de inhibición (cm) comparados entre concentraciones, reportado por el software R-Project.	61
Gráfica 10: Punto óptimo para transformación mediante el cálculo de máxima verosimilitud, reportado por el software R-Project.	62
Gráfica 11: Concentración en UFC/ml en el medio PCA sin antibiótico.	64
Gráfica 12: Concentración en UFC/ml en el medio MacConkey sin antibiótico.	65
Gráfica 13: Concentración en UFC/ml en el medio PCA con Amikacina.	65
Gráfica 14: Concentración en UFC/ml en el medio MacConkey con Amikacina.	66
Gráfica 15: Concentración en UFC/ml en el medio MSA con Amikacina.	66
Gráfica 16: Concentración en UFC/ml en el medio PCA con Ceftriaxona.	67
Gráfica 17: Concentración en UFC/ml en el medio MacConkey con Ceftriaxona.	67
Gráfica 18: Concentración en UFC/ml en el medio PCA con Oxacilina.	68
Gráfica 19: Concentración en UFC/ml en el medio MacConkey con Oxacilina.	68
Gráfica 20: Concentración en UFC/ml en el medio MSA con Oxacilina.	69

Lista de tablas

Tabla 1: Cantidad de gramos por medio de cultivo.	43
Tabla 2: Coeficientes transformados del modelo, reportado por el software R-Project.	60
Tabla 3: Fechas de los muestreos realizados en la PTAR del Hospital de Suba.	64
Tabla 4: Patrones estándar del halo de inhibición.	70
Tabla 5: Orden de las bacterias encontradas.	70
Tabla 6: Resultados método de difusión muestras con mayor concentración de antibiótico.	71
Tabla 7: Caracterización de los halos de inhibición en las muestras con mayor concentración de antibiótico.	72
Tabla 8: Resultados método de difusión muestras con menor concentración de antibiótico.	74
Tabla 9: características de los halos de inhibición en las muestras con menor concentración de antibiótico.	74
Tabla 10: resultados método de difusión muestra de acuario.	75
Tabla 11: Taxonomía de las bacterias identificadas.	76
Tabla 12: Clasificación de algunas enfermedades causadas por las bacterias encontradas.	77
Tabla 13: Calculo de riesgo de prevalencia de bacterias resistentes	79

Lista de ecuaciones

Ecuación 5.1 número de muestras	38
Ecuación 5.2 cantidad de antibiótico en el medio	44
Ecuación 5.3 disolución final AMIK	48
Ecuación 5.4 despeje de la X para AMIK	48
Ecuación 5.5 dilución final CEFT	48
Ecuación 5.6 despeje de la X para CEFT	48
Ecuación 5.7 disolución final OXA	49
Ecuación 5.8 despeje de la X para OXA	49
Ecuación 5.9 dosis individual diaria de microorganismos patógenos a través de algún producto	50
Ecuación 5.10 cálculo del riesgo de prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos ..	50
Ecuación 5. 11 Calculo de riesgo	50
Ecuación 5.12 cálculo de bacterias vivas presentes y t es el tiempo de contacto entre el desinfectante (cloro) y los microorganismos, medido en minutos.	51
Ecuación 5. 13 despeje de la ecuación 5.12 (Calculo de bacterias vivas presentes y t es el tiempo de contacto entre el desinfectante (cloro) y los microorganismos, medido en minutos).....	52
Ecuación 5.14 Cálculo del riesgo de prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos final.....	53
Ecuación 7.1 Riesgo de prevalencia de bacterias resistentes con los valores máximos. .	79
Ecuación 7.2 Riesgo de prevalencia de bacterias resistentes con el resultado del valor máximo.	79

Lista de abreviaturas y símbolos

Abreviaturas y símbolos

Abreviatura/símbolo	Término/unidad
---------------------	----------------

AMIK	Amikacina
CEFT	Ceftriaxona
OXA	Oxacilina
UFC	Unidades formadoras de colonia
PTAR	Planta de tratamiento de agua residual
CMI	Concentración mínima inhibitoria
H	Horas
UE	Unidades experimentales
NC	Nivel de confianza
E.S.E	Empresa Social del Estado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PBP's	Proteínas fijadoras de penicilina
PCA	Plate Count Agar
S	Susceptible
I	Intermedio
R	Resistente
NCr	No creció
°C	Grados Celsius
G	Gramos
ml	Mililitros
Mg	Miligramos
µg	Microgramos
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
IRA	Infecciones Respiratorias Agudas
ITU	Infecciones de Tracto Urinario
Rpbr	Riesgo de prevalencia de bacterias resistentes

Lista de anexos

Anexo 1: Procedimiento para la preparación de medios de cultivo.	91
Anexo 2 : Procedimiento para realización de siembras sucesivas por agotamiento y tinción de Gram	94
Anexo 3: procedimiento para preparación de solución salina, turbidez 0,5 de MacFarland y suspensión del inóculo.....	97
Anexo 4: Procedimiento para la identificación de las bacterias	<u>100</u>

Introducción

La resistencia a los antibióticos por parte de los microorganismos compromete la prevención y el tratamiento eficaz de infecciones causadas por bacterias, sin duda alguna esta es una amenaza a la salud pública mundial ya que los mecanismos de resistencia se extienden a nivel internacional y requieren de la adopción de medidas por parte de todos los sectores gubernamentales [1] [2].

La adecuada utilización de los antibióticos prolonga su tiempo de funcionamiento en el mercado, antes de que aparezcan cepas resistentes; la principal causa de la resistencia a los antibióticos es el uso inapropiado de los mismos. Según diferentes estudios realizados por el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC) el uso inapropiado se produce fundamentalmente de tres formas: primero por la prescripción innecesaria de antibióticos para infecciones virales contra las que no tienen ningún efecto; en segundo lugar por la prescripción demasiado frecuente de antibióticos de amplio espectro y por último el uso inadecuado por parte del paciente, al no respetar la dosis o la duración del tratamiento, permitiendo que algunas bacterias sobrevivan y se vuelvan resistentes, adicionalmente a nivel nacional se pueden adquirir esta clase de fármacos fácilmente sin formula médica, aumentando así los niveles de resistencia [3].

Los hospitales son fuente principal de aparición y propagación de bacterias resistentes a los antibióticos, siendo expulsadas a los cuerpos de agua a través de las redes de alcantarillado, debido a que los sistemas de tratamiento de aguas residuales no cuentan con un proceso óptimo para la eliminación de estos fármacos, facilitando así la creación de transferencia de genes de resistencia y su difusión hacia el medio ambiente, una vez allí, persisten y desarrollan una problemática, especialmente en los cuerpos de agua superficial, a donde son descargados los efluentes con trazas de estos medicamentos [4].

Los antibióticos deben ser considerados como contaminantes importantes debido a que al ser liberados al ambiente natural sin ningún tipo de control, afectan la estructura y la dinámica de las poblaciones microbianas ambientales. Con la incorporación de genes de resistencia se pueden producir cambios relevantes en los microorganismos receptores, debido a que los genes resistentes a estos fármacos pueden persistir y propagarse incluso en ausencia de ellos.

La falta de investigación y la poca disponibilidad de datos cuantitativos fiables acerca de la resistencia microbiana, dejan ver la necesidad urgente para evaluar los

riesgos asociados a la liberación de antibióticos al medio ambiente y las medidas para reducir el impacto de contaminación que generan, así como sus genes de resistencia en el ecosistema [5].

Este proyecto buscó evaluar la presencia de resistencia bacteriana en tres microorganismos presentes en vertimientos de agua residual del Hospital de Suba II Nivel E.S.E en Bogotá a tres antibióticos comúnmente utilizados por esta entidad de salud, efectuando un análisis en el laboratorio de microbiología de la Universidad Santo Tomás.

Se tomaron 12 muestras puntuales antes y después del tratamiento para un total de 24 muestras, durante un periodo de 6 meses y se aplicaron dos metodologías in vitro estandarizadas por el National Commitee for Clinical Laboratory Standars (NCCLS): el método de difusión de Kirby–Bauer para determinar la sensibilidad de los agentes microbianos de acuerdo a su halo de inhibición y el método de dilución, con el fin de encontrar tres microorganismos resistentes. Se aislaron un total de 8 microorganismos que fueron sometidos a tres antibióticos CEF, OXA y AMK.

El impacto que se da por la descarga de aguas residuales hospitalarias a los medios receptores de las mismas, debido a la difícil degradación de este tipo de contaminantes; genera un problema ambiental y de salud pública. La resistencia microbiana ha venido aumentando debido a la falta de control y vigilancia a nivel global, generando condiciones adecuadas para la propagación de los genes de resistencia de un microorganismo a otro [6].

Por los grandes impactos que se generan a través de la resistencia bacteriana a los antibióticos, esta investigación busca contribuir a la necesidad de implementar normatividad que regule y establezca, cuáles deben ser los límites permisibles para los vertimientos de antibióticos, con el fin de disminuir y controlar la aparición y el incremento de resistencia por este tipo de contaminantes emergentes. Actualmente a nivel nacional la resolución 0631 de 2015 es la única que establece los parámetros y los valores límites permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público para los diferentes sectores productivos pero no se cuenta con los límites para fármacos por la tanto los tratamientos de agua residual hospitalaria tampoco son vigilados [7].

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar la presencia de resistencia bacteriana a antibióticos de tres microorganismos presentes en vertimientos de agua residual del Hospital de Suba II Nivel E.S.E en Bogotá.

1.2 Objetivos Específicos

- Determinar la presencia de tres microorganismos en vertimientos de agua residual proveniente de los servicios hospitalarios mediante el aislamiento de estos, implementando siembra por agotamiento y obteniendo un cultivo puro.
- Identificar el perfil de resistencia de tres microorganismos en vertimientos de agua residual frente a los antibióticos de uso común en el Hospital de Suba II Nivel E.S.E.
- Establecer las implicaciones en el medio ambiente y en la salud que se generan por la presencia de tres microorganismos genéticamente resistente en vertimientos de agua residual hospitalarios.

2. Marco teórico

2.1 Antecedentes

Desde 1945, Fleming previó los riesgos potenciales ligados a la utilización de los antibióticos. Temía que su utilización a gran escala seleccionara bacterias resistentes. En su laboratorio, observó que bacterias sensibles a la penicilina al comienzo del experimento conseguían multiplicarse en presencia de concentraciones crecientes del antibiótico, de esta manera constató que las bacterias sensibles habían sido destruidas y las bacterias resistentes se habían multiplicado sin límite [8].

Las bacterias patógenas de la época pre-antibióticos eran raramente resistentes, actualmente el 70% de las bacterias responsables de las infecciones nosocomiales¹ son resistentes al menos a uno de los antibióticos más comúnmente utilizados para tratarlas. Las infecciones causadas por bacterias multiresistentes causan una amplia morbilidad y mortalidad. En los años 80, se demostró que los *Enterococos* podían adquirir una resistencia a antibióticos como es el caso de los aminoglucósidos (entre los que se encuentra la Vancomicina, uno de los más potentes). Más tarde se detectaron resistencias a la ampicilina y la lista fue creciendo [8] [9].

El consumo masivo de antibióticos en los últimos 50 años ha creado un ambiente favorable a la selección de bacterias que soportan los efectos tóxicos de los antimicrobianos. Los cambios en la ecología de las infecciones nosocomiales observadas en los hospitales desde la introducción de los agentes antimicrobianos, han sido ampliamente documentados destacando entre los factores contribuyentes al aumento de la resistencia a los antibióticos; la concentración de la población en centros urbanos, el inadecuado control de las infecciones en los hospitales, la tendencia a internar en hospitales a los pacientes seriamente enfermos y el uso inadecuado de los antibióticos, entre otros [9].

En las últimas dos décadas se han incrementado las investigaciones para explorar las causas y las formas de controlar o prevenir la resistencia a los antibióticos. Estudios basados en diseños epidemiológicos tradicionales, demostraron distintos grados de asociación entre la resistencia a un antibiótico particular y sus niveles de

¹ Enfermedad contraída durante una estancia en un centro de salud. Una infección se considera nosocomial si aparece al menos 48 horas después de entrar en las instalaciones de salud.

consumo. Benavides Lilia, Aldama Leonardo y Vázquez Javier identificaron que del total de 669 aislamientos bacterianos, 86% fue resistente a alguna clase de antibiótico dicho resultado se da en el marco para la vigilancia de los niveles de uso de antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México [9].

Por su parte Martínez José Luis, estableció que la liberación de altas concentraciones de antibióticos y genes de resistencia en los ecosistemas naturales es un acontecimiento reciente en términos evolutivos. Sin embargo, ambos tipos de contaminación pueden afectar la estructura y la actividad de las poblaciones microbianas ambientales. Los antibióticos en la actualidad son considerados como contaminantes importantes, ya que además de ser utilizados para la terapia humana se usan ampliamente para la cría de animales, lo que genera que también en las granjas los residuos pueda contener bacterias con características de resistencia, que contaminan directamente los ambientes naturales [10].

Los genes de resistencia a los antibióticos en el medio acuático son preocupación mundial. Se han encontrado en microorganismos distribuidos en aguas residuales hospitalarias, aguas residuales de producción animal, plantas de tratamiento de aguas residuales, agua subterránea, e incluso en agua potable. [11].

La APUA (Alianza Para el uso Prudente de Antimicrobianos) inició el proyecto de Reservorios de Resistencia a los Antibióticos (ROAR, por sus siglas en inglés) en 1997, con el fin de documentar la investigación global y recopilar información genotípica y fenotípica de bacterias comensales que sirven como reservorios potenciales de determinantes de resistencia antibiótica para patógenos humanos. Este acuerdo de cooperación de varios años con los Institutos Nacionales de Alergia y Enfermedades Infecciosas, representa el primer esfuerzo sistemático para compilar y divulgar información sobre reservorios de bacterias y para examinar el flujo de genes de resistencia de comensales a patógenos. La aparición de resistencia antibiótica en comensales podría servir como marcador o factor de predicción de surgimiento en patógenos [12].

Las bacterias patógenas han evolucionado hacia la resistencia, un aspecto importante y frecuentemente olvidado difiere en que los antibióticos y sus genes de resistencia evolucionaron en entornos no clínicos es decir en ecosistemas naturales como consecuencia de la actividad humana. La contaminación de los ecosistemas naturales por antibióticos y los genes de resistencia, podría traer consecuencias para la evolución de la microbiósfera, considerando que estos fármacos, producen

desafíos locales en las comunidades microbianas ya que los genes de resistencia presentes en la transferencia pueden propagarse en la naturaleza con consecuencias para la salud humana y la evolución de la microbiota, aunque se ignoran en gran medida [13] [14].

2.2 Antibióticos y la resistencia

Los antibióticos, son sustancias químicas específicas derivadas o producidas por los organismos vivos, que incluso en pequeñas concentraciones, son capaces de inhibir los procesos vitales de otros organismos. Los antibióticos son medicamentos potentes que combaten las infecciones bacterianas y constituyen el grupo de fármacos que se prescribe con más frecuencia. El uso de forma repetida e inadecuada de estas sustancias, contribuye a aumentar la resistencia de las bacterias, convirtiéndose en uno de los problemas de salud más acuciantes en el mundo [15] [16] [1].

2.2.1 Ceftriaxona

La Ceftriaxona es un antibiótico de la clase cefalosporinas de tercera generación, por lo que tiene acciones de amplio espectro en contra de bacterias Gram negativas y Gram positivas. Su mecanismo de acción como el de todos los antibióticos betalactámicos es bactericida, inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana al unirse específicamente a las proteínas fijadoras de la penicilina (PBP's), localizadas en dicha pared. Una vez unido a las PBP's estas pierden su capacidad funcional, con lo que la bacteria pierde su capacidad para formar la pared, siendo el resultado final la lisis de la bacteria [17].

Entre las cepas susceptibles se encuentran las *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Providencia*, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, y *N. meningitidis*. Es particularmente intensa la actividad antimicrobiana de la Ceftriaxona frente a las *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, y *Serratia*) [18].

- Farmacocinética

Se administra parenteralmente debido a que no se absorbe por vía digestiva. Después de una dosis intramuscular, las máximas concentraciones séricas tienen lugar entre 1 y 4 horas. Aproximadamente el 35-65% del fármaco se elimina en la orina, principalmente por filtración glomerular. El resto, se elimina a través de la bilis, por vía fecal. Una pequeña cantidad de la Ceftriaxona es metabolizada en los intestinos ocasionando un metabolito inactivo antes de ser eliminada [18].

2.2.2 Amikacina

Es un antibiótico semisintético del grupo de los aminoglucósidos, derivado de la Kanamicina, con acción bactericida. Está indicada en el tratamiento de corta duración de las infecciones bacterianas, causadas por cepas sensibles; tales como: septicemia; infecciones severas del tracto respiratorio; infecciones del sistema nervioso central (meningitis); infecciones intra-abdominales; infecciones de la piel; huesos; tejidos blandos; quemaduras; entre otras infecciones cuyo tratamiento no sea posible con otros antibióticos de menor toxicidad [19] [20]

Como todos los antibióticos aminoglucósidos, la Kanamicina se une a la subunidad S30 del ribosoma bacteriano, impidiendo la transcripción del ADN bacteriano y por tanto, la síntesis de proteínas en los microorganismos susceptibles.

La Amikacina se manifiesta activa "in vitro" frente a los siguientes microorganismos:

Gram-negativos: especies de *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, especies de *Proteus* (indol-positivos e indol-negativos), especies de *Providencia*, especies de *Klebsiella-Enterobacter Serrana*, especies de *Acinetobacter (Mima-Herellea)* y *Citrobacter freundii*.

Gram-positivos: especies de *Staphylococcus* productores y no productores de penicilinas, incluyendo cepas resistentes a la Meticilina. No obstante, la Amikacina es poco activa frente a otros Gram-positivos: *Streptococcus pyogenes*, *Enterococos* y *Streptococcus pneumoniae (Diplococcus pneumoniae)* [19].

- Farmacocinética

Se absorbe rápidamente tras la administración intramuscular. Se excreta sin cambios en la orina entre las 8 horas y las 24 horas siguientes a su administración, un 84% de la dosis administrada se excreta en la orina a las 9 horas y aproximadamente el 94% dentro de las 24 horas.

Su vida media sérica corresponde a un poco más de 2 horas, con un volumen de distribución total aparente de 24 litros (28% del peso corporal). La Amikacina se excreta principalmente por filtración glomerular. Pacientes con alteraciones de la función renal o presión glomerular disminuida excretan el xenobiótico mucho más lentamente debido a la prolongación de la semi-vida sérica [19].

2.2.3 Oxacilina

Es un antibiótico antibacteriano sistémico; penicilinas-resistente perteneciente al grupo de las penicilinas semisintéticas (subgrupo isoxazolil penicilina). Su mecanismo de acción es similar al de resto de las penicilinas actuando sobre la pared celular inhibiendo la biosíntesis de los mucopéptidos de la pared celular. Su espectro se limita a bacterias Gram positivas como por ejemplo: *estafilococos*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* [21] [22].

- Farmacocinética

Se administra parenteralmente y luego de entrar en el torrente circulatorio se une a las proteínas plasmáticas en un 94% para difundirse ampliamente por todos los tejidos, órganos y sistemas, exceptuando el sistema nervioso y el ojo. Es excretada por la orina mediante la filtración glomerular y secreción tubular activa; y por la bilis en gran cantidad. Su promedio de vida media es 1,5 horas [22].

2.3 Resistencia bacteriana

La resistencia a los antibióticos es la resistencia de un microorganismo a un medicamento antimicrobiano al que originalmente era vulnerable. Los organismos pueden resistir ataques de medicamentos de tal forma que los tratamientos convencionales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten, lo que incrementa el riesgo de propagación. La aparición de cepas resistentes es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos se reproducen de forma errónea o se intercambian características de resistencia. Las prácticas inapropiadas de control de las infecciones, las malas condiciones sanitarias y la manipulación inadecuada de antimicrobianos propician la propagación de las resistencias [1].

2.3.1 Natural

Es una propiedad específica de las bacterias y su aparición es anterior al uso de los antibióticos por parte de los humanos, en la resistencia natural todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas [23].

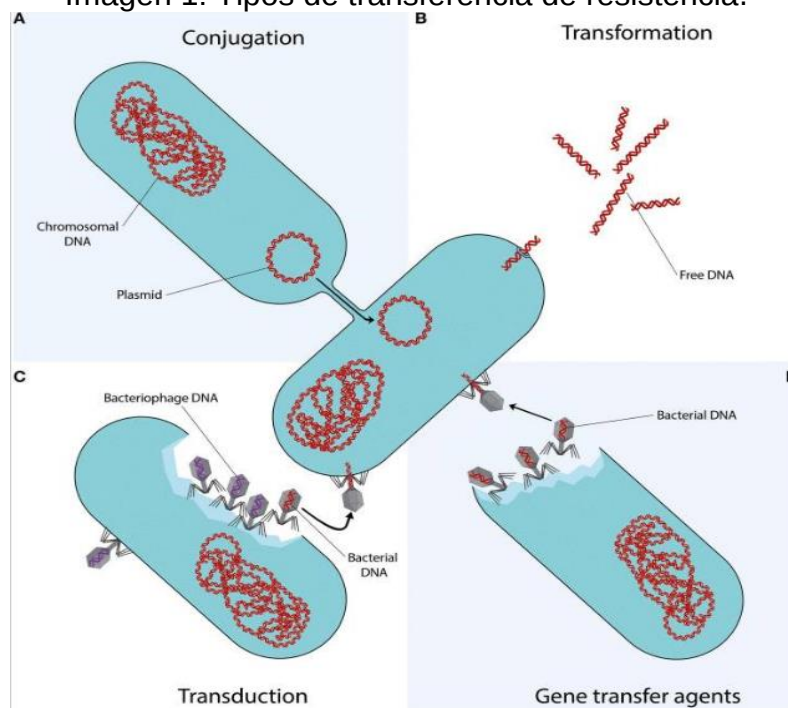
2.3.2 Adquirida

La resistencia adquirida aparece por cambios puntuales en el ADN es decir mediante mutaciones o por la adquisición mediante la transmisión de material genético extra cromosómico procedente de otras bacterias. Constituye un problema en la clínica, se detecta mediante pruebas de sensibilidad [23].

2.4 Mecanismos de transferencia

Existen tres tipos de transferencia: conjugación, transformación y transducción. En la conjugación, se realiza un proceso de célula a célula a través del Pili de la superficie celular por el cual se transfiere ADN (imagen 1, sección A), mientras que en la transformación, realiza una absorción e integración de fragmentos desnudos de ADN extracelular (sección B).

Imagen 1: Tipos de transferencia de resistencia.



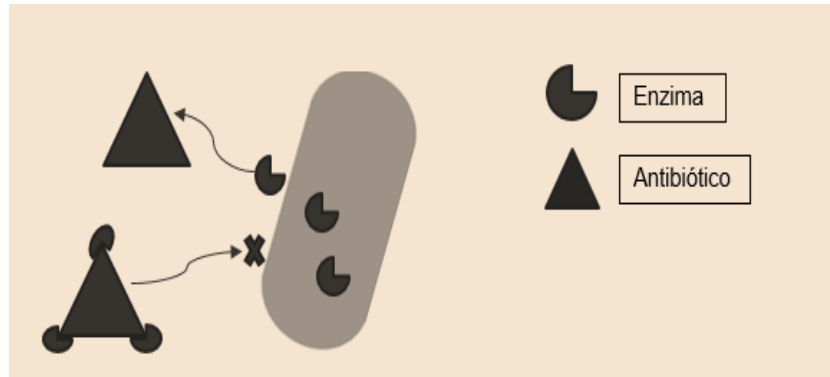
Fuente: [24].

Por otra parte, como se observa en la sección C de la imagen 1, en la transducción, los virus transfieren accidentalmente ADN bacteriológico de una célula anteriormente infectada a otra célula receptora [24].

2.5 Mecanismos de resistencia

Desde el punto de vista molecular y bioquímico existen básicamente tres mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente al efecto del antibiótico a saber. La primera es la inactivación del antibiótico, que se realiza mediante la producción de enzimas que lo hidrolizan, como se muestra en la Imagen 2.

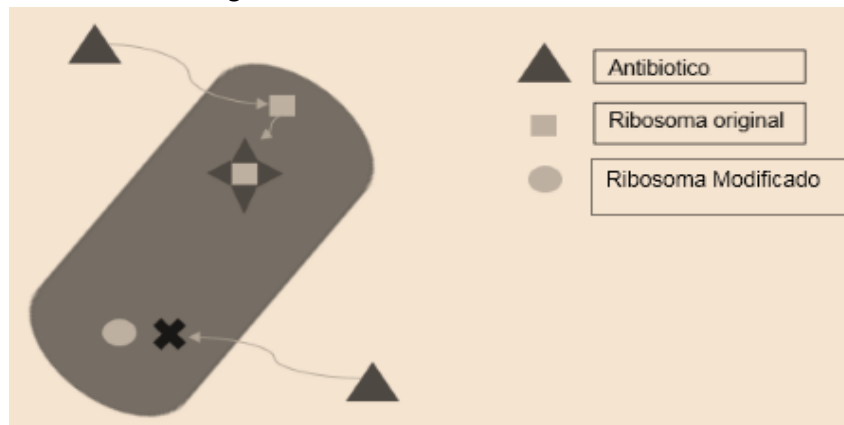
Imagen 2: Inactivación del antibiótico.



Fuente: Las autoras.

Otra forma es la alteración del sitio blanco, es decir se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como: pared celular, subunidades ribosomales 50s y 30S², entre otros (Imagen 3).

Imagen 3: Alteración del sitio blanco.

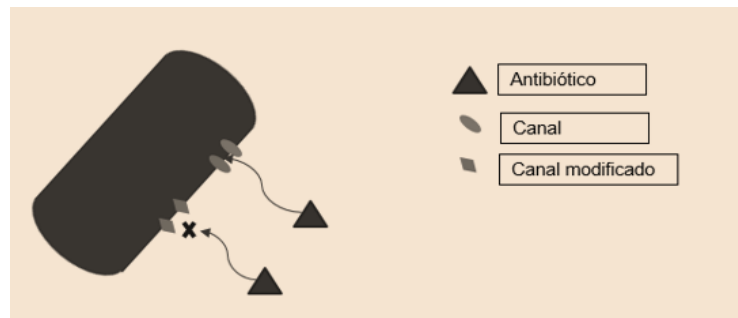


Fuente: Las autoras.

Por último, las barreras de permeabilidad; que consisten en una modificación energética que compromete el transportador aniónico del antibiótico hacia el interior de la célula (Imagen 4). La presencia de capa lipídica en la membrana actúa como un mecanismo de resistencia para medicamentos hidrofóbicos [25].

Imagen 4: Alteración de la barrera de permeabilidad.

² Subunidad mayor y menor respectivamente de los ribosomas en donde se mide su coeficiente de sedimentación



Fuente: Las autoras.

2.6 Bacterias

2.6.1 *Enterobacter cloacae*

La *Enterobacter cloacae* es un bacilo gramnegativo que vive en el tracto gastrointestinal de los seres humanos como parte de una población microbiana normal, ayudando a realizar la digestión. El tratamiento de la infección por *Enterobacter cloacae* es principalmente administrar antibióticos, pero ya que suele desarrollar resistencias y el antibiótico deja de hacer efecto para esa bacteria, es recomendable que se realice una prueba al paciente, llamada antibiograma, para saber a qué antibióticos es sensible [26].

Desde 1992, se ha observado un aumento de la incidencia de en la presencia de enfermedades por esta bacteria en la unidad de cuidados intensivos neonatales, según la investigación realizada por Fernández, Ballesteros, Hervás, Villalón Y Domínguez, en donde un estudio epidemiológico de las cepas colonizadoras e infectantes aisladas de neonatos, mostro que la *Enterobacter cloacae* fue la causa más frecuente de sepsis neonatal, representando el 19,2% de todas las infecciones neonatales [27].

Las infecciones urinarias causadas por esta bacteria son en la vejiga y tracto, en casos severos, la infección podría moverse a los riñones. En cuanto a la vía respiratoria esta bacteria también puede atacar el sistema respiratorio, causando problemas para respirar y neumonía. Por último y la más frecuente; artritis séptica, cuando la *Enterobacter cloacae* ingresa a una articulación, puede producir una forma de artritis [28].

2.6.2 *Pantoea spp*

Es una bacteria Gram negativa descrita ocasionalmente como patógeno en seres humanos; se lo considera un germen oportunista. En cuanto a infecciones por vía

cutánea e han publicado casos de infección localizada por pinchazos con espinas de plantas o astillas, así como casos de peritonitis en pacientes portadores de dispositivos invasivos. En población pediátrica se ha descrito un brote de sepsis por *Pantoea spp* secundario a contaminación de catéteres intravenosos en una sala de observación de urgencias, también causa infecciones respiratorias en pacientes VIH positivo o con otras enfermedades inmunosupresoras [29] [30].

La nutrición parenteral contaminada es una fuente importante de infección en neonatos. En un estudio realizado en Malasia en el año 2004 para investigar un brote causado por *Pantoea spp* en una unidad de cuidados intensivos neonatales, se detectó infección en ocho pacientes durante un período de tres días tras la administración de nutrición parenteral. Siete de los ocho pacientes murieron debido a la infección. Se realizaron extensos muestreos ambientales para el cultivo, en donde todas las cepas de *Pantoea spp* tenían un patrón similar de susceptibilidad a los antibióticos y una reacción bioquímica. Se pudo concluir que la nutrición parenteral fue la fuente del brote y la contaminación pudo haber ocurrido durante su preparación en la farmacia [31].

La *Pantoea spp* causa sepsis neonatal, un cuadro infrecuente pero que reviste mucha gravedad, con una elevada mortalidad asociada. Corresponde hacer hincapié en las medidas de prevención: limitar los días de uso de nutrición parenteral y cuidar su esterilidad, la máxima asepsia en la manipulación de accesos intravenosos, y el uso criterioso de antibióticos [29].

2.6.3 *Citrobacter freundii*

El género *Citrobacter* es un grupo de bacilos gramnegativos aerobios que se encuentran frecuentemente en el agua, suelo, comida y el tracto intestinal de animales y humanos. Se sabe que estos microorganismos pueden producir infecciones importantes, especialmente en huéspedes inmunocomprometidos, también ha sido asociado con epidemias esporádicas de gastroenteritis [32].

El *Citrobacter freudii* causa en el período neonatal sepsis y meningitis con necrosis cerebral extensa abscesos o quistes poroencefalia. Se ha demostrado como causante de epidemias en salas cunas y últimamente se han realizado varios estudios a este respecto. El mecanismo por el cual se desarrolla la epidemia no está completamente claro aunque un factor importante ha sido el papel que juega la contaminación de las manos en el personal ya que pueden servir no solo como vehículo pasivo en la transmisión nosocomial de bacterias Gram negativas sino también pueden constituirse en reservorios de estos organismos [33].

2.6.4 *Aeromonas hydrophila*

Son en su gran mayoría bacilos Gramnegativos fermentadores, este género está ampliamente distribuido en la naturaleza y lo encontramos especialmente en ambientes acuáticos. Ha sido aislado de agua clorada, de agua contaminada y de agua salada [34].

Este tipo de bacteria se asocia con infecciones en heridas, diarreas agudas, septicemia, neumonía e infecciones en el tracto urinario, es un patógeno frecuente para animales acuáticos de sangre fría y animales de agua dulce, Distribuido mundialmente, especialmente cerca de fuentes de agua dulce, su incidencia en enfermedades severas humanas se ha incrementado, y su diagnóstico puede confundirse con coliformes. Este microorganismo se diagnostica poco, probablemente a que los laboratorios no realizan sistemáticamente pruebas de la oxidase [35] [36].

2.6.5 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es un bacilo Gram negativo que habita en el intestino del hombre como parte de su microbiota; sin embargo, *Klebsiella pneumoniae* tipo KPC es un clon especial, productor de una enzima betalactamasa que hidroliza la mayoría de los antibióticos betalactámicos. La bacteria *Klebsiella pneumoniae*, apareció por primera vez hace menos de diez años en el mundo, *Klebsiella pneumoniae* es uno de los principales agentes de infecciones intrahospitalarias, tales como septicemia como infección en la sangre, infecciones del aparato respiratorio y vías urinarias. Su manejo clínico se complica cuando están producidas por cepas resistentes [37] [38].

En cuanto al aislamiento de *K. pneumoniae* se encuentra de forma natural en el suelo, el agua y las verduras. Una parte beneficiosa con esta cepa bacteriana, es la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico en una forma más útil para las plantas, por lo tanto es una bacteria diazotrófica. En los seres humanos, puede ser aislada del tracto, la piel, la faringe y el sistema gastrointestinal. Identificada como un patógeno nosocomial común. Las enfermedades causadas por *Klebsiella*, incluyen la neumonía, infecciones del tracto urinario (ITU) por vía digestiva, la espondilitis anquilosante (artritis inflamatoria degenerativa) y septicemia (inflamación del cuerpo entero).

Klebsiella pneumoniae es el segundo patógeno más virulento, al lado de *E. coli*, que causa infección del tracto urinario. Normalmente afecta a las personas con el

sistema inmunológico bajo, como a los pacientes hospitalizados, pacientes diabéticos y personas con enfermedades pulmonares crónicas [37].

2.6.6 *Enterobacter gergoviae*

Las especies de *Enterobacter* están emergiendo como un importante patógeno nosocomial, dado que frecuentemente colonizan a los pacientes hospitalizados. *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae* se aíslan con cierta frecuencia en pacientes hospitalizados, sin embargo *Enterobacter gergoviae* es un patógeno muy raro en los humanos, así en un estudio reciente se aisló únicamente en un 0,4% de la totalidad de los aislamientos en un hospital de España.

Las infecciones por ésta especie se han asociado frecuentemente a la existencia de factores de riesgo, como son la inmunosupresión, la utilización previa de antimicrobianos y las edades extremas de la vida. También se ha relacionado con estancias prolongadas en el hospital, especialmente en las unidades de vigilancia intensiva. *Enterobacter gergoviae* es un bacilo gramnegativo que causa infecciones nosocomiales, urinarias, pulmonares, bacteriemia asociada a catéteres, también se ha encontrado en contaminación de perfusiones y/o preparados de comida para lactantes y en infecciones de la herida quirúrgica [39].

2.7 Evaluación del riesgo en resistencia microbiana

Es importante mencionar que en la actualidad no existe un modelo que explique el riesgo de la resistencia microbiana en agua residual de hospitales, aunque varios autores e investigaciones si hacen referencia al riesgo existente en aguas residuales y en si al riesgo de resistencia. Las evaluaciones de riesgos microbiológicos generalmente se centran en estimar los riesgos adversos para la salud humana derivados de la exposición a microbios patógenos humanos. Las actividades humanas conducen a la descarga continua de bacterias resistentes a los antibióticos y los genes al medio ambiente, que se acumulan y se extienden sobre diferentes compartimentos ambientales. Las altas cargas de bacterias resistentes a los antibióticos contaminantes descargadas continuamente al medio ambiente y el hecho de que la resistencia contaminante comprende bacterias y genes que coevolucionaron con animales y seres humanos, por lo tanto con mayores posibilidades de colonizar humanos y animales [40] [41].

Algunas bacterias que constituyen el resistoma contaminante pueden tener la capacidad de colonizar seres humanos, y éstos, denominados vectores, son los que son fundamentales para evaluar los riesgos de transmisión de resistencia a antibióticos desde el medio ambiente a los seres humanos [42].

3. Marco legal

En Colombia la resolución 0631 del 2015 establece los parámetros y los valores límites permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de agua y a los sistemas de alcantarillado público para los diferentes sectores industriales pero en la actualidad no existe ningún tipo de legislación que regule, establezca o controle los límites permisibles de antibióticos en las descargas de vertimientos hospitalarios [7].

La falta de control frente al aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos, fue declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un problema de salud pública desde el año 2008. A partir de esto, se han venido generando algunas estrategias no solo a nivel mundial sino a nivel nacional como la generación de guías técnicas que ayuden a tener un mayor control sobre la manipulación de medicamentos como los antibióticos [43].

Si bien, la Resolución 234 de mayo de 2005 reitera la prohibición de la venta de antibióticos sin fórmula médica y se elaboró un documento guía denominado “Uso prudente de antibióticos en instituciones prestadoras de servicios de salud” que aporta los lineamientos para la implementación de programas de uso prudente de antibióticos en instituciones de salud de Bogotá, la legislación colombiana no controla ni sanciona de ninguna manera el vertimiento inadecuado de los mismos, lo que produce que en la mayoría de casos se esté favoreciendo la proliferación de bacterias con genes de resistencia [44].

La Secretaría Distrital de Salud (SDS) de Bogotá, ha venido implementando una política de prevención, vigilancia epidemiológica y control de infecciones intrahospitalarias, adoptada mediante la Resolución 073 de 2008. Actualmente cada institución debe desarrollar un plan de monitoreo y vigilancia de la resistencia que le permita extraer datos locales que colaboren con el control, así mismo se vigilan las dosis suministradas de siete antibióticos a nivel local de los que cada institución de salud debe tener un reporte de unidades dispensadas mensualmente, es importante mencionar que de los antibióticos en estudio solo es controlado la Ceftriaxona [45].

4. Marco contextual

4.1 Ubicación

El proyecto se realizó en el Hospital de Suba II Nivel E.S.E, una institución prestadora de servicios de salud que cuenta con diferentes servicios como urgencias, consulta externa, hospitalización, cirugía, Odontología y laboratorio clínico.

Se encuentra ubicado en la Avenida Ciudad de Cali N° 154^a-00 en la localidad de Suba, noroccidente de Bogotá como se ilustra en la imagen 5.

Imagen 5: Ubicación del Hospital de Suba II Nivel Empresa Social del Estado.

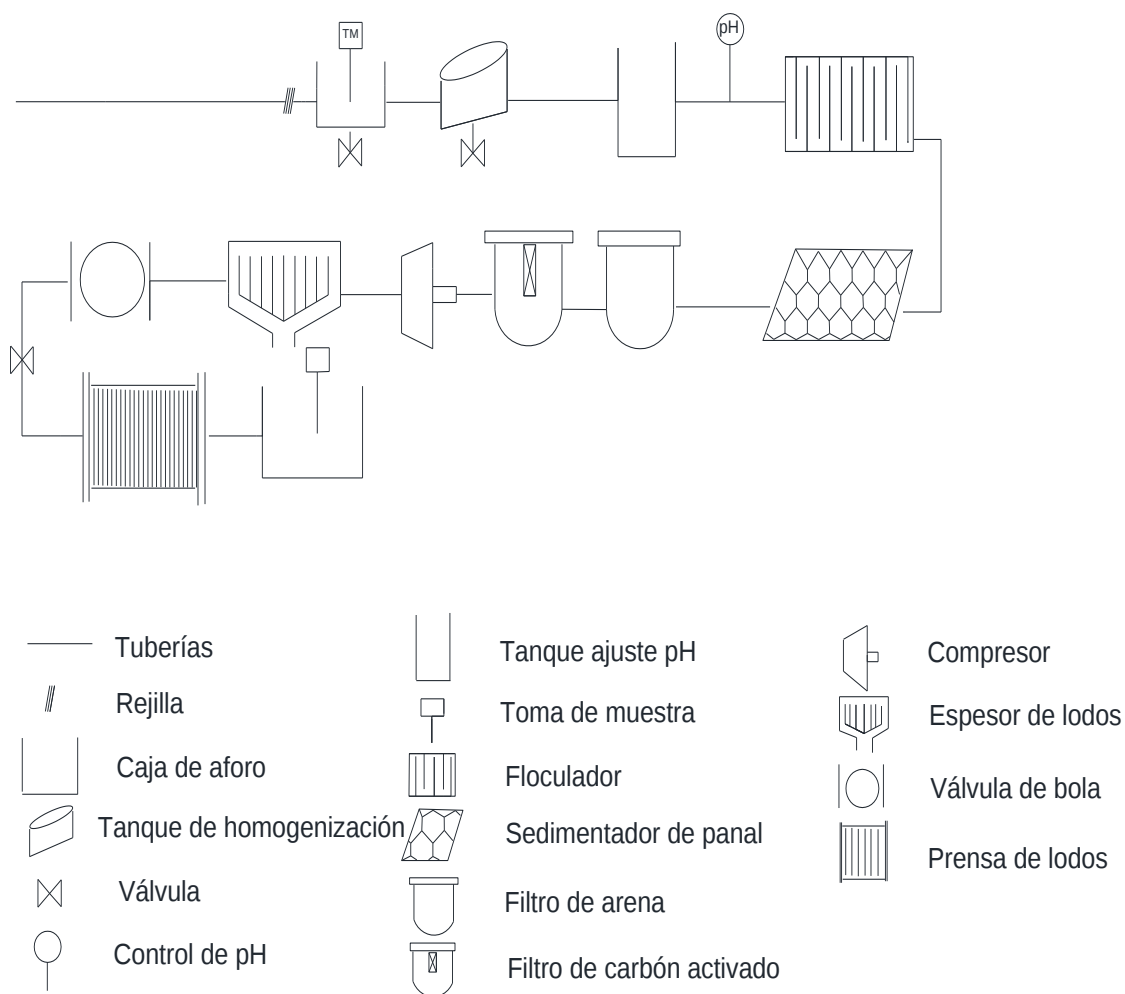


Fuente: [46].

4.2 Sistema de tratamiento de agua residual en el Hospital de Suba

El tratamiento de aguas residuales del Hospital de Suba se realiza para las descargas provenientes de los servicios médicos allí prestados, la planta de tratamiento se encuentra ubicada en el sótano de las instalaciones y cuenta con un área de 6 metros de ancho y 8 metros de largo, está diseñada para tratar un caudal de flujo continuo de 0,62 l/s ($2,22\text{m}^3/\text{h}$) a través de un tratamiento fisicoquímico [47]. La PTAR cuenta con diferentes procesos para dar tratamiento a los vertimientos generados en el hospital, estos se evidencia en el diagrama de flujo de la PTAR (Imagen 6).

Imagen 6: Diagrama de flujo de la PTAR Hospital de Suba.



Fuente: Las autoras.

4.2.1 Entrada

Es estructura es de acero inoxidable en donde se reciben las aguas residuales del hospital por una tubería de PVC de cuatro pulgadas, allí se realiza un mantenimiento diario donde se retiran los residuos sólidos gruesos que se retienen en la canastilla, para disposición final como residuo peligroso [47].

4.2.2 Caja de aforo

Fabricada en fibra de vidrio en forma rectangular, de largo tiene 0.50m, ancho 0.25m, altura de 0.30m [47].

4.2.3 Trampa de grasa

La estructura cuenta con una caja lateral de recolección de grasas las cuales se depositan allí de forma hidráulica, dicha unidad cuenta con una válvula inferior para fácil retiro y disposición final en bolsas rojas como residuo peligroso. El tiempo de retención estimado en la trampa de grasas es de 5 minutos [47].

4.2.4 Tanque de homogenización

Cuenta con una válvula inferior para mantenimiento una vez por mes, que implica evacuación de lodos y disposición final como RESPEL. El tiempo de retención es de 1 hora, se puede observar el tanque de homogenización de la PTAR en la imagen 7 [47].

Imagen 7: Tanque homogenización PTAR.



Fuente: [48].

4.2.5 Tanque de ajuste de pH

El tanque es cilíndrico, el volumen es de $0,63\text{m}^3$ con un diámetro de $0,64\text{m}$ y una altura total de $1,90\text{m}$, como se evidencia en la imagen 8 [47].

Imagen 8: Tanque de ajuste de pH.



Fuente: [48].

4.2.6 Floculador

En esta estructura se forman los flocs en mezcla lenta proporcionada por el accionamiento del agitador de paletas, para lograr durante este proceso se adicionan: policloruro de aluminio como coagulante y el polímero cyquim A-130 como ayudante de la floculación. El floculador y el sedimentador conforman una sola, el volumen del floculador es de $0,49\text{m}^3$ y funciona con tiempo de mezcla de 13 minutos para facilitar la formación adecuada de flocs [47].

4.2.7 Sedimentador

Es de alta tasa y de flujo ascendente, con una carga superficial de $80\text{m}^3/\text{m}^2\text{-día}$. Cuenta con dos conos de recolección de flocs sedimentados, la recolección de agua clarificada se produce en la parte superior por medio de un tubo de 3" con orificios, el volumen de cada cono es de 0.068m^3 [47]. El tanque floculador y el sedimentador se evidencian en la imagen 9.

Imagen 9: Tanque floculador y sedimentador.



Fuente: [48].

4.2.8 Filtro de arena

El filtro es un tanque de acero al carbón de 0.60 m de diámetro y 1 metro de altura, con lecho de filtración de $3,5\text{ gpm/pies}^2$. La tubería de descargar está ubicada en la parte superior del filtro [47].

4.2.9 Filtro de carbón activado

En esta estructura se remueven por absorción los tenso-activos y otras sustancias orgánicas disueltas como compuestos fenólicos y DQO, entre otros [47]. El filtro de arena y carbón activado de la PTAR se ilustran en la imagen 10

Imagen 10: Filtro de arena y carbón activado.



Fuente: [48].

4.2.10 Tanque espesador de lodos y prensa de lodos

Se estima una producción de lodos $0.11\text{m}^3/\text{h}$ con una concentración de sólidos del 5%. En este tanque se aplica una soda caustica y polímero Cyquim Superfloc A-130 para la estabilización y adecuación de los lodos, la mezcla se produce con un

agitador de paletas para alcanzar un pH de 9 unidades. Una vez estabilizado y condicionado, el lodo desciende a la parte cónica. De esta sección el lodo se envía al filtro de prensa con bomba de funcionamiento neumático y control por contrapresión a 30psi [47].

4.2.11 Bomba

Se encuentra a la salida del espesador, donde una válvula se encarga de regular el llenado de su cavidad y con el accionamiento de una válvula de bola se suministra el aire para su funcionamiento [47].

4.2.12 Tanque eyector

Este se encarga de almacenar y bombear el agua clarificada del espesador, filtro prensa y el posible rebose del tanque de bombeo o filtros hacia el tanque de homogenización [47].

4.2.13 Compresor

Este equipo suministra el aire para la mezcla en el tanque de homogenización, en el tanque de pH, en el tanque de bombeo a filtros, neutralización y para el acondicionamiento de la bomba neumática [47].

4.2.14 Tablero de control

El tablero de control se utiliza para el correcto funcionamiento de la planta y puede ser operado automática o manualmente por el encargado [47].

Al final del tratamiento se encuentra la caja de inspección y ducto de agua de salida de la PTAR, como se observa en la imagen 11.

Imagen 11: Caja de inspección y ducto de agua de salida de la PTAR.



Fuente: [48]

5. Metodología

5.1 Revisión y análisis de la información secundaria existente

En el desarrollo del estudio se tuvo como primera etapa la recopilación de la información preliminar constituida por técnicas, estudios y métodos realizados para el análisis de la resistencia bacteriana a través de diferentes bases de datos, inicialmente se realizó una búsqueda utilizando el algoritmo <Resistance of bacteria to antibiotics, 2008-2016, review articles, Original research, international Journal of Antimicrobial Agents, FEMS Microbiology Letters, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, Gen>; a partir de la lectura de los artículos más relevantes seleccionados se obtuvo información general y detallada.

5.2 Diseño experimental

Se aplicó un muestreo sistemático y durante un periodo de 6 meses se tomaron muestras puntuales teniendo en cuenta que para análisis bacteriológicos se recomienda este tipo de muestreo [49].

La fórmula para calcular el tamaño de muestra cuando se desconoce el tamaño de la población se muestra en la ecuación 5.1.

$$n = \frac{Z^2 PQ}{\varepsilon^2} \quad (5.1)$$

Ecuación 5.1 número de muestras

En donde:

Z : Área bajo la curva

P : Probabilidad de éxito o proporción esperada

Q : Probabilidad de fracaso

ε Error máximo admisible en términos de proporción

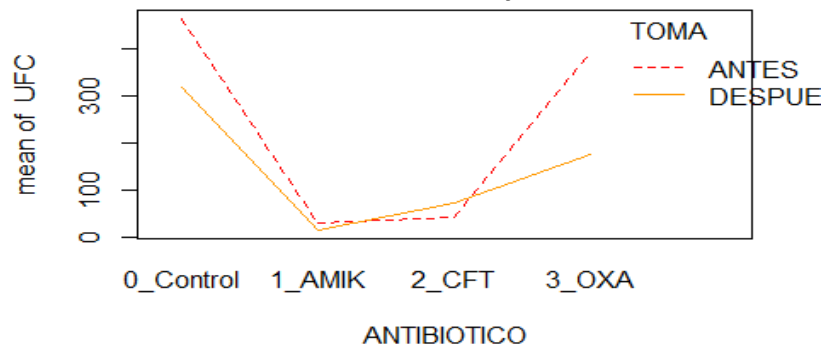
Se aislaron un total de 8 microorganismos, las bacterias fueron sometidas a tres antibióticos CEF, OXA y AMK; en cuatro discos (réplicas). Para el número de réplicas Chávez, Mora y Arias, recomiendan que no deben tener más de 5 discos en cajas de Petri de 100 mm para evitar superposición de los halos y por cantidad de material [50].

De acuerdo al planteamiento del problema hubo 2 factores que influyeron sobre los resultados de la investigación, por un lado la toma de muestras antes y después de la planta de tratamiento y por otro los tres tipos de antibióticos utilizados en el hospital: Oxacilina, Ceftriaxona, Amikacina.

Dicho lo anterior, se realizó la implementación de un diseño de dos factores, en este tipo de diseños es frecuente evaluar si la interacción de los factores influye sobre el resultado, es decir si existe o no una combinación óptima de antibiótico y tratamiento en la PTAR que minimice la cantidad de unidades formadoras de colonias [51].

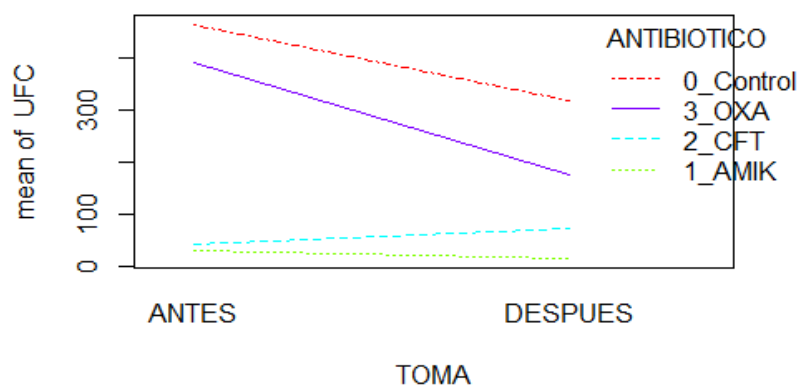
Con relación a lo anterior se realiza el gráfico Two-way Interaction Plot (Gráfica 1 y 2), el cual traza la media de la respuesta para combinaciones bidireccionales de factores, ilustrando así posibles interacciones como se muestra a continuación.

Gráfica 1: Interacción entre antibiótico y punto de toma de muestra, reportado por el software R-Project.



Fuente: Las autoras.

Gráfica 2: Interacción entre punto de toma de muestra y antibiótico, reportado por el software R-Project.



Fuente: Las autoras.

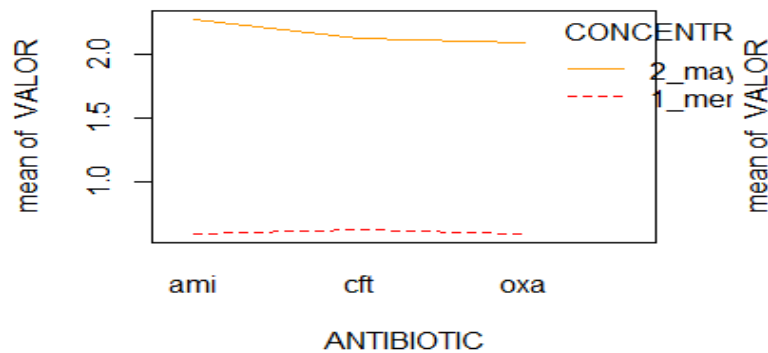
De acuerdo con los resultados observados en las gráficas 1 y 2, se puede determinar que no existen interacciones bidireccionales en los factores, por lo tanto el modelo asociado al diseño no incluirá dicha interacción.

Para el diseño del método de difusión, se tuvieron en consideración dos factores: los antibióticos (Oxacilina, Ceftriaxona, Amikacina) y la concentración; para este último, se selecciona la mayor y la menor. Adicionalmente se tiene que las mediciones se realizaron en 8 tipos de bacterias.

Según lo anterior, el mejor diseño es un diseño por bloques con dos factores, donde el factor de bloqueo es el tipo de bacteria y los factores que influyen sobre la variable respuesta son el tipo de antibiótico y la concentración de los mismos [52].

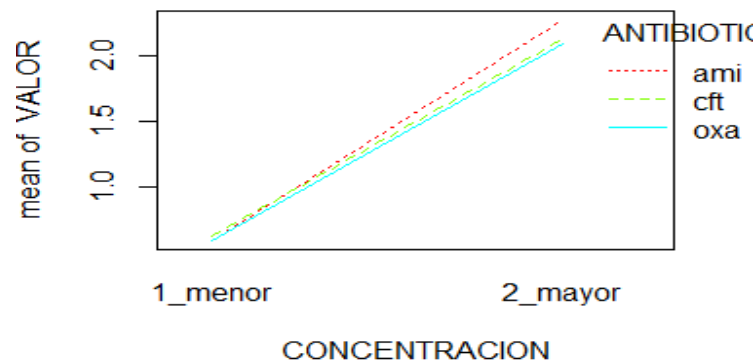
En este contexto se realizarán los gráficos de Two-way Interaction Plot (gráfica 3 y 4), para analizar si existen combinaciones bidireccionales de factores.

Gráfica 3: Interacción entre antibiótico y concentración, reportado por el software R-Project.



Fuente: Las autoras.

Gráfica 4: Interacción entre antibiótico y concentración, reportado por el software R-Project.



Fuente: Las autoras.

Se evidencia que no hay interacción entre las variables, por lo que en el modelo no se tomó en cuenta dicha interacción.

5.3 Toma de muestras

Para tomar muestra se tuvo en cuenta los elementos de protección personal tales como guantes, bata, tapabocas, careta y botas como se muestra en la imagen12.

Las muestras se tomaron antes y después del tratamiento y fueron tomadas en dos periodos; el primero comprendido entre los meses de septiembre, octubre y la primera mitad del mes de noviembre del año 2016 y el segundo periodo, entre la segunda mitad del mes de enero y mediados de febrero del año 2017. La periodicidad de muestreo fue semanal, tomándose muestras directamente del ducto de entrada, y en la caja de inspección a la salida de la planta de tratamiento (Imagen12), estas fueron tomadas en frascos estériles de polietileno, todas se tomaron con las técnicas y condiciones asépticas para el muestreo:

- ☐ Se utilizaron frascos de plástico con tapa estériles.
- ☐ Se curó el frasco por lo menos tres veces con el agua en estudio.
- ☐ La tapa se tomó con la mano izquierda, se puso el frasco bajo el chorro con la mano derecha, y se llenó el frasco, he inmediatamente se selló con la cinta adhesiva protectora [53].

Imagen 12: Toma de muestras en el tanque de almacenamiento de agua residual y caja de inspección de salida de la PTAR.

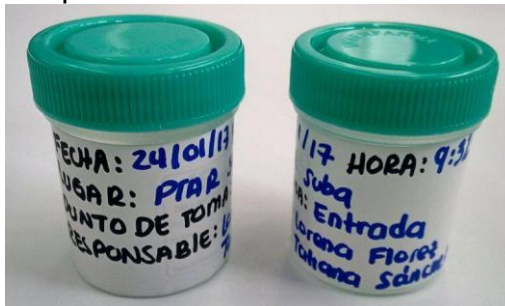


Fuente: Las autoras.

5.4 Cadena de custodia

Las muestras se etiquetaron (fecha, hora, lugar, punto de toma, responsable) como se observa en la imagen 13 y para culminar con la primera parte del control de muestras se acomodaron en la nevera cerciorándose que la tapa del frasco quedara hacia arriba.

Imagen 13: Etiqueta para cada una de las muestras de agua residual.



Fuente: Las autoras.

Se transportaron en una nevera de poliestireno extendido con bolsas refrigerantes para mantener temperatura constante (Imagen 14), mientras se transportaba al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Santo Tomás sede principal, para ser dejadas bajo refrigeración.

Normalmente las muestras fueron procesadas aproximadamente dos horas después, sin embargo en caso de no ser procesadas, se dejaban en la nevera con una temperatura constante de 4°C, procurando un tiempo máximo de permanencia en refrigeración de 24 horas. Por tratarse de una muestra peligrosa se dejó con las respectivas señalizaciones de peligrosidad y su procedencia.

Imagen 14: Transporte de muestras de agua desde Hospital de Suba



Fuente: Las autoras.

5.5 Preparación de medios

Se prepararon tres medios, cada uno con un fin diferente, el primero Plate Count Agar (APC) que es recomendado como medio general para determinar poblaciones microbianas, el segundo MacConkey el cual es un medio de cultivo selectivo, utilizado en la investigación de microorganismos coliformes en aguas, por último se utilizó Manitol Salado Agar, que es un medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos. Cada muestra tuvo tres diluciones, tres medios para cada dilución y cada medio un antibiótico [54].

La investigación se realizó en tres fases:

- Primera fase: en los cuatro primeros muestreos los medios no tenían ningún antibiótico y se utilizaron los medios PCA y MacConkey, para esta fase se usaron 6 cajas por muestra para un total de 48 cajas. Los muestreos realizados en esta etapa, fueron tomados como control en los análisis estadísticos.
- La segunda fase que consta de tres muestreos los medios PCA y MacConkey se añadió antibiótico con el fin de reducir las UFC en comparación a la anterior fase, en esta parte se utilizaron 18 cajas por muestra para un total de 108 cajas [55].
- En la última fase se decidió añadir otro medio, el Manitol Salado Agar ya que con los anteriores medios es complicado obtener estafilococos y este fue selectivo, para esta fase que consta de cinco muestreos se utilizaron 54 cajas por cada muestreo para un total de 270 cajas.

En general se hizo el mismo procedimiento de preparación, teniendo en cuenta que cada caja Petri debía contener 20 ml de medio, para su preparación se tuvo en consideración las cantidades especificadas en tabla 1:

Tabla 1: Cantidad de gramos por medio de cultivo.

Medio	Agua	Cantidad de medio
MacConkey	1 Litro	50 gramos
PCA	1 Litro	23.5 gramos
MSA	1 Litro	111 gramos

Fuente: Las autoras.

A partir de la anterior tabla se hizo el procedimiento plasmado en el anexo 1.

5.6 Preparación del antibiótico para el medio

La preparación del antibiótico se basó en un estudio realizado por Mora Sebastián y Bolaños Diana (2015), donde se utilizaron Oxacilina (1 g), Ceftriaxona (1 g) y AMK de 100mg / 2ml. La CEF y la OXA se disolvió en 3 ml de agua destilada obteniendo una concentración inicial de 333.333 $\mu\text{g/ml}$ y AMK se disolvió en 1ml para una concentración inicial de 33.333 $\mu\text{g/ml}$, teniendo en cuenta los resultados que se obtuvieron en dicha investigación se llegó a la conclusión que la concentración mínima inhibitoria de 33 $\mu\text{g/ml}$ que usaron es muy baja ya que obtuvieron unos halos de inhibición muy pequeños a comparación de otras investigaciones, por lo cual se necesitó de mayor concentración y se decidió tomar la dilución inmediatamente anterior o sea 333 $\mu\text{g/ml}$ [56] [48].

Para saber cuál es la cantidad de antibiótico que se le debió agregar al medio se hizo una regla de tres simple según la ecuación 5.2:

$$\begin{array}{ccccccc} X \text{ ml} & * & 333 \mu\text{g/ml} & = & 33300 \mu\text{g/ml} & * & X \\ \downarrow & & & & \downarrow & & \\ \boxed{\text{Cantidad de}} & & & & \boxed{\text{Cantidad de antibiótico en el}} & & \\ \boxed{\text{medio}} & & & & \boxed{\text{medio}} & & \end{array} \quad (5.2)$$

Ecuación 5.2 cantidad de antibiótico en el medio

Posteriormente se agregó el antibiótico según la dosis indicada y por último se procedió a servir los medios a 60°C en las cajas Petri esterilizadas con anterioridad cumpliendo con los protocolos de asepsia.

Los antibióticos antes y después de su preparación se evidencian en la imagen 15

Imagen 15: Antibiótico antes y después de su preparación.

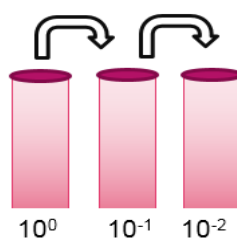


Fuente: Las autoras.

5.7 Dilución seriada

Debido a que la carga bacteriana de la muestra fue muy alta fue necesario hacer diluciones seriadas con el fin de obtener la menor cantidad de bacterias y así facilitar su posterior aislamiento, con anticipación se hicieron una serie de pruebas para comprobar la efectividad de las diluciones. Las diluciones que se utilizaron fueron: directa 10^0 , 10^{-1} y 10^{-2} (Imagen 16). Para la dilución seriada se utilizaron 2 tubos cada uno de nueve mililitros de solución salina al 0,85 %; al primer tubo se le agregó un mililitro de agua residual, se agitó y se tomó un mililitro que fue agregado al segundo tubo. Estas diluciones se utilizaron en todas las fases de los medios para tener confiabilidad en los datos obtenidos.

Imagen 16: Dilución seriada carga bacteriana.

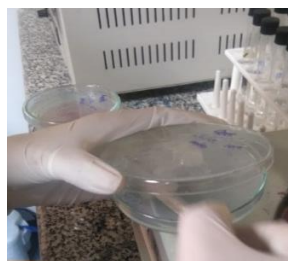


Fuente: Las autoras.

5.8 Siembra en los medios

Al tener los medios listos y las disoluciones preparadas se hizo la siembra. En primer lugar con la micropipeta en 0,1 ml se esparció la dilución con el asa de Drigalsky o rastrillo bacteriológico, en el medio (imagen 17). Finalmente se dejó en un periodo de 48h de incubación para los medios con antibiótico y 24h para los medios sin antibiótico a 35°C . Transcurridas las 48h se procedió al conteo el cual solo se tuvo en cuenta el tipo de colonia más abundante para su aislamiento, dicha colonia se escogió por abundancia según las tres diluciones.

Imagen 17: Siembra de las diluciones en los medios.



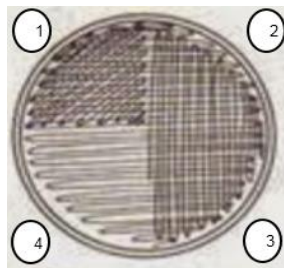
Fuente: Las autoras.

5.9 Aislamiento de la bacteria seleccionada

Después de haber seleccionado la bacteria por sus cualidades de abundancia entre las muestras se observó mediante un microscopio en una lámina con tinción de Gram buscando obtener un cultivo puro, mediante siembras sucesivas por agotamiento (anexo 2).

La técnica utilizada para la siembra sucesiva por agotamiento se observa en la imagen 18.

Imagen 18: Siembra por agotamiento.

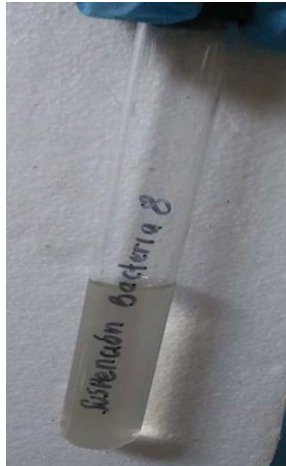


Fuente: [57].

5.10 Suspensión del inóculo

Una vez se tuvo la bacteria totalmente aislada se hizo la suspensión de inóculo siguiendo los pasos del anexo 3. El resultado obtenido a partir del procedimiento se evidencia en la imagen 19.

Imagen 19: Suspensión del inóculo



Fuente: Las autoras.

5.11 Método de difusión de discos según Kirby-Bauer

La prueba de difusión de discos según Kirby-Bauer se usó con el fin de determinar la sensibilidad o resistencia de las bacterias a tratar en los tres antibióticos, como la concentración de los discos era conocida se midió el halo de inhibición y posteriormente se catalogó el tipo de resistencia que tenía la bacteria: resistente, intermedia y susceptible; con datos ya estandarizados.

5.11.1 Preparación de los discos

Esta etapa consta de dos fases, en la primera se tuvo en cuenta que cada disco de 6 mm absorbe en un promedio de 0.241 ml, este dato se sacó a partir del peso, primero en un caja Petri se añadió una cantidad de agua y dentro de esta se dejó caer uno de los discos, se sacó y se observó cuanto disminuía el peso, posteriormente con la densidad del agua se llegó a un valor estimado de la cantidad de agua que absorbía cada disco, este procedimiento se realizó 15 veces para tener un nivel de confiabilidad alto en los datos.

Posteriormente con la información anterior, a 1 ml de solución salina que corresponde a lo que absorbe 41 discos, se le adiciono 1 gramo de antibiótico, así la concentración de cada disco fue de 24 mg/disco, una concentración 800 veces mayor a la de los discos que se encuentran comercialmente y por lo tanto no se pudo relacionar con las tablas que están estandarizadas para este ensayo.

Por lo anterior, se realizó un cambio en la metodología para cambiar la concentración, sin embargo como las tres primeras bacterias se realizaron con concentraciones elevadas y para poder realizar un comparativo entre las mismas, los otros ensayos se hicieron con las dos concentraciones.

En la segunda fase para realizar la preparación de los discos se tuvo en cuenta que para cada antibiótico existe una concentración específica; AMK de 30 µg, CEF de 30 µg y OXA 1µg y adicionalmente la cantidad de agua que absorbía cada disco.

Teniendo en promedio lo que absorbe cada disco se dice que por cada uno de estos hay una concentración de 30 µg/0,24ml esto es igual que decir 125 µg/ml para la Amikacina y la Ceftriaxona, y 1 µg/0,24ml para Oxacilina es decir 4,166 µg/ml con respecto a lo anterior y teniendo en cuenta que el antibiótico no está totalmente puro ya que contiene excipientes y coadyuvantes y por tal razón se buscó en bibliografía la cantidad de antibiótico puro contiene cada frasco, se hizo los siguientes cálculos:

- Amikacina

En cada frasco de Amikacina tiene una concentración de 100 mg/2 ml lo que corresponde a 50 mg/ml se hace una disolución y se agregó 1 ml a un tubo con 9 ml para obtener una concentración de 0,5 mg/ml que es igual a 500 µg/ml, con esta operación se obtuvo el valor de la cantidad de agua necesaria para disolver la concentración con el fin de obtener una concentración final de 125 µg/ml, así:

$$\frac{500 \mu\text{g}}{x} = \frac{125\mu\text{g}}{\text{ml}} \quad (5.3)$$

Ecuación 5.3 disolución final AMIK

$$x = \frac{500\mu\text{g}}{125\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}} \quad (5.4)$$

Ecuación 5.4 despeje de la X para AMIK

- Ceftriaxona

Cada frasco de Ceftriaxona contiene 1 g que se disuelve en 3 mililitros que corresponden a 0,33 g/ml y de esta concentración el 25% corresponde a antibiótico; lo que quiere decir que hay 0,0833 g/ml, equivalentes a 83333,33 µg/ml a partir de los cuales se hicieron 2 disoluciones para tener una concentración de 833,33 µg/ml.

$$\frac{833,33 \mu\text{g}}{x} = \frac{125\mu\text{g}}{\text{ml}} \quad (5.5)$$

Ecuación 5.5 dilución final CEFT

$$x = \frac{833,33\mu\text{g}}{125\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}} \quad (5.6)$$

Ecuación 5.6 despeje de la X para CEFT

- Oxacilina

En cada frasco de Oxacilina hay 1 g el cual se disolvió en 3 ml que es igual a 0,33 g/ml para este antibiótico se hicieron cuatro diluciones, en el caso de la OXA todo el gramo corresponde al antibiótico y como en los discos de Oxacilina es 4,16 µg/ml se hacen los mismos cálculos pero cambiando la concentración, así:

$$\frac{33.33 \mu\text{g}}{x} = \frac{4,1666\mu\text{g}}{\text{ml}} \quad (5.7)$$

Ecuación 5.7 disolución final OXA

$$x = \frac{833.33\mu\text{g}}{4,1666\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}} \quad (5.8)$$

Ecuación 5.8 despeje de la X para OXA

5.11.2 Preparación de medio con los discos

El medio utilizado fue PCA, ya que no se encontraba disponible el medio de Muller-Hinton que es el medio recomendado para realizar la prueba de Kirby-Bauer, sin embargo en el PCA, la triptona y el extracto de levadura suministran las fuentes de nitrógeno y de vitaminas suficientes para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos y la glucosa actúa como fuente de energía [58].

El procedimiento de preparación se encuentra el anexo 1.8

5.12 Identificación de las bacterias

Finalmente se identificaron las bacterias mediante sistemas miniaturizados API®, métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas, su procedimiento se describe en el anexo 4.

5.13 Implicaciones en el medio ambiente y en la salud.

Para establecer las implicaciones a la salud que conlleva la presencia de microorganismos genéticamente resistentes en el medio ambiente, fue necesario identificar qué efectos adversos causa cada una de las bacterias específicamente por cada vía (cutánea, digestiva y respiratoria) ya que no se sabe cuál es la cinética de la bacteria, es decir, que puede ingresar por cualquier vía. Para esto se realizó una búsqueda detallada mediante el manual de Bergey además de diferentes fuentes bibliográficas; clasificando las enfermedades que causan de acuerdo al CIE-10³.

Finalmente se determinó el riesgo, generando una ecuación basada en otra planteada por la OMS y la Organización para la cooperación económica y el

³ Acrónimo de la clasificación internacional de enfermedades

desarrollo (2003); la cual determina la dosis diaria individual de microorganismos patógenos a través de algún producto en particular [59]:

$$Dose = C \times \frac{1}{R} \times I \times 10^{-DR} \times V \quad (5.9)$$

Ecuación 5.9 dosis individual diaria de microorganismos patógenos a través de algún producto

Donde:

C: Concentración de microorganismos patógenos en materias primas.

R: Nivel de detección del método

I: Fracción de patógenos detectados

DR: Remoción o eficiencia de inactivación del proceso de tratamiento

V: Consumo diario del producto

Esta ecuación se modificó con factores que afecten la prevalencia del microorganismo, con el fin de hallar el riesgo, ya que para este no hay una ecuación establecida:

$$Riesgo \text{ de prevalencia de bacterias resistentes} = (C \times \frac{1}{R} \times I \times p)^{DR} \quad (5.10)$$

Ecuación 5.10 cálculo del riesgo de prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos

Donde:

C: Conteo de UFC/ml resistentes en las placas.

R: Nivel de detección del método.

I: Fracción de patógenos detectados.

DR: Remoción o eficiencia de inactivación de patógenos en el proceso de la PTAR.

P: Pendiente de variación en los halos de inhibición dependiendo de la concentración de los antibióticos

El riesgo es una probabilidad que está dada por la ecuación [62]:

$$Riesgo = Probabilidad \text{ de amenaza} \times magnitud \text{ del daño} \quad (5.11)$$

Ecuación 5. 11 Calculo de riesgo

Para este caso la probabilidad de amenaza es equivalente a la fracción de patógenos detectados y a la pendiente de relación entre los tamaños de los halos

de inhibición según su concentración, ya que esta la fuente del daño potencial en la que se pueden producir impactos a la salud y al medio ambiente. La amenaza es determinada en función de la intensidad y la frecuencia que corresponde a las UFC/ml resistentes (C), el nivel de detección del método y la eficiencia de inactivación de patógenos en el proceso de la PTAR que está dada por el tiempo.

Dicho lo anterior se procedió a determinar cada variable de la ecuación 5.10. Para hallar C se tomó el valor de las UFC/ml totales de cada placa con antibiótico antes del tratamiento correspondientes al medio de cultivo PCA.

Para hallar el nivel de detección (R) en el método de conteo de UFC/ml resistentes por bacteria, se recurrió a la bibliografía, sin embargo no existe un nivel de detección específico para cada bacteria en estudio, por lo que se realizó un promedio en el peor escenario entre las bacterias que se analizaron en estudio consultado, teniendo en cuenta que utilizaron el mismo medio de cultivo (PCA) [60].

La fracción de patógenos detectados (I) tiene en cuenta la cantidad de patógenos hallada con respecto a la cantidad de bacterias totales

Para hallar DR se basó en la ecuación del número total de bacteria después de la desinfección [61] .

$$N_t = N_0(1 + 0,23C \times t)^{-3} \quad (5.12)$$

Ecuación 5.12 cálculo de bacterias vivas presentes y t es el tiempo de contacto entre el desinfectante (cloro) y los microorganismos, medido en minutos.

Donde

N_t = UFC total, después de la PTAR

N_0 = UFC inicial, antes de pasar por la PTAR

C= constante según el método de desinfección

t= tiempo de tardaza del tratamiento en la PTAR

Posteriormente se despeja la ecuación así:

$$\frac{N_t}{N_0} = (1 + 0,23C \times t)^{-3} \quad (5.13)$$

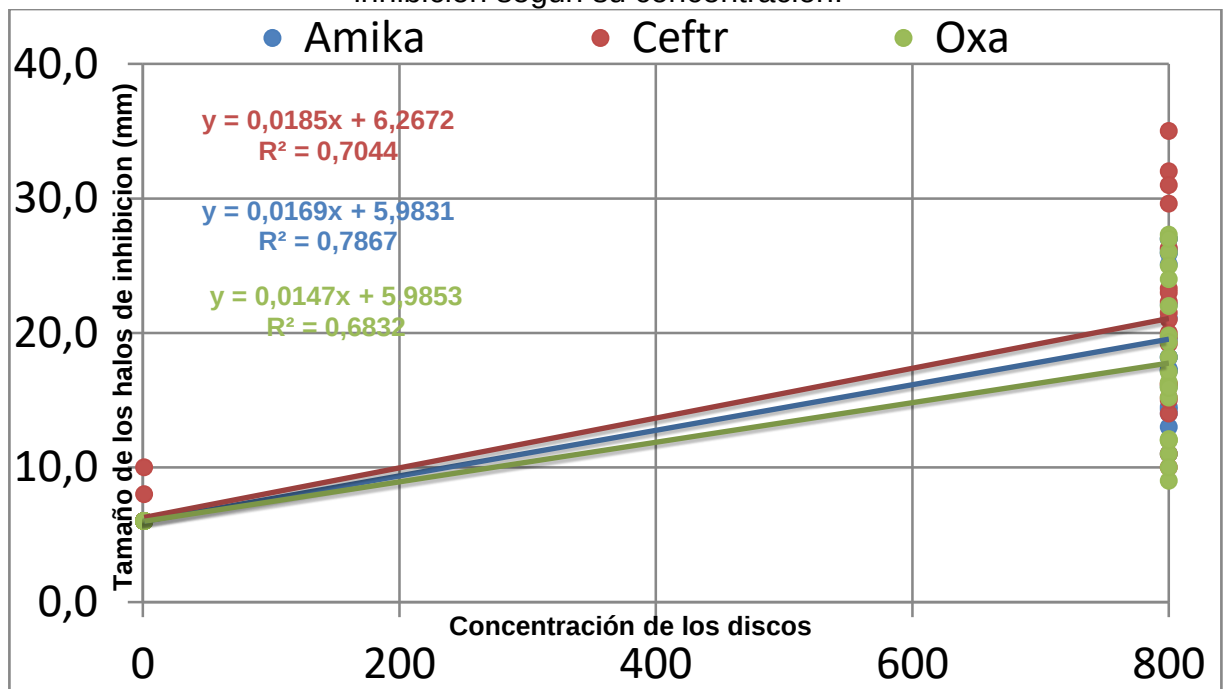
Ecuación 5. 13 despeje de la ecuación 5.12 (Calculo de bacterias vivas presentes y t es el tiempo de contacto entre el desinfectante (cloro) y los microorganismos, medido en minutos).

Así entonces se pudo calcular la eficiencia de desinfección del cloro partir de la cantidad de células eliminadas.

Por otro lado se eliminó el 10 de la ecuación 5.9 porque si se dejaba no afectaba de manera directa el porcentaje de eficiencia del tratamiento; adicionalmente se dejó como exponente positivo el DR ya que la eficiencia afecta a la respuesta de riesgo de manera directa y en el caso de la ecuación 5.9 afecta de manera inversa.

En el caso de la ecuación 5.9 es necesaria la variable de consumo porque son términos de dosis, pero para la ecuación 5.10 no fue necesario ya que se habla de riesgo, por lo tanto se remplazó esta variable por la pendiente que corresponde a la variación de los halos de inhibición según la concentración (Gráfica 5), para así tener en cuenta la efectividad del antibiótico cuando se hace un aumento de la concentración.

Gráfica 5: Línea de tendencia de la relación entre los tamaños de los halos de inhibición según su concentración.



Fuente: Las autoras.

Para obtener un Rpbr final con valores que se estén entre 0 y 1, fue necesario dividir la ecuación por el valor máximo (Rpbr máx), que se pudiera obtener con respecto a la ecuación 5.10, tomando el peor de los escenarios para cada una de las variables.

$$Rpbr_{final} = \frac{(C \times \frac{1}{R} \times I \times p)^{DR}}{Rpbr_{max}} \quad (5.14)$$

Ecuación 5.14 Cálculo del riesgo de prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos final

6. Impacto social

El informe de la OMS del año 2014 acerca de la vigilancia mundial de la resistencia a los antimicrobianos, plasma la problemática que se está generando frente a la adquisición de la resistencia, dejando de ser una posible preocupación futura para convertirse en un problema real. El mundo se dirige hacia una era en la que se reduce la eficacia del tratamiento a algunas enfermedades, por lo que los pacientes permanecen infectados por un período más largo incrementando el riesgo de propagación de microorganismos resistentes y la mayor duración de la enfermedad y su tratamiento en hospitales, eleva los costos de atención sanitaria [63].

Otra variación importante se presenta en la composición biológica de los ecosistemas, produciendo impactos sobre los mismos además de las graves repercusiones para la salud pública mundial. Al encontrar cepas resistentes a los antibióticos se está evidenciando la generación de ecosistemas favorables para la adquisición de resistencia por parte de los microorganismos. Al no controlar la cantidad de antibióticos en los vertimientos, el problema ambiental sigue intacto ya que las cepas resistentes se siguen generando y la resistencia se puede transferir a microorganismos patógenos y en dado el caso que se presente nuevamente una infección de este tipo, los antibióticos anteriormente utilizados ya no van a ser útiles porque se favoreció la resistencia [63].

Es importante que en Colombia se sigan realizando investigaciones, basadas en los resultados obtenidos y teniendo en cuenta las repercusiones en la salud y en el ecosistema a las que conlleva la adquisición de resistencia por parte de los microorganismos, por medio de este estudio se aporte a obtener argumentos contundentes para la implementación de normatividad que regule y controle el tratamiento realizado a los vertimientos hospitalarios, contribuyendo a que se salven vidas y a disminuir la propagación de la resistencia bacteriana.

Además, implementar herramientas de apoyo metodológico a posteriores investigaciones como los protocolos realizados, fundamentales como guía básica y contribuir a la implementación de un Indicador de riesgo para la resistencia antimicrobiana que permita cuantificar las afectaciones al medio ambiente y a la salud.

7. Resultados

7.1 Número de muestras

La ecuación para determinar el número de muestras cuando se desconoce el tamaño de la población se realizó mediante el siguiente procedimiento:

El área bajo la curva se determinó a partir de un nivel de confianza (NC) del 95% y mediante las tablas de áreas bajo la curva de probabilidad se estimó Z dando como resultado 0.4750; la probabilidad de éxito y fracaso es del 50%, con un error máximo admisible de 10%; todos los datos anteriores son estándar.

Al remplazar estos datos en la ecuación se obtuvo un resultado de 96 muestras pero por razones de logística tales como el laboratorio, materiales y duración del permiso de acceso la planta del Hospital de Suba, no fue posible realizar esa cantidad de muestreos, por tal razón se tomaron 12 muestras antes y después para un total de 24 muestras analizadas, teniendo en cuenta que Núñez Lidia; Tornello Carina; Puentes Noel y Monetton Juan, tomaron un número de muestras semejante en su investigación [55].

Adicionalmente se realizó la misma ecuación pero ajustando los valores de éxito y fracaso hasta que la ecuación arrojará un número de 12, para este valor el nivel de confianza continua siendo 95%; la probabilidad de éxito y fracaso es del 90% y 10% respectivamente; y con un error máximo admisible de 30%.

7.2 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico del conteo de bacterias heterótrofas aerobias viales y del método de difusión, fue necesario basarse en la guía básica de modelos lineales establecida por Rincón Luis, para así realizar los ajustes y correr los modelos necesarios para la investigación [64] [65].

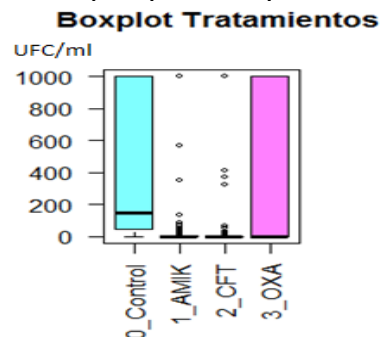
7.2.1 Análisis estadístico de conteo de bacterias heterótrofas aerobias viales

- **Boxplot para tratamientos y factores**

Se realizaron 2 gráficas de bloques o boxplot para comparar las UFC/ml entre tratamientos (placas con antibiótico comparadas con las placas sin antibiótico) y factores (los puntos de toma de muestra) (gráficas 6 y 7).

Se evidencia la existencia de variabilidad entre los resultados obtenidos con respecto a las muestras sin antibiótico que para el análisis estadístico se tomaron como muestras control al no presentar factores que impidieran el crecimiento de las bacterias, en los muestreos posteriores los medios utilizados contenían antibiótico con el fin de disminuir significativamente las UFC/ml. El comportamiento del antibiótico Oxacilina mostro que el número de UFC/ml fue mayor en comparación con los otros antibióticos (Gráfica 6).

Gráfica 6: UFC/ml de las placas con antibiótico comparadas con las placas sin antibiótico (tratamientos), reportado por el software R-Project.

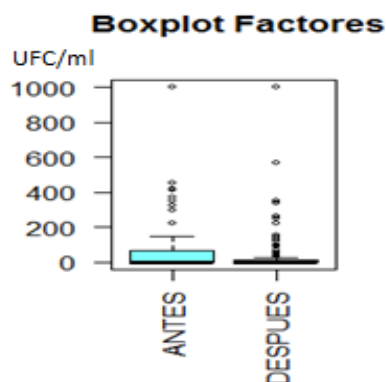


Fuente: Las autoras.

En la gráfica 7 se evidencia que hay más dispersión en los resultados de las muestras tomadas antes en relación a las tomadas después de la planta de tratamiento, lo que indica que los valores de UFC/ml son mayores en los primeros muestreos donde no se utilizó antibiótico.

El tratamiento físico-químico de la PTAR efectivamente elimina gran cantidad de bacterias pero no en su totalidad, lo que significa que el tratamiento no es eficiente para para este tipo de microorganismos.

Gráfica 7: UFC/ml con respecto a los puntos de toma de muestra (factores), reportado por el software R-Project.



Fuente: Las autoras.

- **Análisis de varianza del modelo**

- **Ajuste del modelo**

Como la variable respuesta del diseño hace referencia a datos de conteo, se realizó el ajuste de un modelo lineal generalizado Poisson, ya que es el que mejor capta el comportamiento de este tipo de datos.

Se evaluaron las siguientes hipótesis:

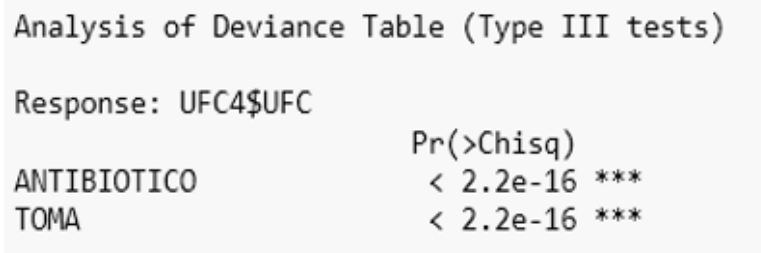
Hipótesis Nula: $\beta_j = 0$ vs Hipótesis Alternativa: $\beta_j \neq 0$ Hipótesis Nula: $\tau_i = 0$ vs Hipótesis Alternativa: $\tau_i \neq 0$

Hipótesis alternativa: existe un efecto tanto del tipo de antibiótico, como del lugar de la toma de la muestra sobre la cantidad de unidades formadoras de colonias.

Hipótesis nula: no hay un efecto del tipo de antibiótico, como del lugar de toma de muestra sobre la cantidad de unidades formadoras de colonia

Como se muestra en la imagen 20 se rechazó la Hipótesis Nula las variables son estadísticamente significativas

Imagen 20: Análisis de Varianza para un modelo Poisson, reportado por el software R-Project.



Analysis of Deviance Table (Type III tests)		
Response: UFC4\$UFC		
	Pr(>Chisq)	
ANTIBIOTICO	< 2.2e-16 ***	
TOMA	< 2.2e-16 ***	

Fuente: Las autoras.

- **Resumen del modelo**

Para el análisis del modelo se debe tener en cuenta que como las variables que influyen sobre la cantidad de unidades formadoras de colonias son categóricas, los coeficientes del modelo están dados como la diferencia entre una categoría de referencia en relación con las demás categorías y las hipótesis que se evaluaron son:

Hipótesis Nula: $\beta_1 - \beta_j = 0$ con $j \neq 1$ vs Hipótesis Alternativa: $\beta_1 - \beta_j \neq 0$

Hipótesis Nula: $\tau_1 - \tau_i = 0$ con $i \neq 1$ vs Hipótesis Alternativa: $\tau_1 - \tau_i \neq 0$

Hipótesis alternativa: hay diferencia entre los tratamientos y entre los factores

Hipótesis Nula: no hay diferencia entre los tratamientos y entre los factores

De acuerdo a la imagen 21 se pudo concluir:

- La diferencia entre el tratamiento control (Sin Antibiótico) y el tratamiento 1 (Antibiótico Amikacina) es estadísticamente significativa se acepta hipótesis alternativa.
- La diferencia entre el tratamiento control (Sin Antibiótico) y el tratamiento 2 (Antibiótico Ceftriaxona) es estadísticamente significativa se acepta hipótesis alternativa.
- La diferencia entre el tratamiento control (Sin Antibiótico) y el tratamiento 3 (Antibiótico Oxacilina) es estadísticamente significativa se acepta hipótesis alternativa.
- La diferencia entre el lugar de toma de las muestras: antes y después de la PTAR es estadísticamente significativa se acepta hipótesis alternativa.

Imagen 21: Ajuste del modelo lineal generalizado para un modelo Poisson, reportado por el software R-Project.

Coefficients:		
	Estimate	Pr(> z)
(Intercept)	6.200778	<2e-16 ***
ANTIBIOTICO1_AMIK	-2.878750	<2e-16 ***
ANTIBIOTICO2_CFT	-1.931837	<2e-16 ***
ANTIBIOTICO3_OXA	-0.326527	<2e-16 ***
TOMADESPUES	-0.518806	<2e-16 ***

Fuente: Las autoras.

- **Análisis comparativo con prueba de Tukey**

- **Análisis de Comparación Múltiple entre tratamientos**

Se realizó la prueba de Tukey para hacer una comparación múltiple entre tratamientos (Imagen 22 y 23).

Los resultados obtenidos en la imagen 23 de comparación múltiple entre los factores y tratamientos, ratifican lo mostrado en la Imagen 22 y se concluye que existen diferencias estadísticamente significativas entre los antibióticos se acepta hipótesis alternativa.

Imagen 22: Prueba de Tukey para comparación múltiple entre antibióticos, reportado por el software R-Project.

```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: glm(formula = UFC4$UFC ~ ANTIBIOTICO + TOMA, family = poisson(link = log))

Linear Hypotheses:

1_AMIK - 0_Control == 0                Pr(>|z|)
2_CFT - 0_Control == 0                <2e-16 ***
3_OXA - 0_Control == 0                <2e-16 ***
2_CFT - 1_AMIK == 0                  <2e-16 ***
3_OXA - 1_AMIK == 0                  <2e-16 ***
3_OXA - 2_CFT == 0                   <2e-16 ***

```

Fuente: Las autoras.

- **Análisis de Comparación Múltiple entre Factores**

Se realizó la prueba de Tukey para hacer una comparación múltiple entre factores (Imagen 23), donde se evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos antes y después de la PTAR se acepta hipótesis alternativa.

Imagen 23: Prueba de Tukey para comparación múltiple entre puntos de toma de muestra, reportado por el software R-Project.

```

Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses

Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: glm(formula = UFC4$UFC ~ ANTIBIOTICO + TOMA, family = poisson(link = log))

Linear Hypotheses:

DESPUES - ANTES == 0                Pr(>|z|)
                                   <2e-16 ***

```

Fuente: Las autoras.

- **Análisis de coeficientes del modelo.**

El modelo Poisson está construido por el algoritmo “ $\log(\hat{y}_i) = \mu + \tau_i x_1 + \beta_i x_2$ ” utilizado en el software. La interpretación de los coeficientes está dada por el exponencial de cada coeficiente del modelo original.

Con respecto a la tabla 2 se concluye:

- Coeficiente asociado al intercepto: Es el efecto medio, común a todas las observaciones.
- Coeficiente asociado al antibiótico Amikacina: Indica que la cantidad media de Unidades formadora de Colonias al aplicar este tratamiento es de 0.056 veces el resultado promedio del tratamiento control.

- Coeficiente asociado al antibiótico Ceftriaxona: Indica que la cantidad media de Unidades formadora de Colonias al aplicar este tratamiento es de 0.145 veces el resultado promedio del tratamiento control.
- Coeficiente asociado a la toma después de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR): Indica que la cantidad media de Unidades formadora de Colonias después de que las aguas residuales pasan por la PTAR es de 0.595 veces el resultado promedio de las aguas antes de pasar por la PTAR.

Tabla 2: Coeficientes transformados del modelo, reportado por el software R-Project.

Coeficiente	Valor
Intercepto	493.13
Amikacina	0.056
Ceftriaxona	0.144
Oxacilina	0.721
Post PTAR	0.595

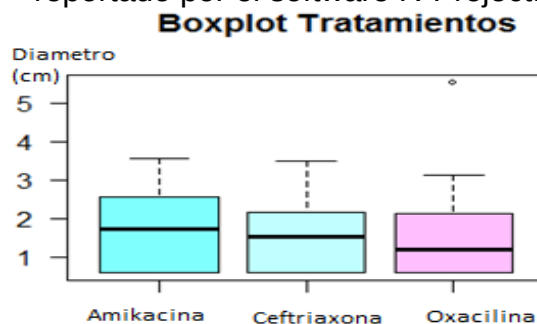
Fuente: Las autoras

7.2.2 Análisis estadístico del método de difusión

- **Boxplot de tratamientos y Concentraciones.**

Para comparar los tamaños en los halos de inhibición entre tratamientos y entre los factores, se realizaron gráficas de bloques o boxplot (gráficas 7 y 8). Debido a que dos de los antibióticos tienen un principio de acción diferente y a que los discos tienen concentraciones diferentes no es apropiado comparar los tamaños de los halos de inhibición entre tratamientos, sin embargo, la gráfica 8 permite identificar el rango de variación de los datos para cada tratamiento, el cual indica que en el método de Kirby-Bauer para Amikacina y Ceftriaxona la tolerancia a una amplia variación en la respuesta microbiana es mayor (Gráfica 8).

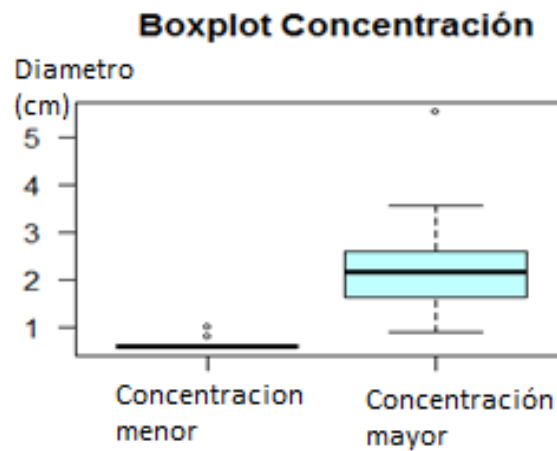
Gráfica 8: Tamaño de los halos de inhibición (cm) comparados entre antibióticos), reportado por el software R-Project.



Fuente: Las autoras.

En la gráfica 9 se observa que los halos de inhibición para los discos con mayor concentración fueron más grandes respecto al diámetro de los halos en los discos con concentración estándar. Al aumentar la concentración en los discos fue posible registrar una mayor variación en el diámetro de los halos de inhibición, lo cual puede estar relacionado con los mecanismos de acción de los antibióticos, de resistencia de las bacterias y con la fisiología de cada microorganismo.

Gráfica 9: Tamaño de los halos de inhibición (cm) comparados entre concentraciones, reportado por el software R-Project.

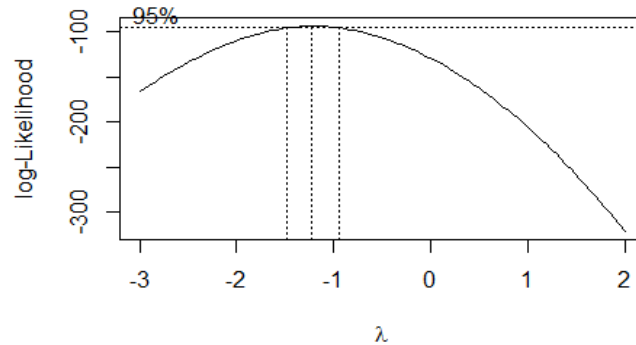


. Fuente: Las autoras.

- **Análisis de varianza del modelo**
 - **Ajuste del modelo**

De acuerdo a la información que proporcionan los Boxplot, se pudo ver que hay una gran diferencia entre el tamaño de los halos en relación con la concentración de los antibióticos. Para el desarrollo del experimento se ajusta un modelo con distribución normal cuya variable respuesta ha tenido una transformación boxcox (gráfica 10), dicha transformación se realizó para disminuir el apuntamiento de la distribución y garantizar normalidad en los residuales del modelo.

Gráfica 10: Punto óptimo para transformación mediante el cálculo de máxima verosimilitud, reportado por el software R-Project.



Fuente: Las autoras.

En el anterior grafico se determinó que el valor óptimo de λ es -1.232323, con el fin de garantizar normalidad en los residuales y poder correr el modelo correctamente.

Tabla de Análisis de Varianza

Para el análisis de la tabla Anova, se establecen las siguientes hipótesis:

Hipótesis Nula: $\beta_j = 0$ vs Hipótesis Alternativa: $\beta_j \neq 0$ Hipótesis Nula: $\tau_i = 0$ vs Hipótesis Alternativa: $\tau_i \neq 0$

Hipótesis nula: que el tipo de bacteria, la concentración y el antibiótico no afecta a al diámetro del halo de inhibición.

Hipótesis alternativa: que el tipo de bacteria, la concentración y el antibiótico afecta a al diámetro del halo de inhibición.

En la imagen 24 se evidencia que tanto en los tratamientos como en el factor de bloqueo (tipo de bacteria) se rechaza la hipótesis nula y se concluye que las variables son estadísticamente significativas.

En este análisis es importante tener en cuenta que el nivel de confianza para los antibióticos es del 90%.

Imagen 24: Análisis de varianza para el modelo

Anova Table (Type III tests)	
	Pr (>F)
(Intercept)	< 2.2e-16 ***
BACTERIA	1.209e-08 ***
CONCENTRACION	< 2.2e-16 ***
ANTIBIOTIC	0.1025

Fuente: Las autoras.

- **Análisis comparativo con prueba de Tukey**

- Análisis de Comparación Múltiple entre tratamientos

Se realizó la prueba de Tukey para hacer una comparación múltiple entre tratamientos (Imagen 25 y 26)

En la imagen 25 se puede evidenciar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los antibióticos Oxacilina y Ceftriaxona, sin embargo el antibiótico Amikacina tiene un efecto diferente a los otros dos esto se debe al mecanismo de acción del antibiótico, ya que tanto la Oxacilina y la Ceftriaxona actúan sobre la pared celular inhibiendo la biosíntesis de los mucopéptidos de la pared celular.

El efecto de los antibióticos sobre el tamaño de los halos de inhibición de las bacterias estudiadas no difiere significativamente (Imagen 25).

Imagen 25: Prueba de Tukey para comparación múltiple entre antibióticos, reportado por el software R-Project

Groups, Treatments and means		
a	oxa	1.074
a	cft	1.011
b	ami	0.8993

Fuente: Las autoras.

En cuanto a los efectos proporcionados por las concentraciones (Imagen 26), se evidencia que la dosis de antibiótico si constituye un factor que disminuye la resistencia de las bacterias

Imagen 26: Prueba de Tukey para comparación múltiple entre concentraciones, reportado por el software R-Project.

Means with the same letter are not significantly different.		
Groups, Treatments and means		
a	1_menor	1.851
b	2_mayor	0.4497

Fuente: Las autoras.

7.3 Conteo de bacterias heterótrofas aerobias viales

El conteo de las UFC/ml se realizó para cada uno de los muestreos, tomados en las fechas que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Fechas de los muestreos realizados en la PTAR del Hospital de Suba.

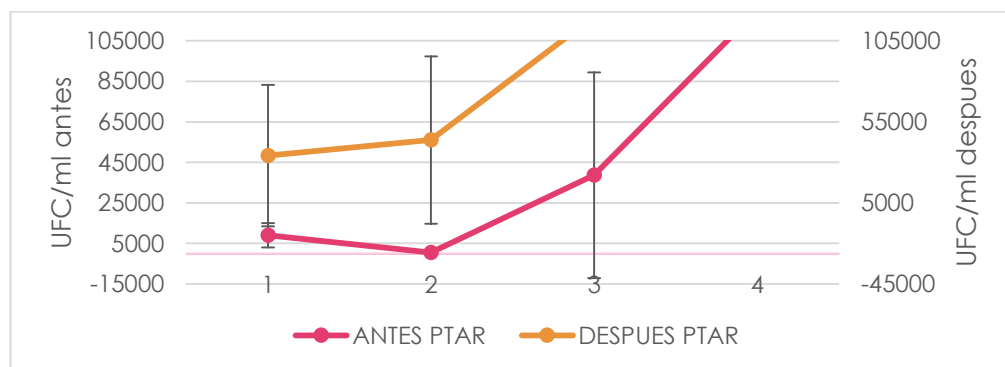
Número de muestreo	Fecha (MM/DD/AA)	Antibiótico en el medio (Si/No)
1	09/21/2016	No
2	09/28/2016	No
3	10/05/2016	No
4	10/12/2016	No
5	10/18/2016	Si
6	10/26/2016	Si
7	11/02/2016	Si
8	11/09/2016	Si
9	01/20/2017	Si
10	01/24/2017	Si
11	01/31/2017	Si
12	02/06/2017	Si

Fuente: Las autoras.

7.1.1 Recuento de totales

En los meses de septiembre y octubre para los medios de cultivo PCA y MacConkey, ambos sin antibiótico, se presentó un mayor crecimiento de UFC/ml antes y después de la PTAR en comparación a los siguientes muestreos. En la gráfica 11 se evidencia como el menor valor de UFC/ml es aproximadamente 500, presentadas en el muestreo 2. Los puntos que salen de las gráficas se consideran como incontables.

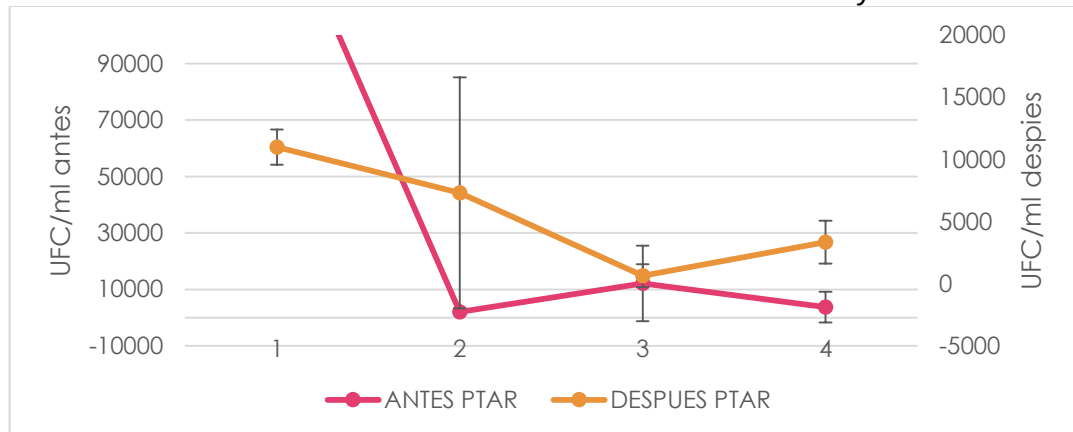
Gráfica 11: Concentración en UFC/ml en el medio PCA sin antibiótico.



Fuente: Las autoras.

Para el medio MacConkey el comportamiento de las UFC/ml fue similar al medio PCA, donde se encontró mayor número de UFC/ml en las muestras tomadas a la entrada del tratamiento, teniendo como excepción el muestreo 2 donde las mismas aumentaron en la salida de la PTAR (Gráfica 12).

Gráfica 12: Concentración en UFC/ml en el medio MacConkey sin antibiótico.



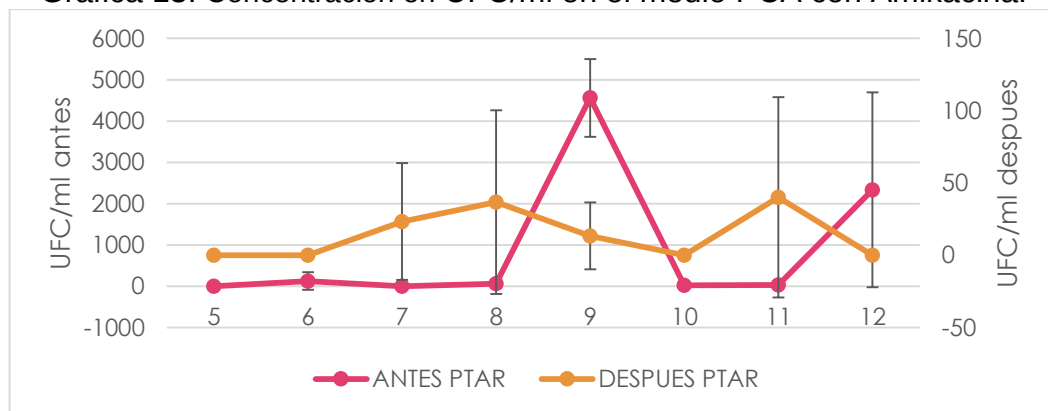
Fuente: Las autoras.

7.1.2 Recuento de resistentes.

Al preparar los medios de cultivo con los 3 antibióticos se evidencio una disminución considerable en el número de UFC/ml en comparación a los que no se utilizaron.

Las UFC/ml incontables no se presentaron en ninguno de los medios de cultivo con Amikacina, el comportamiento de las UFC/ml en el medio PCA se evidencia en la gráfica 13 donde las mismas disminuyeron en la salida de la PTAR a excepción de algunos puntos.

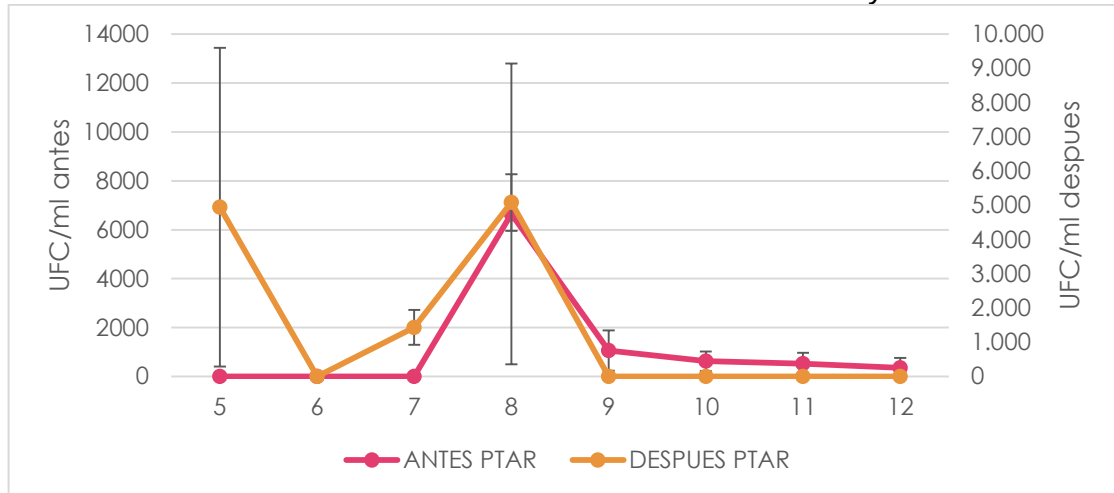
Gráfica 13: Concentración en UFC/ml en el medio PCA con Amikacina.



Fuente: Las autoras.

El medio que más UFC/ml presentó fue el MacConkey donde su pico más alto fue de aproximadamente 5000 UFC/ml (Gráfica 14).

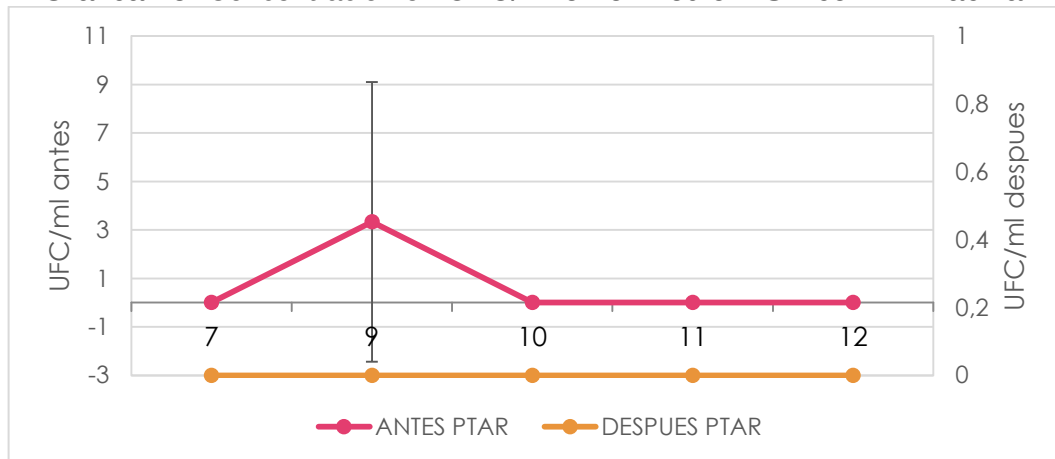
Gráfica 14: Concentración en UFC/ml en el medio MacConkey con Amikacina.



Fuente: Las autoras.

El medio de cultivo MSA con Amikacina fue el que presento menor crecimiento de UFC/ml antes y despues de la PTAR, siendo nulo el numero de microorganismos a la salida del tratamiento como se observa en la gráfica 15.

Gráfica 15: Concentración en UFC/ml en el medio MSA con Amikacina.

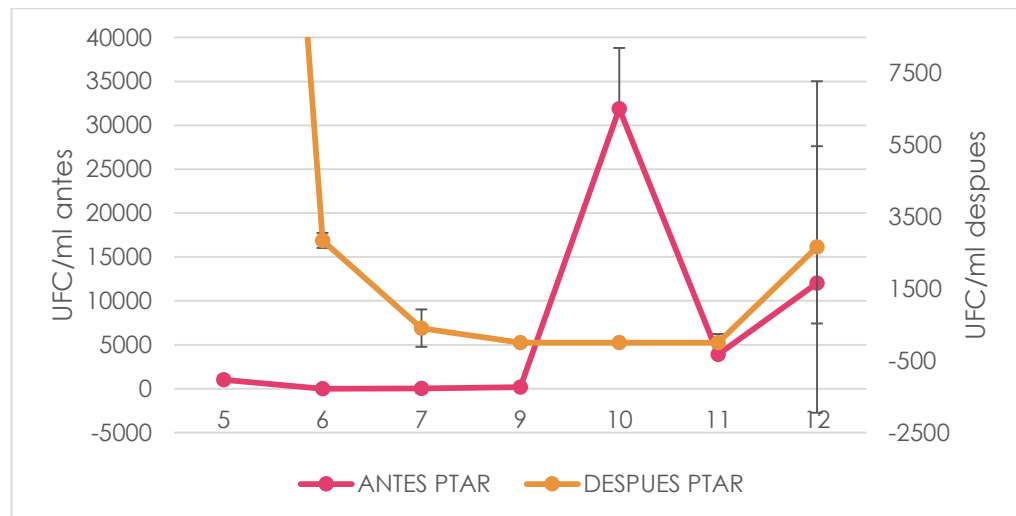


Fuente: Las autoras.

A diferencia de la Amikacina, el medio de cultivo con Ceftriaxona como antibiótico donde se presentó mayor crecimiento de UFC/ml fue en el PCA, donde el segundo pico más alto fue de 31900 UFC/ml (Gráfica 16). En los medios de cultivo con

Ceftriaxona solo se presentó un muestreo con UFC/ml incontables, sin embargo, estas aumentaron en comparación con la Amikacina.

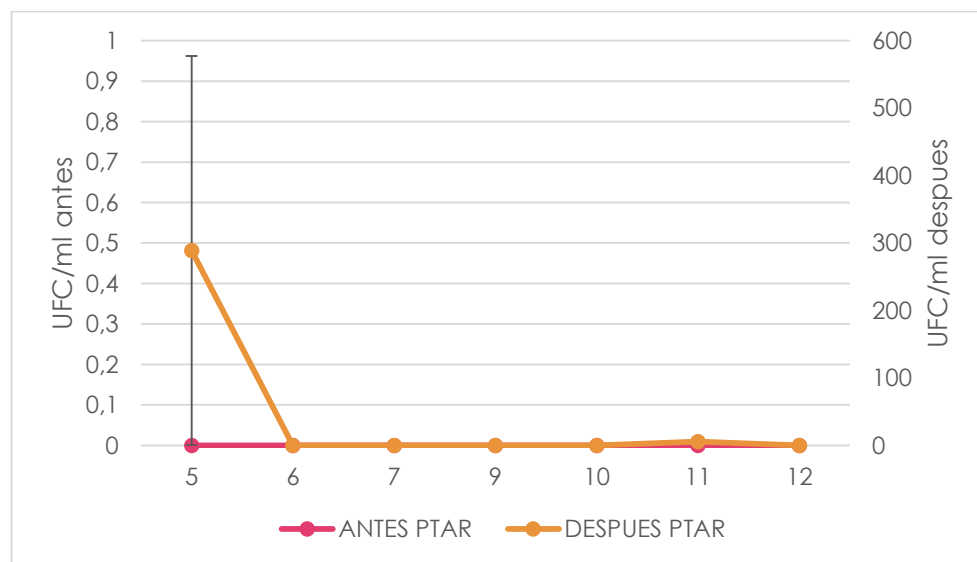
Gráfica 16: Concentración en UFC/ml en el medio PCA con Ceftriaxona.



Fuente: Las autoras.

Para el medio de cultivo MacConkey disminuyeron las UFC/ml en comparación al PCA, al ser un medio selectivo. En la gráfica 17 se observa el comportamiento de las UFC/ml, antes y después de la PTAR.

Gráfica 17: Concentración en UFC/ml en el medio MacConkey con Ceftriaxona.



Fuente: Las autoras

En el medio de cultivo MSA con ceftriaxona no se presentaron UFC/ml antes ni después de la PTAR.

La Oxacilina en comparación a los anteriores antibióticos presentó mayores UFC/ml; siendo el medio de cultivo PCA el de mayor crecimiento con 3 muestreos incontables, el siguiente pico más alto fue aproximadamente de 1860000 UFC/ml (Gráfica 19).

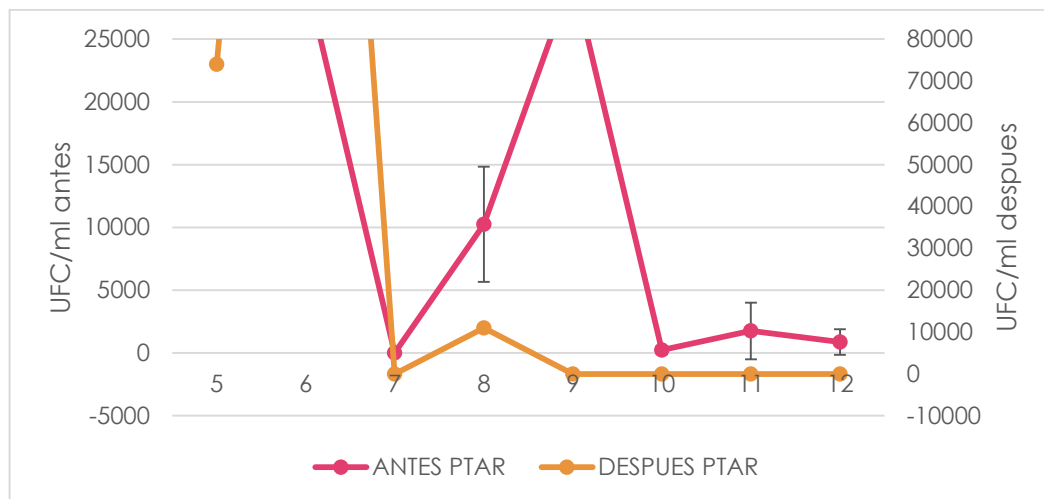
Gráfica 18: Concentración en UFC/ml en el medio PCA con Oxacilina.



Fuente: Las autoras.

En el medio de cultivo MacConkey se presentaron 4 puntos de UFC/ml incontables y el siguiente pico más alto fue de aproximadamente 74000 UFC/ml. Al igual que para la Ceftriaxona en este medio disminuyó la cantidad de UFC/ml en comparación al PCA al ser un medio selectivo (Gráfica 20).

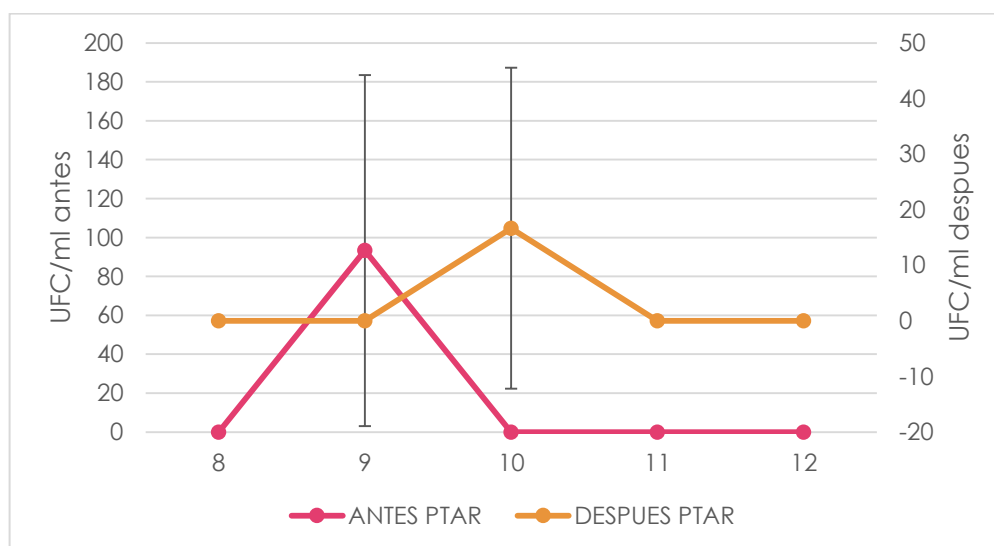
Gráfica 19: Concentración en UFC/ml en el medio MacConkey con Oxacilina.



Fuente: Las autoras.

Con Oxacilina el medio de cultivo MSA tuvo mayor crecimiento de UFC/ml en comparación a anteriores antimicrobianos con 93 UFC/ml (Gráfica 21).

Gráfica 20: Concentración en UFC/ml en el medio MSA con Oxacilina.



Fuente: Las autoras.

7.4 Método de difusión

El método de difusión en disco está basado en la presencia o ausencia de una zona de inhibición de crecimiento, se mide en milímetros. La interpretación de la prueba se basa en la correlación entre el diámetro de la zona de inhibición (mm) con la CIM ($\mu\text{g/ml}$) para cada antimicrobiano. De acuerdo al diámetro se categorizó la bacteria (Tabla 4) [48].

Tabla 4: Patrones estándar del halo de inhibición.

Antibiótico	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
	Resistente	Intermedio	Susceptible
AMK (30µg/ml)	≤14	14.01 – 16.99	≥17
CEF (30µg/ml)	≤13	13.01– 20.99	≥21
OXA (1µg/ml)	≤10	10.01– 12.99	≥13

Fuente: [66].

Para poder relacionar los resultados del método de difusión, es importante tener en cuenta el orden en que se encontraron las bacterias que fueron aisladas y posteriormente identificadas mediante el uso de API (Tabla 5).

Tabla 5: Orden de las bacterias encontradas.

Bacterias			
1	<i>Enterobacter cloacae.</i>	5	<i>Klebsiella pneumoniae.</i>
2	<i>Pantoea spp4.</i>	6	<i>Enterobacter gergoviae.</i>
3	<i>Citrobacter freundii.</i>	7	<i>Enterobacter gergoviae.</i>
4	<i>Aeromonas hydrophila.</i>	8	<i>Citrobacter freundii.</i>

Fuente: Las autoras

El diámetro del halo de inhibición en mm para cada uno de los discos en los tres antibióticos, se evidencia en la tabla 6.

Tabla 6: Resultados método de difusión muestras con mayor concentración de antibiótico.

Diámetro del halo de inhibición (mm)									
Antibiótico	Discos	Bacterias							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Amikacina	1	30	28.8	29.1	17.3	19.5	22.1	27	26
	2	32	32.4	24.9	14.3	14.5	21.1	25.9	16
	3	25	22.7	22.7	17.2	13	17.2	26.2	27
	4	26.6	35.5	24.2	18.2	11	18.2	25.1	14
Ceftriaxona	1	21.7	-	19.3	22.3	16.2	14	32	35
	2	24.1	-	25.1	19.7	21	11	26.3	20
	3	18	-	20.9	21.5	16.2	15	29.6	31
	4	22.3	-	21.6	19.2	15.2	10	23.3	23
Oxacilina	1	25.2	-	19.4	16.3	18.2	11	27.3	27
	2	21.6	-	27.1	19.8	15.2	12	26	22
	3	31.1	-	26.8	17.1	16	9	25	10
	4	25.2	-	21.1	19.3	15.9	12.1	24	12

Fuente: Las autoras.

Teniendo en cuenta los diámetros obtenidos y los patrones estándar para la clasificación de los mismos, se nombró como “S” a los halos que son susceptibles, “I” a los intermedios y por ultimo “R” a los que mostraron resistencia a los antibióticos (Tabla 7).

Tabla 7: Caracterización de los halos de inhibición en las muestras con mayor concentración de antibiótico.

Halos de inhibición									
Antibiótico	Discos	Bacterias							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Amikacina	1	S	S	S	S	S	S	S	S
	2	S	S	S	I	I	S	S	I
	3	S	S	S	S	R	S	S	S
	4	S	S	S	S	R	S	S	R
	Caracterización	S	S	S	R	R	S	S	R
Ceftriaxona	1	S	-	I	S	I	I	S	S
	2	S	-	S	I	S	R	S	I
	3	I	-	I	S	I	I	S	S
	4	S	-	S	I	I	R	S	S
	Caracterización	R	-	R	R	R	R	S	R
Oxacilina	1	S	-	S	S	S	I	S	S
	2	S	-	S	S	S	I	S	S
	3	S	-	S	S	S	R	S	R
	4	S	-	S	S	S	I	S	I
	Caracterización	S	-	S	S	S	R	S	R

Fuente: Las autoras.

Para obtener la caracterización o el grado de susceptibilidad a los antibióticos se tuvo en cuenta que por lo menos uno de los halos fuese intermedio o resistente para que la bacteria se considere resistente al antibiótico, ya que dentro de la misma cepa hay bacterias que al ser resistentes puede hacer transferencia de genes de resistencia de manera horizontal [40].

La mayoría de los halos de inhibición con la concentración 800 veces mayor presentaron características de susceptibilidad, sin embargo, aun en una concentración tan alta, en algunos casos mostraron ser intermedios o resistentes.

- La bacteria 1 *Enterobacter cloacae*, se considera susceptible a la Amikacina y a la Oxacilina y resistente a la Ceftriaxona.
- En la bacteria 2 *Pantoea spp*, solo se pudo hacer análisis con Amikacina ya que los otros antibióticos fueron contaminados por hongos, la bacteria mostro ser susceptible a este antibiótico.
- La bacteria 3 *Citrobacter Freudii*, se considera susceptible a la Amikacina y la Oxacilina y resistente a la Ceftriaxona.
- La bacteria 4 *Aeromonas hydrophila*, con Amikacina y Ceftriaxona fue resistente y solo presento susceptibilidad a la Oxacilina.
- La bacteria 5 *Klebsiella pneumoniae*, solo fue susceptible a la Oxacilina, para el caso de la Amikacina y la Ceftriaxona fue intermedia.
- La bacteria 6 *Enterobacter gergoviae*, fue susceptible a la Amikacina, resistente a la Ceftriaxona y a la Oxacilina.
- La bacteria 7 fue nuevamente *Enterobacter gergoviae* esta vez la bacteria presento susceptibilidad a los 3 antibióticos.
- La bacteria 8 se identificó como *Citrobacter Freudii* nuevamente y a diferencia que en la primera ocasión mostro ser resistencia a todos los antibióticos.

En cuanto a los antibióticos, el que presento menor efectividad en la concentración 800 veces mayor fue la Ceftriaxona ya que se evidenciaron halos de inhibición con características de intermedios en 2 bacterias la *Aeromonas hydrophila* y *Klebsiella pneumoniae* y 1 resistente *Enterobacter gergoviae*. Por su parte la Amikacina también fue intermedia para: *Aeromonas hydrophila* y *Klebsiella pneumoniae* y la Oxacilina para la *Enterobacter gergoviae*.

En la tabla 8 se observa los resultados de susceptibilidad a los antibióticos de los halos de inhibición con la concentración estándar y corregida.

Tabla 8: Resultados método de difusión muestras con menor concentración de antibiótico.

Diámetro del halo de inhibición (mm)						
Antibiótico	Discos	Bacterias				
		4	5	6	7	8
Amikacina	1	6	6	6	6	-
	2	6	6	6	6	-
	3	6	6	6	6	-
	4	6	6	6	6	-
Ceftriaxona	1	6	6	6	6	6
	2	6	6	6	6	6
	3	6	6	6	6	8
	4	6	6	6	6	10
Oxacilina	1	6	6	6	6	6
	2	6	6	6	6	6
	3	6	6	6	6	6
	4	6	6	6	6	6

Fuente: Las autoras.

Al igual que se hizo con los halos con concentración 800 veces mayor de antibióticos, se caracterizó la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos como se muestra en la tabla 9, teniendo en cuenta el promedio para cada bacteria de los halos de inhibición.

Tabla 9: características de los halos de inhibición en las muestras con menor concentración de antibiótico.

Halos de inhibición						
Antibiótico	Discos	Bacterias				
		4	5	6	7	8
Amikacina	Caracterización	R	R	R	R	-
Ceftriaxona	Caracterización	R	R	R	R	R
Oxacilina	Caracterización	R	R	R	R	R

Fuente: Las autoras

Con las concentraciones menores todas las bacterias fueron resistentes a los tres antibióticos. Es importante mencionar que no se tuvo en cuenta esta concentración para las primeras 3 bacterias ya que no se contaba con los cultivos en el momento de realizar la corrección a la concentración estándar.

Para mayor confiabilidad del experimento se realizó el mismo procedimiento con agua del acuario ubicado en el laboratorio de microbiología de la Universidad Santo Tomás, el cual lleva aproximadamente 5 años confinado como humedal artificial, por lo que se espera total ausencia de microorganismos patógenos. Se hizo una siembra por cada medio, cada antibiótico y también sin antibiótico, en el caso de los medios que se utilizó antibiótico no creció ningún tipo de microorganismo, sin embargo en los medios que no lo contenían se obtuvieron 6370 UFC/ml en MacConkey y 5780 UFC/ml en el PCA.

Adicionalmente se realizó el aislamiento de una de las bacterias que creció en los medios sin antibiótico, obteniendo como resultado un crecimiento nulo de bacterias tanto en la placa que contenía los discos con mayor concentración como en las de menor concentración, los resultados de los halos de inhibición se muestran en la tabla 10.

Tabla 10: resultados método de difusión muestra de acuario.

Diámetro del halo de inhibición (mm)			
Antibiótico	Disco	Diámetro	
Amikacina	1	21	S
	2	23	S
	3	19	S
	4	22	S
Ceftriaxona	1	NCr	S
	2	NCr	S
	3	NCr	S
	4	NCr	S
Oxacilina	1	24	S
	2	29	S
	3	25	S
	4	22	S

Fuente: Las autoras.

7.5 Bacterias identificadas

Como se mencionó se tenía como objetivo encontrar tres microorganismos en el vertimiento de agua residual del Hospital de Suba II Nivel E.S.E en Bogotá que presentaran resistencia a la Ceftriaxona, Amikacina y Oxacilina; sin embargo finalmente se pudieron aislar e identificar ocho bacterias de las cuales la *Citrobacter freundii* y la *Enterobacter gergoviae* se encontraron dos veces.

Las bacterias encontradas y su taxonomía se evidencian en la tabla 11.

Tabla 11: Taxonomía de las bacterias identificadas.

ESPECIE	GENERO	FAMILIA	ORDEN	CLASE	FILO	DOMINIO
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter</i>	Enterobacteriaceae	Enterobacteriales	Gammaproteobacteria	Proteobacteria	Bacteria
<i>Pantoea spp4</i>	<i>Enterobacter</i>					
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter</i>					
<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Enterobacter</i>					
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella</i>					
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales			

Fuente: Las autoras.

7.6 Implicaciones en el medio ambiente y la salud por microorganismos resistentes a los antibióticos

Las bacterias encontradas causan diferentes tipos de enfermedades, estas se encuentran clasificada según la CIE-10, mostrando que este tipo de microorganismos se asocia en gran magnitud a enfermedades del aparato genitourinario (Tabla 12).

Tabla 12: Clasificación de algunas enfermedades causadas por las bacterias encontradas.

BACTERIAS	ENFERMEDADES	CIE-10	
<i>Enterobacter cloacae</i>	Infecciones urinarias	Enfermedades del aparato genitourinario	N00-N99
	Neumonía	Enfermedades del sistema respiratorio	J00-J99
<i>Pantoea spp4.</i>	Infecciones en tejidos blandos	Enfermedades del sistema osteomuscular y del tejido conectivo	M00-M99
	Sepsis neonatal	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal	P00-P96
<i>Citrobacter freundii.</i>	Infecciones urinarias	Enfermedades del aparato genitourinario	N00-N99
	Meningitis	Ciertas enfermedades infecciosas y parasitarias	A00-B99
	Sepsis neonatal	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal	P00-P96
<i>Aeromonas hydrophila.</i>	Infecciones urinarias	Enfermedades del aparato genitourinario	N00-N99
	Diarreas agudas	Enfermedades del aparato digestivo	K00-K93
	Septicemia	Enfermedades de la sangre	D50-D89
	Neumonía	Enfermedades del sistema respiratorio	J00-J99
<i>Klebsiella pneumoniae.</i>	Infecciones del tracto urinario	Enfermedades del aparato genitourinario	N00-N99
	Neumonía	Enfermedades del sistema respiratorio	J00-J99
	Infecciones de tejidos blandos	Enfermedades del sistema osteomuscular y del tejido conectivo	M00-M99
<i>Enterobacter gergoviae.</i>	Infecciones urinarias	Enfermedades del aparato genitourinario	N00-N99
	Infecciones pulmonares	Enfermedades del sistema respiratorio	J00-J99

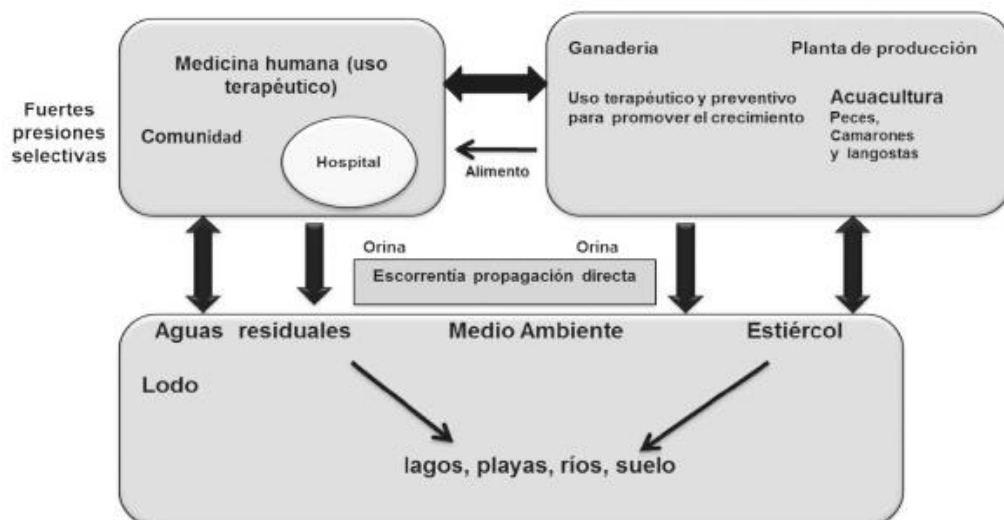
Fuente: Las autoras

Por la relevancia de las enfermedades que producen las bacterias encontradas, es importante tener en cuenta que al no controlar el vertimiento de este tipo de microorganismos se está contribuyendo a la alteración del medio ambiente y a la proliferación de los mismos, mediante el aumento de la proporción de resistencia frente a microorganismos anteriormente susceptibles [67] [48].

Además, los antibióticos por ser considerados contaminantes y al ser vertidos en el alcantarillado o las aguas superficiales podrían llegar hasta las aguas subterráneas y acuíferos, utilizados para el consumo humano; no solo con trazas de los mismos sino también con este tipo de microorganismos.

Las bacterias resistentes a los antibióticos se liberan en las aguas a través de la orina, heces, estiércol y usan como ruta principal las aguas residuales de los hospitales, efluentes municipales, de la industria ganadera, que constituyen probablemente las mayores fuentes de bacterias y de genes de resistencia a antibióticos que se liberan en el medio ambiente (Imagen 27). El uso intensivo de compuestos químicos persistentes, aumenta la presión selectiva en bacterias, facilitado la transferencia de la resistencia a antibióticos entre las comunidades de bacterias en ambientes acuáticos que producen efectos adversos en peces, invertebrados, tortugas, entre otros [68]

Imagen 27: Representación esquemática de flujo de bacterias resistentes a antibióticos en diferentes ecosistemas y sus áreas de uso.



Fuente: [68]

Dicho lo anterior el impacto que genera la resistencia de antibióticos esta dado principalmente al medio ambiente y el ser humano al hacer uso de los servicios ecosistemicos aumenta la exposición y el riesgo de adquirir estos genes, por ejemplo mediante el consumo alimentos como legumbres regadas con agua proveniente de ecosistemas acuáticos con microorganismos genéticamente resistentes.

7.7 Riesgo de prevalencia de bacterias resistentes

Para remplazar los valores máximos hay que tener en cuenta lo siguiente:

- C se remplazara con valores de 300 UFC/caja en la dilución 10-2 lo que corresponde a 300000 UFC/ml cuando las UFC/ml son incontables.
- R será del 87.71% ya que se tomara el peor escenario según el estudio en el que se basó para determinar dicha variable.
- I es la cantidad de patógenos que para valores máximos serian todas.
- DR se toma como valor de 1 que significa que lo que entro a la PTAR fue lo mismo que salió.
- Para el caso de la pendiente es la que corresponde a Oxacilina porque se basa en el peor escenario.

Con respecto a los anteriores valores se rempazan así (Ecuación 7.1):

$$Rpbr = 1 \times \frac{1}{0.8771} \times 1 \times \frac{1}{0.0147184} \quad (7.1)$$

Ecuación 7.15 Riesgo de prevalencia de bacterias resistentes con los valores máximos.

$$Rpbr_{final} = \frac{(C \times \frac{1}{R} \times I \times p)^{DR}}{210,56} \quad (7.2)$$

Ecuación 7.2 Riesgo de prevalencia de bacterias resistentes con el resultado del valor máximo.

Con respecto a lo anterior obtenemos la tabla 13

Tabla 13: Calculo de riesgo de prevalencia de bacterias resistentes

	riesgo de prevalencia de bacterias resistentes	Recuento resistentes en PCA (UFC/ml)	Eficiencia de recuperació n metodo de recuento	Proporción de patógenos (total cepas resistentes/ cepas patogenas)	Eficiencia de eliminación PTAR (UFC/ml salida / UFC/ml entrada)	Pendiente (halo_Vs_c oncentracio nAntibiotic)	UFC/ml PCA+Antibi otico	UFC/ml PCA	UFC/ml salida	UFC/ml entrada
riesgo final	210,56	1	0,8771	1	1	0,0147184	300000	300000	30000	30000
RIESGO AMIK	0,000288823	0,0044483	0,8771	0,2	0,0159102	0,0169462	821,92308	184770,83	13,076923	821,92308
RIESGO CEF	0,016244283	0,2365401	0,8771	0,2	0,1602602	0,0185097	43705,714	184770,83	7004,2857	43705,714
RIEGO OXA	0,073061122	0,715535	0,8771	0,2	0,3277038	0,0147184	132210	184770,83	43325,714	132210

Fuente: Las autoras.

Según lo anterior se pudo observar que el antibiótico con más riesgo es la Oxacilina al ser un antibiótico que permite el crecimiento de mayor cantidad de UFC/ml; concordando con el valor de la pendiente ya que esta infiere que la Oxacilina es el antibiótico que tiene menor efecto cuando se aumenta la concentración y en este caso para la preparación de los medios con antibióticos se dejaron con la misma concentración, a diferencia de los discos.

8. Análisis de resultados

En el presente trabajo se intentó evaluar la resistencia en los microorganismos más abundantes aislados, constituyendo un aporte al conocimiento de la diversidad de microorganismos resistentes en este ambiente, a diferencia de estudios revisados donde la finalidad era buscar un solo microorganismo en general *E. coli*.

Respecto al comportamiento los antibióticos; la Ceftriaxona, es el único de los antibióticos en estudio que se controla a nivel distrital según la guía del uso Prudente de Antibióticos a nivel distrital, y conforme a los resultados y la comparación con los diámetros estándar de los halos de inhibición presentó mayor porcentaje de resistencia específicamente para la *Enterobacter gergoviae* e intermedio en *Klebsiella pneumoniae* y *Aeromonas hydrophila*; una de las razones por la que puede presentarse este comportamiento es por ser un antibiótico de amplio espectro lo que quiere decir que cubre una mayor cantidad de infecciones y por consiguiente es frecuentemente utilizado y aplicado en los centros de atención hospitalaria [69] [70] [63] .

Las malas prácticas frente al uso de los antibióticos los hacen menos eficientes y aumenta la posibilidad de que se adquiera resistencia, haciendo necesario la generación de nuevos antibióticos. Por ejemplo la Ceftriaxona es utilizada para infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae*, bacteria que mostró resistencia intermedia en su clasificación según los halos de inhibición [71].

La Oxacilina fue el antibiótico para el cual se presentó mayor susceptibilidad, para la caracterización de la susceptibilidad de cada una de las bacterias se contó con la variación existente en los niveles estándar para cada antibiótico, esto quiere decir que a pesar de que la Oxacilina presentó los halos más pequeños no corresponde a que tenga mayor porcentaje de resistencia (Grafica 8).

Para los halos de inhibición, en las dos concentración de los discos con antibiótico, los resultados que se obtuvieron fueron bastante robustos como para hacer una comparación entre los antibióticos y las bacterias, debido a que si se hubiese evaluado la resistencia únicamente con la concentración estándar todas las bacterias aisladas serían poliresistentes y no se habría podido determinar cuál de estas es más o menos susceptible a los antibióticos en estudio.

Algunas bacterias que producen betalactamasas de espectro extendido (BLEE) como: *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter gergoviae* y *Aeromonas hydrophila* pueden ser resistentes al

antibiótico por producir enzimas, lo cuál es coherente con que 3 de las 5 bacterias fueron resistentes a la Ceftriaxona.

Dicho lo anterior se determinó que las bacterias resistentes a concentraciones elevadas fueron: *Aeromonas hydrophila* y *Klebsiella pneumoniae*, estas no se inhibieron aún en una concentración mas alta, lo que quiere decir que el mecanismo de resistencia o de inactivación del antibiótico, a través de la producción de enzimas, no se vio afectado por la concentración del antibiótico, por ejemplo estas tuvieron nivel resistente e intermedio a la Amikacina y a la Ceftriaxona, se puede intuir que el mecanismo de resistencia depende de la impermeabilidad al antibiótico o modificación del sitio blanco. La *Enterobacter gergoviae* fue intermedio a la Ceftriaxona y la Oxacilina, sin embargo la Oxacilina presento menor porcentaje de resistencia.

Es importante mencionar que la *Klebsiella pneumoniae* es el patógeno más virulento después de la *E.coli* y su forma más patógena es por vía aérea, sin embargo por vía acuática es su forma de propagación más eficaz y por eso se debe tener en consideración dicha vía, adicionalmente se desconoce la cinética de la bacteria, por otro lado esta bacteria causa ITU aparte de las IRA, sin embargo las otras bacterias a pesar de que son oportunistas son importantes ya que la transmisión de genes de resistencia a antibióticos ocurre de manera horizontal, es decir entre organismos sin necesidad de relación de parentesco directo. La proliferación en el medio ambiente de microorganismos no necesariamente patógenos, con genes de resistencia aumenta la abundancia y la prevalencia en el medio ambiente [40].

La *Enterobacter gergoviae* a pesar de ser aislada esporadicamente según el Servicio de Medicina Interna del Hospital Nuestra Señora del Prado, se logro identificar dos veces mostrando comportamientos opuestos en sus halos de inhibición, esto se debe a que las cepas a las que se les realizó el método de difusión fueron de diferentes cultivos puros [39].

Aunque el objetivo final de la mayoría de los estudios sobre la resistencia antibiótica ambiental se asocia con salud humana, este es probablemente el tipo de riesgo menos explorado, debido en parte, a brechas importantes que obstaculizan las evaluaciones de riesgo confiables, en particular, la inexistencia de bases de datos que relacionen los datos de resistencia humanos y ambientales relacionados [40].

El impacto más significativo radica en la descarga de aguas residuales hospitalarias con alta carga bacteriana generando la aparición y el incremento de resistencia debido a que algunos microorganismos poseen genes y al estar en contacto con aquellos que no, pueden propagarse. La presencia de bacterias no patógenas

resistentes representa un riesgo para los seres humanos y el medio ambiente en que pueden actuar como reservorios de resistencia, contribuir al almacenamiento y difusión de los genes de resistencia a los antibióticos [48] [55].

La diferencia entre el resultado obtenido entre riesgo y el metodo de Kirby-Baur es debido a la concentracion en ambos casos ya que para los medios de cultivo se utilizó la misma concentracion en todos los medicamentos y para los discos fueron diferentes para cada antibiotico, cabe aclarar que cada uno tiene un analisis diferente ya que en el metodo de Kirby-Bauer se evalua el perfil de resistencia de cada bacteria y en analisis de riesgo el efecto de prevalencia de cada antibiotico con respecto a las UFC/ml totales.

Con respecto a los resultados de riesgo la Oxacilina se muestra como el antibiotico donde se favorece la prevalencia de los microorganismos con un riesgo de 0,07; el tratamiento realizado en la PTAR no es totalmente efectivo porque existe un nivel riesgo y teniendo en cuenta que la mayoría de hospitales no cuenta con ningun sistema de tratamiento este aumenta, ya que al no existir tratamientos de eliminacion de este tipo de contaminantes emergentes, los efluentes estan afectando directamente a los cuerpos de agua y por ende al ecosistema.

A pesar de la PTAR cuenta con un tratamiento de desinfección con cloro este no es del todo efectivo, debido a que no elimina las trazas de antibioticos, por tal razón es necesario entrar a determinar el tipo de contaminantes emergentes presentes en estos efluentes y su mecanismo de eliminación, para que con la implementación de estas medidas se logre reducir al máximo los reservorios que favorezcan a los microorganismos con características de resistencia que son expulsados a los cuerpos de agua y asi minimizar los impactos ambientales.

9. Conclusiones

Se logró determinar la presencia de ocho microorganismos resistentes mediante su aislamiento en medios de cultivo (PCA, MSA y MacConkey) con antibióticos a partir del agua residual proveniente de los servicios hospitalarios del Hospital de Suba; las especies identificadas fueron: *Enterobacter cloacae*, *Pantoea spp*, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter gergoviae*; estas dos últimas encontradas dos veces.

Se identificó el perfil de resistencia de estos ocho microorganismos frente a los antibióticos Ceftriaxona, Oxacilina y Amikacina; la Ceftriaxona fue el antibiótico que presentó mayor nivel de resistencia seguido por la Amikacina, esto se debe a que son medicamentos de amplio espectro; la Oxacilina fue la de mayor porcentaje de susceptibilidad. La concentración del antibiótico constituye un factor que disminuye la resistencia de las bacterias, ya que al variar la concentración de antibiótico en los discos se detectó un gradiente en los halos de inhibición, mostrando que cepas que quedaban caracterizadas como resistentes a concentraciones estándar presentan niveles de sensibilidad en mayores concentraciones de antibiótico.

El tratamiento efectuado en la PTAR no es lo suficientemente eficiente para la eliminación total de las trazas de antibióticos que favorecen la presencia de microorganismos resistentes y al no existir una normatividad o entidad que vigile y controle los vertimientos hospitalarios, estas entidades no invierten dinero ni ven la necesidad de implementar otros procesos u optimizar los que ya están para disminuir esta problemática.

Los riesgos de transmisión de la resistencia a los antibióticos, deben ser manejados bajo el principio de precaución porque puede traer consecuencias negativas al medio ambiente y a la salud.

Se realizaron cuatro protocolos para laboratorio con el fin de garantizar que los datos desde el punto de vista de la técnica del método, se realicen de manera correcta

10. Recomendaciones

Realizar un proceso de zonificación a través de la utilización de tenso activos con el fin de evitar la presencia de solidos suspendidos en la muestra que pueden influir en la cantidad de unidades formadoras de colonia.

Se recomienda que la planta realice una medición de la remoción en cada uno de los procesos, con el fin de evaluar el funcionamiento y la eficiencia de los mismos, así como la implementación de procesos que eliminen las trazas de antibióticos presentes en los vertimientos hospitalarios.

Para la toma de muestra tener en cuenta el tiempo que tarda la planta de tratamiento en realizar su proceso, para así conocer la cantidad de remoción real por cada muestra.

Con el fin de tener mayor confiabilidad en la comparación entre los datos es necesario que se realice para cada uno de los muestreos, un tratamiento control.

Se sugiere utilizar otro método de identificación de los microorganismos como espectrofotometría de masas que sea más preciso y eficaz, con el fin de identificar las bacterias antes y después de la PTAR para finalmente realizar el método de difusión con la misma bacteria en cada punto de muestreo

Utilizar los discos con las concentraciones que se venden comercialmente y en el medio de cultivo Müller-Hinton, para evitar errores en el método.

Debido a la ausencia de una normatividad y legislación colombiana, es recomendable la generación de medidas como la educación a los operarios de las plantas de tratamiento de aguas residuales acerca de la importancia de los vertimientos con alta carga bacteriana y presencia de contaminantes emergentes como los antibióticos.

Se recomienda tener instalaciones adecuadas y equipos en el laboratorio de microbiología, ya que la falta de infraestructura e instrumentos limitan los resultados de la investigación.

11. Bibliografía

- [1 Organización mundial de la salud OMS, «Resistencia a los antimicrobianos,» 2016.
]
- [2 D. Hocquet, A. Muller y X. Bertrand, «What happens in hospitals does not stay in
] hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater,» *Journal of Hospital Infection*, vol. 93, pp. 395-402, 2016.
- [3 GreenFacts, «Resistencia a los antibióticos: causas, consecuencias y formas de
] contenerla,» 2014.
- [4 J. Silva Sánchez, «Resistencia a antibióticos,» *Medigraphic*, pp. 106-112, Abril 2005.
]
- [5 J. L. Martinez, «Environmental Pollution by antibiotics and by antibiotic resistance
] determinants,» *Environmental Pollution* , vol. 157, pp. 2893-9902, 2009.
- [6 M. Gil , A. Soto, J. Usma y O. Gutierrez, «Contaminantes emergentes en aguas,
] efectos y posibles tratamientos,» *Produccion + limpia*, vol. 7, pp. 52-73, 2012.
- [7 Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible , «Resolucion 0631,» 2015.
]
- [8 A. Embid, «Resistencia de las bacterias a los antibióticos,» *Revista de Medicinas
] Complementarias*, pp. 46-54, 2009.
- [9 L. Benavides, L. Aldama y J. Vázquez, «Vigilancia de los niveles de uso de antibióticos
] y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México,» *Salud Pública de México*, vol. 47, nº 3, 2005.
- [1 J. L. Martinez , «Environmental pollution by antibiotics and by antibiotics resistance
0] determinants,» *Environmental pollution*, vol. 157, pp. 2893-2902, 2009.
- [1 X. Zhang, T. Zhang y H. Fang, «Antibiotic resistance genes in water environmental,»
1] *Appl microbiol biotechnol*, vol. 83, pp. 397-414, 2009.
- [1 Alianza Para el uso Prudente de Antimicrobianos, «Nueva informacion acerca del
2] estudio de reservorios de resistencia (ROAR),» *Medigraphic*, vol. 29, nº 2, pp. 77-88, 2009.

- [1 J. Martinez, «The role of natural environmental in the evolution of resistance traits in
3] pathogenic bacteria,» *The royal society*, vol. 276, pp. 2521-2530, 2009.
- [1 G. Wrigth, «Antibiotic resistance in the environmental: a link to the clinic?,» *Current
4] opinion in microbiology*, vol. 13, pp. 589-594, 2009.
- [1 Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU., *Antibioticos*, American Society of
5] Health, 2016.
- [1 A. Korolkovas y J. Burckhalter, «Compendio esencial de quimica farmaceutica,»
6] Reverté, España, 2006.
- [1 Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU., *Ceftriaxona*, American Society of
7] Health-System Pharmacists, Inc., 2016.
- [1 Centro colaborador de la Administracion Nacional de Medicamentos, Alimentos y
8] Tecnologia Medica, ANMAT., *Ceftriaxona*, Argentina, 2010.
- [1 Centro colaborador de la Administracion Nacional de Medicamentos, Alimentos y
9] Tecnologia Medica, ANMAT., *Amikacina*, Argentina, 2004.
- [2 Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU., *Amikacina*, American Society of
0] Health-System Pharmacists, Inc, 2015.
- [2 Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU., *Oxacilina*, American Society of Health-
1] System Pharmacists, Inc, 2015.
- [2 Centro colaborador de la Administracion Nacional de Medicamentos, Alimentos y
2] Tecnologia Medica, ANMAT., *Oxacilina*, Argentina, 2008.
- [2 L. Diaz, «Resistencia bacteriana,» *Revista Cubana Medicina Militar*, vol. 1, pp. 44-48,
3] 2003.
- [2 v. Wintersdorff, J. Penders, v. Niekerk , N. Mills , S. Majumder, A. van , P. Savelkoul y
4] P. Wolffs , «Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems
through Horizontal Gene Transfer,» *U.S. National Library of Medicine*, 2016.
- [2 O. Sussmann, L. Mattos y A. Restrepo, «Resistencia bacteriana,» Universidad
5] Javeriana, Bogota , 2010.
- [2 C. Alonso, *Como tratar Enterobacter cloacae*, 2016.
6]

- [2 V. Fernandez, F. Ballesteros , J. Hervaz, P. Villalon, V. Benedi y S. Alberti, «Molecular
7] epidemiological typing of Enterobacter cloacae isolates from a neonatal intensive care
unit: three-year prospective study,» *Journal of Hospital Infection*, vol. 49, nº 3, pp. 173-
182, 2001.
- [2 P. X. Cassigara, «Síntomas de Enterobacter cloacae,» [En línea]. Available:
8] http://www.ehowenespanol.com/sintomas-enterobacter-cloacae-lista_102495/.
- [2 A. Segado, A. Alonso, A. Garcia y S. Lopez, «Pantoea agglomerans: ¿un nuevo
9] patógeno en la unidad de cuidados intensivos neonatales?,» *SciELO*, vol. 110, pp. 77-
79, 2012.
- [3 Decuadro, Ruiz, Martino , Sala y Benech, «Neumonía en gato causada por
0] Enterobacter (Pantoea), reporte de un caso clínico,» *smvu*, pp. 26-31, 2015.
- [3 H. Habsaha, M. Zeehaidaa, H. Rostenbergheb, R. Roraidab, W. Pauzib y I. Fatimahb,
1] «An outbreak of Pantoea spp. in a neonatal intensive care unit secondary to
contaminated parenteral nutrition,» *Journal of Hospital Infection*, vol. 61, nº 3, p. 213–
218, 2005.
- [3 V. Meseguer , M. Carmona Martín, F. Polo y A. Fernández , «Bacteriemia por
2] Citrobacter freundii: presentación de dos casos.,» *SciELO*, vol. 19, nº 2, 2002.
- [3 O. González, F. Montes , A. Mayorga y M. Letelier , «Infeccion por Citrobacter freudii,»
3] *Biblioteca Virtual de Salud en Honduras*, vol. 9, nº 1, pp. 6-12, 1982.
- [3 M. Herrera, A. Vargas, T. Moya, M. Campos y I. Yock, «Aislamientos de Aeromonas
4] hydrophila.,» *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños*, vol. 35, 2000.
- [3 Facultad de quimica UNAM, *Listado de bacterias*, Mexico, 2011.
5]
- [3 EcuRed, *Aeromonas hydrophila*, Cuba: Enciclopedia Cubana , 2007.
6]
- [3 M. Pinto , M. Ulloa y C. Toro, *La prevención es clave frente a Klebsiella pneumoniae*
7] *productora de KPC*, Chile: Facultad de medicina de la universidad de Chile, 2012.
- [3 R. Breed, M. y N. Smith, *BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE*
8] *BACTERIOLOGY*, united states: COPYRIGHT, 1957.

- [3 F. Marcos , M. Albo, F. Arbol, F. Casallo y A. Duran, «Infección de vías respiratorias
9] bajas por *Enterobacter gergoviae*,» *Servicio de Medicina Interna del Hospital Nuestra Señora del Prado*, vol. 22, nº 11, 2005.
- [4 C. Manaia, «Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the
0] Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk,»
Trends in Microbiology, vol. 25, nº 3, pp. 173-181, 2017.
- [4 G. Wright, «The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity,»
1] *Department of Biochemistry and Biomedical Sciences*, vol. 5, 2007.
- [4 International Association for Food Protection, «Antimicrobial Resistance Risk
2] Assessment in Food Safety,» *Journal of Food Protection*, vol. 67, nº 9, p. 2063–2071 ,
2004.
- [4 Ministerio de Salud y Proteccion Social, «Guia Tecnica “Buenas practicas para la
3] seguridad del paciente en la atencion en salud”,» Biblioteca virtual , Bogota , 2014.
- [4 Instituto Nacional de Salud , «Vigilancia y analisis del riesgo en salud pública protocolo
4] de vigilancia en salud publica consumo de antibiotico en el ambito hospitalario,» 2015.
- [4 Secretaria Distrital de Salud , «Política de prevención, vigilancia epidemiológica y
5] control de infecciones intrahospitalarias,» Bogota , 2008.
- [4 Unidad Administrativa Especial de Catastro Distrital., Portal Mapas de Bogota, Febrero
6] 2011. [En línea]. Available: <http://mapas.bogota.gov.co/portalmapas/>.
- [4 Ingeniar Ambiente , «Manual de operacion del sistema de tratamiento de aguas
7] residuales industriales, Hospital de Suba E.S.E.,» Manual PTAR, Bogota, 2014.
- [4 S. Mora y D. Bolaños, «Evaluación de la presencia de resistencia a Ceftriaxona,
8] Amikacina y Oxacilina en *Escherichia coli* en vertimientos de agua residual del
Hospital de Suba II Nivel E.S.E en Bogotá,» Bogota, 2015.
- [4 L. Zambrano, Protocolo para toma de muestras de aguas residuales, Corporación para
9] el Desarrollo Sostenible del Sur de la Amazonia, 2010.
- [5 A. Chavez, J. Mora y S. Arias, «Proyecto piloto de prospección de bioactividad en
0] organismos marinos colombianos.,» Ivemar, Santa Marta, 2005.
- [5 D. Montgomery, Design and Analysis of Experiments, WILEY, 1991.
1]

[5 K. Hinkelmann y O. Kempthorne, Design and Analysis of Experiments, WILEY, 2008.
2]

[5 Servicio Nacional de Aprendizaje SENA , «Manual de procedimiento de toma de
3] muestra de agua,» Bolivar , 2011.

[5 E. Santambrosio, M. Ortega y P. Garibaldi, «Preparacion de medios de cultivo,»
4] Universidad Tecnologica Nacional, Caba. Argentina , 2009.

[5 L. Nuñez, C. Tornello, N. Puentes y J. Monetton, «Bacterias resistentes a antibióticos
5] en aguas grises como agentes de riesgo sanitario,» *Revista Ambiente & Água* , vol. 7,
nº 1, pp. 235-243, 2012.

[5 E. Tzoc, M. Arias y C. Valiente, «Efecto de las aguas residuales hospitalarias sobre los
6] patrones de resistencia a antibióticos de Escherichia coli y Aeromonas,» *Biomed*, vol.
15, pp. 165-172, 2004.

[5 E. Watson, «Técnicas para el estriado de una placa de agar,» 2010.
7]

[5 DIFGO FRANCISCO SORIA MELGUIZO, S.A, «Ficha tecnica plate count agar,»
8] septiembre 2009. [En línea]. Available: http://f-soria.es/Inform_soria/Difco%20Fichas%20tecnicas/PLACAS%20DIFCO%20Y%20CROMOGENICAS%20BD/FT%20PLATE%20COUNT%20AGAR.pdf.

[5 Wold health Organization and Organisation for Economic Co-operation and
9] Development by, «Assessing Microbial Safety OF Drinking Water,» IWA, 2003.

[6 T. Wohlsen , J. Bates , G. Vesey , w. A. Robinson y M. Katouli, «Evaluation of the
0] methods for enumerating coliform bacteria from water samples using precise reference
standards,» pp. 350-356, 2005.

[6 Forster Published by Thomas Telford Publishing, «Wastewater treatment and
1] technology,» *Thomas Telford Ltd*, pp. 194-202, 2003.

[6 Centro internacional para la investigacion del Fenomeno del Niño, *Aproximación para*
2] *el cálculo de riesgo*.

[6 O. M. d. I. S. (OMS), «Primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los
3] antibióticos,» 2014.

[6 L. F. Rincón Suárez, Curso basico de modelos lineales, Bogotá: Universidad Santo
4] Tomás , 2009.

[6 P. McCULLAGH, «Generalized linear models,» p. 285, 1983.
5]

[6 J. Picazo , «Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades,» 2005.
6]

[6 L. Ventola, «The Antibiotic Resistance Crisis,» *US National Library of Medicine* , vol.
7] 40, 2015.

[6 R. Acevedo Barrios, C. Severiche Sierra y J. Jaimes Morales, «Bacterias resistentes a
8] antibióticos en ecosistemas acuáticos,» *Producción + Limpia*, vol. 10, nº 2, 2015.

[6 Secretaría Distrital de Salud de Bogotá,, «Uso prudente de antibióticos en instituciones
9] prestadoras de servicios de salud,» Linotipia Bolívar y Cía. S. en C., Bogota, 2008.

[7 D. Richards , R. Heel , R. Brogden y T. Speight , «Ceftriaxone. A review of its
0] antibacterial activity, pharmacological properties and therapeutic use,» *US National
Library of Medicine National Institutes of Health*, vol. 6, pp. 469-527., 1984.

[7 CINFASALUD, «Uso responsable de antibióticos,» 2015.
1]

[7 M. Gil, A. Soto, J. Usma y O. Gutiérrez, «Contaminantes emergentes en agua, efectos
2] y posibles tratamientos,» *Producción + Limpia*, vol. 7, nº 2, pp. 52-73, Diciembre 2012.

[7 Organización Mundial de la Salud, OMS., «Discurso de la Directora General de la
3] OMS ante las Naciones Unidas sobre la resistencia a los antimicrobianos,» New York,
2015.

[7 Secretaria Distrital de Salud, «Manual de Actualización en Resistencia Bacteriana y
4] Normas CLSI M100-s20,» Bogotá D.C, 2010.

[7 D. Barceló y M. López, «Contaminación y calidad química del agua: el problema de los
5] contaminantes emergentes,» Barcelona, 2007.



PROTOCOLO DE LABORATORIO

Anexo 1: Procedimiento para la preparación de medios de cultivo.

2017

OBJETIVOS

- Preparar los medios de cultivos necesarios para llevar acabo el experimento en su totalidad.

MATERIALES

Materiales adquiridos

- Muestra de agua
- Aluminio
- Alcohol
- Baja lenguas
- Papel vinipel
- Antibiótico (Ceftriaxona, Amikacina, Oxacilina)

Materiales proporcionados

- Agua destilada
- Medio de cultivo: PCA, MacConkey y MSA
- Probeta
- Erlenmeyer
- Cajas Petri esterilizadas

Equipos proporcionados

- Estufa
- Autoclave
- Incubadora
- Balanza analítica

PROCEDIMIENTO

1. Determinar la cantidad de agua destilada según el número de cajas Petri que se van a utilizar, cada caja debe contener 20 ml.
2. Definir la cantidad de medio necesario por cada litro de agua según especificaciones de fábrica.
3. Realizar una regla de tres simple con respecto a la cantidad de agua destilada requerida y la cantidad medio de cultivo necesario por cada litro de agua.
4. Medir la cantidad de agua en una probeta.
5. Pesar en una balanza analítica la cantidad de medio que se determinó a partir de la regla de tres.
6. En un matraz de Erlenmeyer introducir el agua y el medio.
7. Agitar fuertemente el matraz de Erlenmeyer, sellando la parte superior con aluminio.
8. Calentar la mezcla hasta lograr cristalización evitando la ebullición, para esto la mezcla debe ser retirada de la parrilla y agitada sobre una superficie no tan fría.
9. Después se debe esterilizar el medio, para esto se deja en la autoclave durante 15 minutos a 121°C.
10. Dejar enfriar la mezcla, hasta que este a una temperatura adecuada para poder servir, si el medio necesita antibiótico este se debe añadir a una temperatura promedio de 60°C.
11. Limpiar el mesón con alcohol y prender el mechero.
12. Verter el medio en la caja Petri debajo de la flama generada por el mechero hasta tener una lámina aproximadamente de 3,5 mm que corresponden a los 20 ml de medio.
13. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
14. Si el medio no es utilizado inmediatamente se debe envolver en papel vinipel y utilizar en un periodo no mayor a 7 días.
15. Después de realizar la siembra, se deja en incubación de 24 a 48 horas a una temperatura de 35 a 37°C según se requiera.

PRECAUCIONES GENERALES

- Siempre usar bata

- Siempre usar guantes
- Siempre usar tapa bocas
- Siempre limpiar el sitio de estudio antes y después de trabajar
- Después de terminar de usar las cajas Petri, siempre lavarlas y dejarlas esterilizadas.
- Antes de usar cada equipo leer el manual de uso y de ser necesario pedir asesoramiento de la persona encargada.
- Después de usar cada equipo dejarlo limpio.

Anexo 2 : Procedimiento para realización de siembras sucesivas por agotamiento y tinción de Gram



PROTOCOLO DE LABORATORIO

2017

OBJETIVO

Realizar las siembras sucesivas por agotamiento necesarias para el experimento.

MATERIALES

Materiales adquiridos

- Bacteria ya sembrada con anterioridad.
- Marcadores indelebles

Materiales proporcionados

- Cajas Petri esterilizadas
- Medio de cultivo (PCA, MSAC MacConkey)
- Asas de cabeza redonda
- Laminas
- Colorantes (Cristal Violeta, Lugol, Alcohol acetona y Fucsina)
- Agua destilada

Equipos proporcionados

- Mechero
- Incubadora

PROCEDIMIENTO

SIEMBRAS SUCESIVAS POR AGOTAMIENTO

1. Escoger la colonia más aislada y retirar con el asa anteriormente flameada.
2. De ser necesario dividir la placa de agar en cuatro cuadrantes para mayor facilidad.
3. Suspender la bacteria en un extremo de la placa de agar (el medio debe estar libre de antibiótico), haciendo líneas de un extremo a otro (primer cuadrante).
4. Incinerar el asa y dejar enfriar durante tres minutos en un extremo del interior de la caja Petri y realizar líneas desde el primer cuadrante y extender hasta el extremo del cuadrante dos.
5. Incinerar el asa enfriar en el extremo durante tres minutos, realizar líneas desde el cuadrante dos y extenderlas hasta el extremo del cuadrante tres.
6. Incinerar el asa enfriar en el extremo durante tres minutos, realizar líneas desde el cuadrante tres y extenderlas hasta el extremo del cuadrante cuatro.
7. Incinerar el asa durante 2 minutos para eliminar cualquier residuo de la bacteria.
8. Después de haber realizado la siembra por agotamiento se deja en incubación durante 24

horas a una temperatura de 35 a 37°C. Este procedimiento se debe realizar una y otra vez hasta cuando en la tinción de Gram se observe la colonia totalmente pura.

TINCIÓN DE GRAM

1. En una lámina poner una gota de agua destilada.
2. Escoger la colonia más aislada con un asa de cabeza redonda y frotar en la gota de agua destilada
3. Incinerar el asa
4. Dejar secar la gota de agua de ser necesario ayudarse frotando con el dedo opuesto de donde está la gota en la lámina.
5. Después sellar la lámina, pasando la lámina tres veces rápidamente por la llama.
6. Realizar la tinción así:
 - Dejar dos gotas de azul violeta durante 2 minutos.
 - Lavar con agua destilada
 - Dejar dos gotas de Lugol durante 2 minutos.
 - Lavar con agua destilada
 - Dejar dos gotas de Alcohol Acetona durante 30 segundos.
 - Lavar con agua destilada

- Dejar dos gotas de Fucsina durante 15 segundos.
 - Lavar con agua destilada
7. Dejar secar y ponerle una gota de aceite de inmersión.
 8. Observar en el microscopio en el lente de 100x enfocándolo según el manual o las indicaciones de la persona en cagada.

PRECAUCIONES GENERALES

- Siempre usar bata.
- Siempre usar guantes.
- Siempre usar tapa bocas.
- Siempre limpiar el sitio de trabajo antes y después de trabajar.
- Después de terminar de usar las cajas Petri y láminas, siempre lavarlas y dejarlas esterilizadas.
- Antes de usar cada equipo leer el manual de uso y de ser necesario pedir asesoramiento de la persona encargada.
- Después de usar cada equipo dejarlo limpio



PROTOCOLO DE LABORATORIO

Anexo 3: procedimiento para preparación de solución salina, turbidez 0,5 de MacFarland y suspensión del inóculo.

2017

OBJETIVO

Realizar las suspensiones necesarias para realizar en trabajo en su totalidad.

MATERIALES

Materiales adquiridos

- Cultivo de la bacteria totalmente pura
- Baja lengua
- Aluminio

Materiales Proporcionados

- 2,45 gr de Cloruro de Bario
- 24,8 ml de ácido
- 3 tubos de ensayo
- Agua destilada
- Sal
- probeta
- Asas
- Erlenmeyer

EQUIPOS

- Autoclave

PREPARACION**SOLUCION SALINA**

1. Realizar una regla de tres a partir de la cantidad d agua que se requiera, teniendo en cuenta dos cosas; la primera es que por cada 100 ml de agua se necesita 0,85 gr de sal y la segunda es que cada tubo de ensayo requiere 9 ml.
2. Medir cantidad de agua destilada con una probeta e introducirla en un Erlenmeyer.
3. Con un baja lengua tomar la cantidad de sal que se requiere, esta se debe ser medida en una balanza analítica.
4. Después la cantidad de sal se deposita en un Erlenmeyer.
5. Agitar fuertemente hasta lograr una aparente homogeneidad.
6. Luego introducir 9 ml en cada tubo de ensayo y esterilizar en la autoclave.

TURBIDEZ DE MACFARLAND

- En un tubo de ensayo se mezclan 0.05 ml de BaCl_2 1% y 9.95 ml de H_2SO_4 1% y posteriormente se tapa.

En un tubo de ensayo agregar 9 ml de agua destilada
Agregar aproximadamente 85 ml de
SUSPENSIÓN DEL INNOCULO

1. con el asa flameada se retiran las colonias aisladas (3-5 colonias) de la bacteria
2. suspender la bacteria en 9ml de solución salina al 0,85%
3. agitar hasta crear una suspensión uniforme
4. repetir el mismo procedimiento hasta que se pueda evidenciar suficiente turbidez

PRECAUCIONES GENERALES

- Siempre usar bata.
- Siempre usar guantes.
- Siempre usar tapa bocas.
- Siempre limpiar el sitio de trabajo antes y después de trabajar.

- Después de terminar de usar los tubos de ensayo siempre lavarlos y dejarlos esterilizados.
- Antes de usar cada equipo leer el manual de uso y de ser necesario pedir asesoramiento de la persona encargada.
- Después de usar cada equipo dejarlo limpio.
- Leer la hoja de seguridad de cada reactivo



PROTOCOLO DE LABORATORIO

Anexo 4: Procedimiento para la identificación de las bacterias

2017

OBJETIVO

Realizar la identificación de todas las bacterias aisladas.

MATERIALES

Materiales adquiridos

- Suspensión del inóculo para cada una de las bacterias a identificar.

Materiales Proporcionados

- API
- Aceite mineral
- Agua destilada
- Agua oxigenada

EQUIPOS

- Micro pipeta
- Puntas
- Incubadora
- Mechero

PREPARACION

1. Se utiliza una suspensión bacteriana para rehidratar cada uno de los microtubos contenidos en la tira del API.
2. Se adiciona aceite mineral, agua destilada o agua oxigenada según las condiciones de incubación que son especificadas en los instructivos para cada microtubo según el tipo de API.
3. Dejar en la incubadora por un periodo de 24 h.
4. La presencia de enzimas y/o de productos metabólicos generados durante el periodo de incubación reaccionan con los sustratos contenidos en los microtubos y desarrollan en los mismos una coloración que puede aparecer en forma espontánea o con el agregado de algún reactivo para su revelado.
5. La interpretación de los resultados se basa en la observación de las coloraciones desarrolladas, ésta se lleva a cabo mediante la comparación del color obtenido en cada microtubo con el que muestra la carta de colores. De acuerdo a esa interpretación se puede establecer un resultado positivo (+) o negativo (-).
6. Después del periodo de incubación y comparar, con la carta de colores, los resultados obtenidos en cada microtubo se colocan en la hoja de resultados que suministra el fabricante.
7. Los datos así obtenidos pueden transformarse en un código de 7 dígitos denominado “perfil numérico” que resulta de la suma de los valores correspondientes a las pruebas positivas asignados previamente en la planilla.
8. El código obtenido se corresponderá a un determinado género o especie de acuerdo a la información contenida en las bases de datos suministradas por el fabricante y que pueden encontrarse disponibles en forma impresa y/o electrónica.

PRECAUCIONES GENERALES

- Siempre usar bata.
- Siempre usar guantes.
- Siempre usar tapa bocas.
- Siempre limpiar el sitio de trabajo antes y después de trabajar.
- Después de terminar de usar los tubos de ensayo siempre lavarlos y dejarlos esterilizados.
- Antes de usar cada equipo leer el manual de uso y de ser necesario pedir asesoramiento de la persona encargada.
- Después de usar cada equipo dejarlo limpio.
- Leer la hoja de seguridad de cada reactivo

