

Caso Clínico

Bacteriología

Kasmera 47(1):9-13, Enero-Junio, 2019
ISSN 00755222 E-ISSN 2477-9628



Citrobacter freundii multiresistente como agente etiológico de infección de vías urinarias

Multiresistant Citrobacter freundii as an etiological agent of urinary tract infection

Ullauri-González, Carmen  ; Freire-Cuesta, Sandra²

¹Cátedra de Microbiología, Carrera de Laboratorio Clínico, Universidad Nacional de Loja, Ecuador. ²Cátedra de Patología, Carrera de Laboratorio Clínico, Universidad Nacional de Loja, Ecuador.

Resumen

Citrobacter freundii, en ocasiones puede actuar como patógeno oportunista, se presenta un caso de este microorganismo aislado como agente etiológico de infección del tracto urinario, en un paciente con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. El aislado fue multiresistente, mostrando resistencia a gentamicina, amikacina, trimetoprim sulfametoxazole, ciprofloxacino, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem y doripenem y, susceptibilidad a tigeciclina y colistina, el estudio molecular demostró la presencia del gen *blaKPC*.

Palabras clave: resistencia microbiana a antibióticos, bacteriuria, *Citrobacter freundii*

Abstract

Citrobacter freundii, sometimes it can act as opportunistic pathogen, a case of this isolated microorganism is presented as an etiological agent of urinary tract infection, in a patient with chronic obstructive pulmonary disease. The isolate was multiresistant to gentamicin, amikacin, trimetoprim sulfamethoxazole, ciprofloxacin, ceftriaxone, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem and doripenem and it was susceptible to tigecycline and colistin, the molecular analysis showed the presence of the *blaKPC* gene.

Keywords: drug resistance microbial, bacteriuria, *Citrobacter freundii*

Recibido: 24/09/2018

Aceptado: 11/01/2019

Publicación en línea: 20/01/2019

Como Citar: Ullauri-González C, Freire-Cuesta S. *Citrobacter freundii* multiresistente como agente etiológico de infección de vías urinarias. *Kasmera*. 2019;47(1):9-13

Autor de Correspondencia: Carmen Ullauri-González. E-mail: carmen.ullauri@unl.edu.ec

Una lista completa con la información detallada de los autores está disponible al final del artículo.

©2019. Los Autores. **Kasmera**. Publicación del Departamento de Enfermedades Infecciosas y Tropicales de la Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo-Venezuela. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons atribución no comercial (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) que permite el uso no comercial, distribución y reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre y cuando la obra original sea debidamente citada.



Introducción

Citrobacter freundii es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, de la tribu *Citrobacter*. A diferencia de otras especies de Citrobacterias productoras de H₂S y de las salmonelas, este microorganismo no es capaz de descarboxilar lisina, hidrolizar ONPG (orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido) y crecer en caldo de cianuro de potasio (KCN). *C. freundii*, es causante de infecciones intestinales y extraintestinales como: infecciones del tracto urinario (ITU) y septicemia. Junto con especies de *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Serratia*, constituyen los patógenos oportunistas más frecuentemente aislados (1-3).

La resistencia antimicrobiana es un problema global que ha hecho que las terapéuticas actuales no solucionen las infecciones bacterianas, dentro de los mecanismos de resistencia actuales más importantes y de gran impacto está la resistencia a los carbapenémicos en *Enterobacteriaceae* (CRE), suscitado como en la mayoría de los casos, como consecuencia del uso indiscriminado de antibióticos en medicina humana y veterinaria; éstas, son enzimas capaces de hidrolizar a los carbapenémicos y otros β-lactámicos, se destacan: Clase A de Ambler: KPC-2 a 18; Clase B: metalo-β-lactamasas (VIM 1 a 41 e IMP 1 a 48, y las NDM-1 a NDM-12 y Clase C: (detectadas en *Acinetobacter* spp.) OXA-23, OXA-25 a 27, OXA-40, OXA-51, OXA-55, OXA-58 y OXA-143 (4).

En China a través del estudio Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* infections: Report from China CRE Network, realizado de enero a diciembre de 2015, se reportaron 664 casos de CRE, se demostró que el 73,9 % de los casos fueron causados por *K. pneumoniae*, seguido de *E. coli* (16,6%) y *E. cloacae* (7,1 %) (5).

C. freundii, conocido como agente etiológico de una gran variedad de patologías como ITU, heridas, infecciones gastrointestinales, meningitis y sepsis; especialmente en pacientes inmunocomprometidos y hospitalizados, es también un microorganismo que puede adquirir resistencia a varias clases de antibióticos, como se revela en el estudio hecho por Leski y col (6).

La resistencia desarrollada por *C. freundii* es reportada desde hace algunos años, en el 2003 Naveen Gupta y col (7) en India, realizaron un estudio de 176 casos de bacteriemia por *Citrobacter*, el 79,1% de los casos de bacteriemia fueron producidos por *C. koseri* y el 20,9% por *C. freundii*. La puerta de entrada identificada más frecuentemente fue la vía respiratoria con un 20,9%; mientras que los tractos gastrointestinal y urinario lo fueron con un 15,3% respectivamente. En cuanto a la resistencia a los antimicrobianos, se determinó que los aislados de *C. freundii*, fueron más resistentes que los de *C. koseri*; el 79,1 % de estos aislados fueron multiresistentes.

Se han reportado casos de cepas de *C. freundii* con este tipo de resistencia, en China (8) se aislaron cepas resistentes de muestras de aguas residuales del Wets China Hospital en enero de 2015, se reportó una cepa portadora del gen *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}*, así mismo, se encontró *C. freundii* altamente resistente aislado a partir de una muestra de orina en el Mercy Hospital Research Laboratory, en Sierra Leona (4). En estudios realizados en España para determinar la epidemiología molecular de Enterobacterias productoras de carbapenemasas se determinó que, de 20.093 aislados, 47 mostraron baja sensibilidad a los carbapenémicos y 9 fueron productores de carbapenemasas, 4 de ellos fueron identificados como *C. freundii*; según su origen, 2 fueron aislados de pacientes ambulatorios y 7 de pacientes hospitalizados; el 44,44 % se aisló en urocultivos (5-7).

En el caso clínico estudiado el paciente tenía antecedentes patológicos personales importantes para el desarrollo de infecciones sobreañadidas, presentaba enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), este es un estado en el cual existe limitación del flujo de aire que no es del todo reversible, cuya prevalencia en el 2016 fue de 251 millones de casos según la Organización Mundial de la Salud (8), la misma organización indica, "en 2015 murieron por esta causa cerca de 3,17 millones de personas en todo el mundo, representando el 5 % de las todas las muertes de ese año". En Estados Unidos se ha reportado como la tercera causa de muerte afectando a más de 10 millones de personas (8-12).

Las infecciones respiratorias son causa importante de exacerbaciones de EPOC cuadro por el cual el paciente ingresa a la emergencia de Hospital de referencia a nivel

local. El paciente además presenta antecedentes de hospitalización previa, factor que predispone a infecciones de tipo intrahospitalario. El diagnóstico de base, exacerbado por un episodio de neumonía nosocomial que se desarrolla posterior al presente ingreso, sumando a ITU diagnosticada por urocultivo positivo a las 48 horas posteriores al ingreso; hace que se cumplan los criterios que se han mencionado como predisponentes de infección intrahospitalaria causada por un agente multiresistente como *C. freundii* productor de carbapenemasas.

Historia Clínica

Paciente de sexo masculino de 89 años de edad, con residencia en zona urbana de la ciudad de Loja, estado civil soltero y de ocupación agricultor; antecedentes clínicos de importancia: hipertensión arterial, hipertrofia prostática benigna y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, (EPOC), es importante destacar que 4 días antes al presente ingreso el paciente estuvo hospitalizado con diagnóstico de pancreatitis aguda y EPOC, es ingresado a Hospital Provincial "Isidro Ayora" de la misma ciudad; por cuadro clínico de alza térmica no cuantificada de 12 horas de evolución y astenia, el diagnóstico de ingreso: Neumonía nosocomial e Injuria Pulmonar Aguda

El examen físico de ingreso revela. TA: 100-63 mmHg, FC: 78 lpm; FR: 26 rpm, SatO₂: 86% con FiO₂ del 28%, Glasgow: 14/15. Paciente cianótico. Zona peribucal cianótica. Tórax: corazón rítmico. Pulmones: murmullo vesicular disminuido en ambos campos pulmonares y abolido en base pulmonar izquierda. A la auscultación: ruidos crepitantes y sibilancias en ambos campos pulmonares. Se solicitan exámenes de laboratorio: Biometría hemática, glucosa, urea, creatinina, proteína C reactiva, elemental y microscópico de orina y se toman muestras para realizar hemocultivo, urocultivo y baciloscopia.

Al momento del ingreso se inicia tratamiento farmacológico con: piperacilina+tazobactam 3,5 gr. cada 6 horas por vía endovenosa, azitromicina 1 gr. por vía oral cada 24 horas, nebulizaciones con salbutamol cada 8 horas, hidrocortisona 100 mg. cada 8 horas por vía intravenosa y antipiréticos. Con los resultados de los exámenes, el diagnóstico de ingreso a hospitalización es de EPOC reagudizada más infección del tracto urinario (ITU).

Al segundo día de hospitalización se cambia el tratamiento antibiótico por meropenem 1 gr. intravenoso cada 8 horas y se agrega acetilcisteína 300 mgr. intravenoso cada 8 horas. Durante la hospitalización el paciente presenta complicaciones pulmonares: Derrame pleural masivo derecho, se realiza toracocentesis en dos ocasiones la última guiada con ecografía obteniéndose 1000 mL de líquido serohemático que, al examen citológico y bioquímico es compatible con exudado, el examen bacteriológico resulta negativo. Los exámenes de control posterior a la terapia instaurada demostraron mejoría; biometría hemática y química sanguínea dentro

de parámetros normales. Luego de 25 días es dado de alta con importante mejoría clínica.

Resultados de Laboratorio

Los resultados de laboratorio solicitados al ingreso del paciente en emergencia fueron biometría hemática: Leucocitos: $11,3 \times 10^6$ cel/mm³, fórmula diferencial (valores relativos): Neutrófilos. 67,6%, Linfocitos: 22,7%. Glucosa: 117 mg/dL; urea: 66,7 mg/dL, Creatinina: 1,7 mg/dL; PCR: 2,8 mg/dL; Examen elemental y microscópico de orina: Leucocitos: campo lleno; Eritrocitos: 4-6/c; Bacterias: +++, hemocultivo y baciloscopia negativa; el urocultivo resultó positivo y la identificación y pruebas de susceptibilidad del microorganismo aislado se realizaron mediante el equipo Vitek 2 de Biomerieux® identificándolo como *Citrobacter freundii*, resistente a cefalosporinas y carbapenémicos con concentraciones mínimas inhibitorias para ceftazidima ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$; ceftriaxona y cefepime ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$; imipenem y meropenem ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$; doripenem 4 $\mu\text{g/mL}$; sensible a amikacina y gentamicina con CIM 8 y 4 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; intermedio para ciprofloxacino CIM de 2 $\mu\text{g/mL}$ y sensible a tigeciclina y colistina con CIM de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; en un segundo urocultivo realizado dos días después de hospitalización se notó evolución a resistencia para gentamicina, amikacina y ciprofloxacino. Se realizó la prueba fenotípica de búsqueda de carbapenemasas según los criterios de la Tabla N° 3C del CLSI M100-S28 (12), obteniéndose inactivación del carbapenémico positiva; se realizó la prueba de sinergia de discos y se obtuvo reacción positiva entre ácido fenilborónico e imipenem (Figura 1); se realizó la prueba con discos combinados obteniéndose una diferencia de 7 mm entre el disco de meropenem y meropenem/borónico, resultados compatibles para la producción de una serinbetalactamasa KPC, se utilizaron como controles de calidad internos positivo a *K. pneumoniae* BAA-1705 y negativo a *K. pneumoniae* BAA-1706. La cepa fue confirmada molecularmente por reacción en cadena de polimerasa convencional en los laboratorios del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública del Ecuador identificándose *bla*_{KPC}.

Discusión

La resistencia a los antimicrobianos es actualmente un problema de salud pública de preocupación mundial, la producción de carbapenemasas es un mecanismo diseminado en *Enterobacteriaceae*, que les confiere resistencia a todos los betalactámicos incluyendo los carbapenémicos, aspecto que representa un reto para los clínicos por las pocas opciones terapéuticas para el tratamiento, tal como se observa en la cepa reportada en este caso, cuyas opciones de tratamiento serían tigeciclina y colistina; por lo que la comprensión de este mecanismo de resistencia y su comportamiento epidemiológico en las infecciones ayudarán al control de su diseminación (6,14-15).

Citrobacter freundii es una bacteria Gram negativa que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, está

presente en el ambiente y en la microbiota del intestino del ser humano; es frecuente patógeno de infecciones asociadas a la atención de salud del tracto respiratorio, tracto urinario y sangre, la resistencia a múltiples familias de antibióticos se reporta cuando actúa como agente oportunista en pacientes inmunocomprometidos, en el presente caso se aisló *C. freundii bla*_{KPC} de un paciente con hospitalizaciones previas y comorbilidades lo que sugiere su papel como oportunista, esto puede explicarse debido a la posible colonización que ya se reporta en otros estudios como un problema emergente por la presencia de *Citrobacter freundii bla*_{KPC-3} en pacientes hospitalizados identificados al realizar el hisopado rectal para detectar CRE, concluyendo que es conveniente ejecutar programas de vigilancia activos que permitan tanto la detección de CRE como para el control de su diseminación y propagación (16-18).

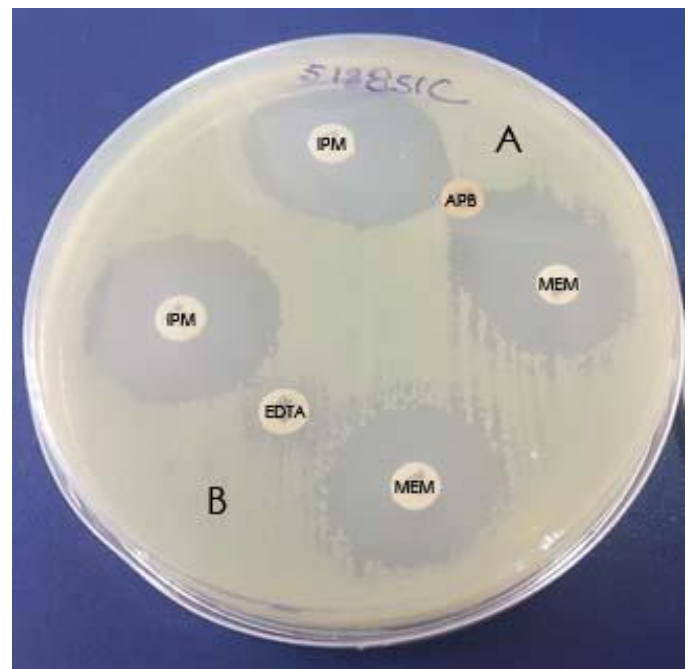


Figura 1. Prueba de Sinergia con inhibidores de carbapenemasas. (A) Prueba de sinergia positiva entre ácido fenilborónico (APB) y los dos carbapenémicos probados, meropenem (MEM) e imipenem (IPM). (B) Prueba de sinergia negativa entre EDTA y los dos carbapenémicos probados: meropenem (MEM) e imipenem (IPM). Se presume presencia de carbapenemasa KPC por sinergia positiva entre ácido fenilborónico con imipenem y meropenem.

C. freundii resistente a carbapenémicos se ha reportado como agente etiológico de infección de vías urinarias en varios estudios considerándose endémico en China, donde se encuentra en la comunidad y, en otros estudios se asocian al cuidado de la salud en infecciones de tracto urinario; este microorganismo produce la cefalosporinasa AmpC a nivel cromosomal gracias al gen *bla*_{CMY-79} y, un plásmido grande estructuralmente idéntico al reportado en *Klebsiella pneumoniae* que contiene los genes *aac*(3)-III, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, lo que le permite ser calificado como un reservorio de determinantes de resistencia a los antimicrobianos explicando entonces la multiresistencia a

aminoglucósidos, fluoroquinolonas, sulfamidas y betalactámicos tal como ocurre con la cepa productora de KPC de este caso; de forma que si bien es cierto *E. coli* es el agente etiológico más frecuente en infecciones del tracto urinario no se debe descartar la presencia de bacterias oportunistas multirresistentes [6,14,19-22].

Citrobacter freundii es una bacteria capaz de desarrollar multirresistencia gracias a la presencia de genes que le permiten producir enzimas como la KPC, en este caso su tratamiento se complica porque las opciones terapéuticas se restringen a tigeciclina y colistina, actúa como oportunista y puede colonizar a personas en comunidad por lo que su diseminación debería ser controlada.

Agradecimientos

Al Hospital Isidro Ayora, por permitir realizar la investigación y al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública del Ecuador en particular al Centro de referencia Nacional de Resistencia a los antimicrobianos, por su colaboración en el control de calidad y confirmación de cepas aisladas

Conflicto de Intereses


Los autores declaran no presentar conflictos de intereses.

Referencias Bibliográficas

1. Procop G, Church D, Hall G, Janda W, Koneman E, Schreckenberger P, et al. Koneman Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas. 7 Ed. Mendoza C, Karen E, editores. Barcelona: Kluwer, Wolters; 2018. p 267-269.
2. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T, Jawetz M, Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica. 25 Ed. Mexico DF: McGrawHill; 2010. p 213-216.
3. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico. 12 Ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2009. p 328-330.
4. Vignoli R. Manual de Mecanismos de Resistencia a Antibióticos Macrólidos y Lincosaminas. 2016. p. 1-14. Disponible en: <https://docplayer.es/42315500-Manual-de-mecanismos-de-resistencia-a-antibioticos.html>
5. Zhang Y, Wang Q, Yin Y, Chen H, Jin L, Gu B, et al. Epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections: Report from the China CRE Network. Antimicrob Agents Chemother. 2018;62(2):e01882-17. Disponible en: <https://aac.asm.org/content/62/2/e01882-17>
6. Leski TA, Taitt CR, Bangura U, Ansumana R, Stenger DA, Wang Z, et al. Finished Genome Sequence of the Highly Multidrug-Resistant Human Urine Isolate *Citrobacter freundii* Strain SL151. Genome Announc. 2016;4(6):e01225-16. Disponible en: <http://genomea.asm.org/lookup/doi/10.1128/genomeA.01225-16>
7. Gupta N, Yadav A, Choudhary U, Arora DR. *Citrobacter* bacteremia in a tertiary care hospital. Scand J Infect Dis. 2003;35(10):765-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/00365540310016376>
8. Organización Mundial de la Salud. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). WHO. World Health Organization; 2013 [citado 17 de diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.who.int/respiratory/copd/es/>
9. Wu W, Espedido B, Feng Y, Zong Z. *Citrobacter freundii* carrying blaKPC-2 and blaNDM-1: Characterization by whole genome sequencing. Sci Rep. 2016;6:30670. Disponible en: https://doi.org/10.1038/srep_30670
10. Bueno Sancho J, Seral García CP, Castillo García FJ. Epidemiología molecular de enterobacterias productoras de carbapenemasas. Trabajo fin de master iniciación a la investigación En medicina. Universidad de Zaragoza; 2015. Disponible en: <https://zaguan.unizar.es/record/47451/files/TAZ-TFM-2015-161.pdf>
11. Reilly J, Silverman E, Shapiro S. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica. En: Longo D, Fauci A, Kasper D, Stephen H, Lameson JL, Loscalzo J, editores. Harrison Principios de Medicina Interna. 18 Ed. Volumen 2. Mexico D.F. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.; 2012. p 2151-2.
12. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI. Wayne PA. 2018 p 296.
13. Kalpana G, Trautner B. Infecciones de vías urinarias, pielonefritis y prostatitis. En: Longo D, Fauci A, Kasper D, Stephen H, Lameson JL, Loscalzo J, editores. Harrison Principios de Medicina Interna. 18 Ed. Infecciones de vías urinarias, pielonefritis y prostatitis: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.; 2012. p 2387-8.
14. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades respiratorias crónicas. WHO. 2016 [citado 14 de agosto de 2018]. Disponible en: <https://www.who.int/respiratory/es/>
15. Erkens-Hulshof S, Virginia-Cova L, van Dijk W, Severin J, Woodford N, Melchers W, et al. The occurrence of *Enterobacteriaceae* producing KPC carbapenemases in a general hospital in Curacao. Antimicrob Resist Infect Control. 2014;3(1):24. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/2047-2994-3-24>
16. Lorenzoni VV, Silva D da C, Rampelotto RF, Brites PC, Villa B, Hörner R. Evaluation of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary-level reference hospital in Rio Grande do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2017;50(5):685-8. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822017000500685&lng=en&tlng=en
17. Yang L, Li P, Liang B, Hu X, Li J, Xie J, et al. Multidrug-resistant *Citrobacter freundii* ST139 co-producing NDM-1 and CMY-152 from China. Sci Rep. 2018;8(1):10653. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28879-9>
18. Venditti C, Fortini D, Villa L, Vulcano A, D'Arezzo S, Capone A, et al. Circulation of blaKPC-3-carrying *IncX3* plasmids among *Citrobacter freundii* isolates in an Italian Hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(8):e00505-17. Disponible en: <https://aac.asm.org/content/61/8/e00505-17>
19. Gaibani P, Ambretti S, Farruggia P, Bua G, Berlinger A, Tamburini MV, et al. Outbreak Of *Citrobacter freundii* carrying *Vim-1* in an Italian hospital, identified during the carbapenemases screening actions, 2012. Int J Infect Dis. 2013;17(9):e714-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.02.007>
20. Gross C, Allen-Bridson K, Anttila A, Brooks JE, Hebden JN, Leaprot D, et al. Health Care-Associated Infections Studies Project Case #1: A 2015 American Journal of Infection Control

- and National Healthcare Safety Network data quality collaboration. Am J Infect Control. 2015;43(9):987-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26209338>
21. Mahmoud A. M, Tarig M.S. A, Osama M. S, Mariam M. A. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of bacterial strains isolated from patients with urinary tract infection in Messalata Central Hospital, Libya. Asian Pac J Trop Med. 2016;9(8):771-6. Disponible en: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L613140529%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.06.011%0Ahttp://iacs.c17.net/openurl?sid=EMBASE&issn=19957645&id=doi:10.1016%2Fj.apjtm.2016.06.011&qtitle=Prevalence+and+antimicro>
22. Hazen TH, Mettus RT, McElheny CL, Bowler SL, Doi Y, Rasko DA. Draft Genome Sequences of blaKPC-Containing *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, and *Citrobacter koseri* Strains. Microbiol Resour Announc. 2018;6(8). Disponible en: <https://mra.asm.org/content/6/8/e00035-18>

Autores:

Correspondencia: Ullauri-González, Carmen  <https://orcid.org/0000-0002-8555-7996>. Cátedra de Microbiología, Carrera de Laboratorio Clínico. Universidad Nacional de Loja. Dirección postal: Av. Manuel Ignacio Monteros s/n. Código postal 110103. Loja-Ecuador. Teléfono 072571379 ext 124/0994792263. E-mail: carmen.ullauri@unl.edu.ec

Freire Cuesta, Sandra. Cátedra de Patología, Carrera de Laboratorio Clínico. Universidad Nacional de Loja. se-fc@hotmail.com

Contribución de los Autores:

UGC y **FCS** participaron en la concepción del estudio, recolección de las muestras, trabajo de laboratorio, análisis de los datos, escritura y revisión del manuscrito y lectura y aprobación final del manuscrito.