

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN PARA LA SALUD EN AMÉRICA LATINA
(CISeAL)**

**Caracterización molecular de genes de resistencia a β -lactámicos en
aislados clínicos de *Escherichia coli* provenientes de urocultivos y
pruebas de inhibición con péptidos de *Boana rosenbergi* y *Rana* sp.**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado
en Ciencias Biológicas**

VÍCTOR DANIEL DÍAZ ESCOBAR

Quito, 2017

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Sr. Víctor Daniel Díaz Escobar ha sido concluida en conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Iliana Alcocer Negrete

Directora de la Disertación

Quito, 17 de Julio de 2017

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Víctor Daniel Díaz Escobar, con CC. 1721298188, autor del trabajo de graduación titulado: “Caracterización molecular de genes de resistencia a β -lactámicos en aislados clínicos de *Escherichia coli* provenientes de urocultivos y pruebas de inhibición con péptidos de *Boana rosenbergi* y *Rana* sp.”, previa la obtención del grado académico de **LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través el sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito,

_f)

CC#

DEDICATORIA

“No tengo ningún talento especial.
Solo soy apasionadamente curioso”

Albert Einstein, 1952

AGRADECIMIENTOS

Ha terminado una gran experiencia, aprendí, conocí y viví junto con las personas más interesantes que pude encontrar. Fue un camino complicado que fue superado gracias a la ayuda de mis amigos, mi familia y mis profesores.

Agradezco con mucho cariño a mis amigos con los cuales he vivido tantos momentos: Santiago Arroyo, Christopher García, Henry Macías, Bianca Morejón, Diego Nieto, Andrés Núñez, Ana Belén Ribadeneira y Ricardo Zambrano. Agradezco especialmente a Francisco Quelal, que sin su apoyo y gran sentido del humor no habría podido sobrellevar estos dos años de duro trabajo en el laboratorio de Microbiología.

A mi madre y mi hermano, siempre tendrán un lugar especial e mi corazón, sin su apoyo, sus consejos y experiencias no habría podido completar este, mi sueño, de ser Biólogo.

Agradezco a mis compañeros de trabajo, especialmente a Fernanda Cadena, quién me ha ayudado mucho, y a todos en el CISEAL, que con sus diferentes puntos de vista he adquirido habilidades que me ayudaron a completar mi trabajo. La experiencia de trabajar en este centro ha sido muy enriquecedora.

Agradezco a mis profesores, quienes me han enseñado las habilidades necesarias para realizar mi proyecto y que en el camino se han convertido en mis amigos, Fernanda Yauri, Carolina Portero e Iliana Alcocer.

Finalmente agradezco a la PUCE por los fondos dados a través de los proyectos dirigidos por la Dra. Iliana Alcocer y Mtr. Mercedes Rodríguez-Riglos, “Potencial antimicrobiano de secreciones de piel de anuros y extracto de hongos endófitos ecuatorianos presentes en las colecciones Quito Católica sobre bacterias tipo y multirresistentes”. FONDOS PUCE, 2016 código de proyecto M13377.

TABLA DE CONTENIDOS

1. Resumen	1
2. Abstract	2
3. Introducción	3
4. Objetivos	12
4.1. Objetivo General	12
4.2. Objetivos Específicos	12
5. Materiales y Métodos	13
5.1. Población de Estudio	13
5.2. Identificación de Sensibilidad Antibiótica	14
5.3. Extracción de ADN	15
5.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa	15
5.5. Prueba de Sensibilidad a Péptidos de Anuros por Microdilución en Caldo.....	16
6. Resultados	19
6.1. Caracterización de Genes de Resistencia	19
6.2. Prueba de Sensibilidad a Péptidos de Anuros por Microdilución en Caldo.....	20
7. Discusión	22
7.1. Caracterización de Genes de Resistencia.....	22
7.2. Prueba de Sensibilidad a Péptidos de Anuros por Microdilución en Caldo.....	24
8. Conclusiones	26
9. Recomendaciones	27
10. Referencias Bibliográficas	28
11. Figuras	35
12. Tablas	40
13. Anexos	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Registro de presencia de β -lactamasas tipo CTX-M-1.....	33
Figura 2: Muestras positivas para β -lactamasas tipo CTX-M-1.....	35
Figura 3: Muestras positivas para β -lactamasas tipo SHV.....	36
Figura 4: Muestras positivas para β -lactamasas tipo TEM.....	36
Figura 5: Porcentaje de inhibición bacteriana por péptidos de <i>B. rosenbergi</i>	37
Figura 6: Promedio de porcentajes de inhibición bacteriana por péptidos de <i>B. rosenbergi</i>	37
Figura 7: Porcentaje de inhibición bacteria por péptidos de <i>Rana sp</i>	38
Figura 8: Promedio de porcentaje de inhibición bacteriana por péptidos de <i>Rana sp</i>	39

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Población de estudio identificada por MALDI-TOF.....	40
Tabla 2: Sensibilidad antibiótica por VITEK® 2.....	43
Tabla 3: Datos de antibiograma medidos desde las placas proporcionadas por el hospital.....	46
Tabla 4: Primers utilizados para PCR	49
Tabla 5: Perfil fenotípico de población de <i>E.coli</i> después de PCR.....	50
Tabla 6: Resultados se secuenciamiento primer CTX-M-1.....	51
Tabla 7: Resultados de secuenciamiento primer TEM.	52
Tabla 8: Perfil genotípico y fenotípico de la población usada en microdiluciones.....	53
Tabla 9: Concentración Mínima Inhibitoria de <i>B. rosenbergi</i>	53
Tabla 10: Concentración Mínima Inhibitoria de <i>Rana sp</i>	54
Tabla 11: Rangos y Medias Geométricas de <i>B. rosenbergi</i>	54
Tabla 12: Rangos y Medias Geométricas de <i>Rana sp</i>	55
Tabla 13: Número de cepas inhibidas y porcentajes acumulados.....	55
Tabla 14: Serie de Campo de los individuos de cada especie.....	56

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Estructura química de antibióticos β -lactámicos.....	57
Anexo 2: Acción de antibióticos β -lactámicos.....	57
Anexo 3: Resistencia a antibióticos β -lactámicos.....	58

1. RESUMEN

Escherichia coli productora de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) es un agente microbiano involucrado en la mayoría de infecciones del tracto urinario (85%), debido a las escasas alternativas terapéuticas disponibles y a su rápida adquisición de genes de resistencia a diversos antibióticos. El objetivo de este estudio fue caracterizar la presencia de alelos que confieren resistencia a antibióticos β -lactámicos en muestras clínicas de *Escherichia coli* provenientes de urocultivos y probar la eficacia de los péptidos de la piel de anuros de las especies *Boana rosenbergi* y *Rana* sp. sobre este patógeno. El estudio se realizó en 70 aislados de *E. coli* obtenidos de muestras de orina de pacientes de un hospital en Quito, identificados por matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry. El análisis de sensibilidad fue realizado en los Laboratorios Zurita & Zurita por VITEK® 2. Se extrajo ADN con el kit Wizard® Genomic DNA Purification para bacterias Gram-negativas. La amplificación de los genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM} se realizó con primers específicos. La presencia o ausencia de estos genes fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los productos de PCR con concentración de 10 ng/ μ l, se enviaron a MacroGen para su secuenciación. El análisis se realizó con el software Geneous versión 7.0. Finalmente, con 10 aislados de *E. coli* BLEE se realizó microdilución en caldo con las secreciones de *B. rosenbergi* y *Rana* sp. Como resultados se obtuvo que de los 70 aislados: 54/70 provienen de mujeres (77,1%) y 16/70 de hombres (22,9%), donde 46/70 (65,7%) se originaron de consulta externa y 39/70 (55,7%) tuvieron fenotipo BLEE positivo; 32/70 (45,7%) poseían el alelo CTX-M-15; 3/70 el gen *bla*_{SHV}; 19/70 el gen *bla*_{TEM}, estas sin fenotipo BLEE, resistentes a ampicilina y con los alelos TEM-1 (18/19) y TEM-214; En cuanto a los péptidos, no hubo inhibición bacteriana por las secreciones de *B. rosenbergi*. Para las secreciones de *Rana* sp. hubo inhibición bacteriana con concentración mínima inhibitoria (CMI) al 90 y 50% de las cepas de: CMI₉₀ de 500 μ g/ml y CMI₅₀ de 250 μ g/ml. Como conclusión se puede decir con seguridad que las secreciones de *Rana* sp. son un recurso disponible que puede ser explotado como alternativa para el tratamiento de *E. coli* resistente a β -lactámicos de amplio espectro.

Plabras clave: Urocultivos, *E. coli*, β -lactamasa, sensibilidad, péptidos

2. ABSTRACT

Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* (ESBL) is a microbial agent involved in most urinary tract infections (85%), due to the scarce available therapeutic alternatives and its rapid acquisition of resistance genes Antibiotics. The aim of this study was to characterize the presence of alleles conferring resistance to β -lactam antibiotics in clinical samples of *Escherichia coli* from urine cultures and to test the efficacy of anurans skin peptides of *Boana rosenbergi* and *Rana* sp. The study was performed in 70 *E. coli* isolates obtained from urine samples of patients from a hospital in Quito, identified by matrix assisted laser desorption / ionization - time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF), sensitivity analysis was performed In Zurita & Zurita Laboratories by VITEK® 2. DNA was extracted with the Wizard® Genomic DNA Purification kit for Gram-negative bacteria. Amplification of the bla_{CTX-M-1}, bla_{CTX-M-15}, bla_{SHV} and bla_{TEM} genes was performed with specific primers. The presence or absence of these genes was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. PCR products with a concentration of 10 ng/ μ l were sent to MacroGen for sequencing. The analysis was performed using Geneous software version 7.0. Finally, with 10 isolates of *E. coli* BLEE microdilution was carried out in broth with the secretions of *B. rosenbergi* and *Rana* sp. Of the 70 isolates, 54 came from women (77,1%) and 16 from men (22,9%). Of external consultation were 46/70 (65,7%); 39/70 (55,7%) had BLEE phenotype; 32/70 (45,7%) had the CTX-M-15 allele; 3 the bla_{SHV} gene; 19 the bla_{TEM} gene without BLEE phenotype, with TEM-1 (18) and TEM-214 alleles; There was no bacterial inhibition with *B. rosenbergi* peptides; with the peptides of *Rana* sp. bacterial inhibition was achieved with CMI₉₀ of 500 μ g/ml and CMI₅₀ of 250 μ g/ml. Secretions of *Rana* sp. can be exploited to find new alternatives for extended spectrum *E. coli* β -lactamase (ESBL) therapy.

Key words: Uroculture, *E. coli*, β -lactamase, sensitivity, peptides.

3. INTRODUCCIÓN

La bacteria *Escherichia coli* es un cocobacilo Gram negativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Es productora de gas a partir de la fermentación de glucosa y lactosa, produce indol a partir de triptófano, no utiliza el citrato como fuente de carbono y no tiene producción de acetoina (OMS, 2017). Su genoma consiste en 5,009,900pb cromosómicas y seis plásmidos (Stoesser et al., 2016).

Es importante saber que es una bacteria mesófila debido a que su desarrollo se da en la temperatura corporal de animales homeotermos (35-43 °C). Es habitual en el intestino humano y de otros animales (OMS, 2017). La mayoría de las cepas son inofensivas, pero algunas pueden causar infecciones intestinales y extra intestinales como las del tracto urinario (Bajaj et al., 2016; OMS, 2017; Zhang, Zhou, Guo y Chang, 2015).

En particular para este estudio, se sabe que al menos el 85% de las infecciones del tracto urinario (ITU) son causadas por *E. coli*, de origen comunitario. Además esta bacteria es responsable del 50% de las infecciones que desencadenan en shock uroséptico en pacientes hospitalizados (Geyer et al., 2016; Tschudin-sutter et al., 2017). La infección de origen comunitario es aquella que se propaga dentro de una población agrupada en un espacio restringido y confinado. Por otro lado, la infección de origen hospitalario es aquella que se adquiere dentro de un hospital u otro servicio de salud y que no estaba presente en el paciente al momento de ser ingresado (OMS, 2017).

Para el tratamiento de ITU causadas por *E. coli* se utilizan antibióticos β -lactámicos, estos incluyen a las penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenemes y monobactámicos (Marinelli y Genilloud, 2014) (Anexo 1). Al inicio el tratamiento se da de forma empírica, hasta conocer los resultados del urocultivo y la sensibilidad antimicrobiana (Collantes et al., 2012; Daza, 1998). Para un tratamiento efectivo es importante conocer previamente la resistencia antibiótica de una población, ya que la sensibilidad antimicrobiana varía de una región a otra (Daza, 1998).

Los antibióticos β -lactámicos son amidas cíclicas que constan de tres átomos de carbono y un átomo de nitrógeno. El átomo de nitrógeno está unido al carbono β con respecto al carbonilo (C = O) lo que le da su nombre (Livermore, 1995).

Estos antibióticos β -lactámicos actúan sobre la pared celular de las bacterias, compuesta de una glicoproteína llamada peptidoglicano. El peptidoglicano está formado por unidades alternas de N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAM) (Vives, Medvedovsky, y Rot, 2004). La NAM tiene una cadena tetrapeptídica unida. En bacterias Gram negativas esta cadena consiste en L-lisina, ácido D-glutámico, ácido diaminopimélico y d-alanina-d-alanina (Pitton, 1972).

El ácido diaminopimélico en la cadena lateral está conectado a la d-alanina de otra cadena, este entrecruzamiento es provocado por una enzima en el espacio periplásmico llamada d-d transpeptidasa (Bado et al., 2008). A medida que las bacterias crecen y se multiplican, remodelan sus paredes celulares. El anillo β -lactámico del antibiótico es idéntico a la d-alanina-d-alanina por lo que la enzima transpeptidasa se une incorrectamente al antibiótico β -lactámico en lugar de su sustrato original. A la transpeptidasa también se la conoce como proteína de unión de la penicilina (PBP) (Livermore, 1995; Vives et al., 2004). La unión da lugar a la acilación de la enzima que conduce a la producción de una peniciloil-enzima inactiva. Como resultado, no se producen más enlaces cruzados entre las capas de peptidoglicano y la célula sufre inestabilidad osmótica y lisis como se ve en el Anexo 2 (Bado et al., 2008; Pitton, 1972).

La bacteria *E. coli* tiene siete PBP, cada una con una función diferente. La PBP 1 A y B actúan durante la elongación celular, PBP 2 mantienen la forma de la pared celular, PBP 3 forma un tabique entre las células en división, PBP 4, 5 y 6 no son esenciales. La sensibilidad de cada PBP varía con cada antibiótico β -lactámico (Bado et al., 2008; Livermore, 1995; Vives et al., 2004).

Existen cuatro mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos por parte de las bacterias: Inactivación del antibiótico β -lactámico por una enzima (β -lactamasa); producción de una nueva PBP con menor afinidad al antibiótico; decremento de la permeabilidad al antibiótico, por cierre de los canales de porinas y bombas activas que extraen al antibiótico fuera de la célula (Pitton, 1972).

La producción de β -lactamasas es el mecanismo más común de resistencia en bacterias Gram negativas (Geyer et al., 2016). El número de este tipo de enzimas, que se presentan de manera natural, ahora excede a las 1300. Este conjunto de enzimas es, tal vez, una de las familias de proteínas más numerosas actualmente estudiadas (Bush, 2013; Tschudin-sutter et al., 2017).

En *E. coli* la resistencia a la nueva generación de β -lactámicos es debida a la expresión de β -lactamasas hidrolíticas, especialmente las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y los AmpCs mediados por plásmidos (Bajaj et al., 2016; Zurita, 2012).

Las BLEE se definen como β -lactamasas capaces de conferir resistencia bacteriana a penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera e inclusive cuarta generación y a los monobactámicos como el aztreonam, pero no a cefamicinas ni carbapenemes y son susceptibles a inhibición por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Paterson y Bonomo, 2005), propiedad empleada para su identificación fenotípica (Pérez et al., 2007).

Para clasificar las β -lactamasas se emplea comúnmente el esquema Ambler (clasificación molecular) (Ambler et al., 1991) y el sistema Bush-Medeiros-Jacoby (clasificación funcional) como se detalla en el Anexo 3 (Bush et al., 1995).

Según Ambler (1980) a las β -lactamasas se las ha clasificado en cuatro clases, las cuales son A, B, C y D. Basada en la similitud aminoacídica (Ambler et al., 1991). De acuerdo a esta clasificación las β -lactamasas de clase A, C y D son serin- β -lactamasas, debido a que poseen un residuo de serina en el sitio activo que hidroliza el enlace amino del anillo β -lactámico a través de mecanismos de acilación y desacilación. En cambio, las de clase B son las metalo-betalactamasas

porque poseen un ion zinc en el sitio activo que actúa polarizando distintas estructuras del anillo β -lactámico provocando su hidrólisis (Paterson y Bonomo, 2005; Anderson et al., 2012; Bush, 2013).

Las BLEE pertenecen a la clase A y 2be de la clasificación de Ambler, debido a que tienen un residuo de serina en su sitio catalítico para hidrolizar β -lactámicos de espectro extendido. Las β -lactamasas de la clase A se localizan tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas. Este tipo de enzimas son codificadas en ADN plasmidial y cromosómico. En esta clase se encuentran las β -lactamasas tipo TEM, SHV, GES, CTX-M (Ambler et al., 1991).

La primera β -lactamasa mediada por plásmidos fue reportada de un aislado de *E. coli* resistente a ampicilina, obtenida a partir de muestras de orina de una mujer llamada Temoniera en Grecia en 1965; esta enzima se designó como TEM-1. En 1969, TEM-2 se encontró en un aislado de *Pseudomonas aeruginosa* en Gran Bretaña. Se diferenció de TEM-1 en sólo un aminoácido, pero no en el sustrato (Datta y Kontomichalou, 1965).

En 1972 una enzima cromosómica con mejor actividad en contra de ampicilinas fue descrita por Pitton de un aislado de *K. pneumoniae*. Descrita como Pit-2, fue designada más tarde como SHV-1. El nombre derivó debido a que el p-cloromercuribenzoato se une a grupos sulfhidrilo de la enzima e inhibe la hidrólisis de cefaloridina pero no de bencilpenicilina. Ahora se sabe que un hidroxilo de serina, no un sulfhidrilo, es el residuo del sitio activo de SHV-1 (Pitton, 1972).

La SHV-1 es una β -lactamasa cromosómica típica de *K. pneumoniae*, pero también puede ser de origen plasmidial. Todas las variantes SHV descritas derivan del gen *bla*_{SHV-1} con una a siete sustituciones de aminoácidos. En 1983 en Alemania, se registró un aislado de *K. pneumoniae* productor de una variante de la enzima SHV-1 que podía hidrolizar oxymino-cefalosporinas y fue designada SHV-2 (Knothe, Shah, Krcmery, Antal y Mitsuhashi, 1983). Difería de SHV-1 por una sustitución de aminoácidos, Gly \rightarrow Ser, en la posición 213. Esto llevó a un desplazamiento en la cadena β 3 que contenía los residuos 238 a 242, lo que creó un sitio de unión a β -lactámicos expandido, dando más flexibilidad y espacio al

sitio activo de la enzima (Kleibe, Nies, Meyer, Tolxdorff-Neutzlig y Wiedemann, 1985). Estas enzimas son capaces de hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro, que poseen grupo lateral de 2-amino-4-tiazolil metoxyimino (Barthélémy, Péduzzi, Ben Yaghlane y Labia, 1988).

Durante 1985-87 en Francia, se detectó un mutante de TEM (TEM-3/CTX-1). La enzima TEM-3 tenía dos sustituciones de aminoácidos (Gly → Lys en la posición 103 y Gly → Ser en la posición 236). Comparando con la enzima madre, esta enzima confería resistencia a amino-, carboxi, ureidopenicilinas, aztreonam y cefalosporinas de amplio espectro (Barthélémy et al., 1988; Kleibe et al., 1985). Existen actualmente 223 tipos de TEM y 193 tipos SHV de β -lactamasas, muchas de las cuales no tienen fenotipo BLEE, documentadas en la página web <https://www.lahey.org/studies/>.

En la década de 1980 las enzimas tipo BLEE estaban asociadas a brotes hospitalarios de *K. pneumoniae* especialmente β -lactamasas tipo SHV y TEM. En el 2000 emergieron clones CTX-M solo en *E. coli* con rápida diseminación comunitaria (Tschudin-sutter et al., 2017).

La enzima CTX-M derivó de la cefalosporinasa cromosómica de las bacterias ambientales *Kluyvera* sp. El primer aislado clínico se informó en *E. coli*, en Alemania en 1989. Se cree que los genes CTX-M han sido capturados por elementos móviles (como ISEcp1) de los cromosomas de *Kluyvera* spp. El nombre CTX-M se debe a que estas enzimas hidrolizan cefotaxima. Fueron clasificadas en los grupos I, II, III y IV. Actualmente están subclasificadas filogenéticamente en cinco grupos, los cuales son: CTX-M-1, -2, -8, -9 y -25. Existen actualmente al menos 128 variantes de esta enzima (Cantón, González-Alba y Galán, 2012).

Los genes de CTX-M pueden estar presentes dentro de transposones o cassettes genéticos móviles en plásmidos, logrando diseminarse rápidamente. Las β -lactamasas CTX-M son ahora endémicas en varios países y se encuentran con frecuencia en cepas comunitarias y hospitalarias (Zhang et al., 2015). Estas bacterias *E. coli* productoras de enzimas CTX-M, están relacionadas con el clon

pandémico ST131 y son las causantes frecuentes de infecciones al tracto urinario (Geyer et al., 2016).

Por ejemplo, el gen *bla*_{CTX-M-15}, relacionado con el clon ST131 que tiene gran facilidad de dispersión (Tschudin-sutter et al., 2017), y resistente a cefalosporinas de tercera generación, es movilizado por los plásmidos Inc1 e IncF. Estos son los tipos de plásmidos más frecuentes y son los responsables de la diseminación de la resistencia en Enterobacteriaceae (Dolejska et al., 2013; Dziri et al., 2016).

En 1990 las enzimas β -lactamasas se encontraban en el 7% de infecciones hospitalarias, reportadas de brotes comunitarios de *E. coli*, *K. pneumoniae* y otras enterobacterias. En el 2003, más del 20% de *K. pneumoniae* patogénicas, aisladas de unidades de cuidado intensivo en Estados Unidos, eran resistentes a cefalosporinas de tercera generación (Schwaber y Carmeli, 2007). Para el 2016, en Holanda, un estudio en 14 centros hospitalarios mostró mayor tasa de transmisión de BLEE en *Enterobacter cloacae* y *K. pneumoniae* (10% y 11%) que en *E. coli* (4,4%). Sin embargo, el 61% de todas las transmisiones de BLEE fue atribuible a *E. coli*, frente a 27,8% y 11,1% para *K. pneumoniae* y *E. cloacae* (Tschudin-sutter et al., 2017).

En 1989 fue reportada la primera cepa resistente a β -lactámicos en Sur América, en *K. pneumoniae* de un aislado en Chile. Con el tiempo se presentaron nuevos reportes en nuevos países como Brasil, Colombia y Venezuela, con la aparición de nuevas enzimas de resistencia como CTX-M, OXA, TEM y sus variantes (Bonelli, Moreira y Picão, 2014).

En el Ecuador la resistencia hacia antibióticos β -lactámicos se ha registrado por la REDNARBEC del año 2003 al 2010. Se ha observado un incremento de la resistencia tipo BLEE desde el año 2006 (Zurita, 2012). Donde se ha visto un aumento en los brotes de *E. coli* BLEE causantes de infecciones como ITU en ambientes comunitarios y hospitalarios. Con resultados como alta mortalidad, altas tasas de fracaso clínico y duración prolongada de

hospitalización, asociado con un incremento en el costo de salud del 25 al 48%, comparado con no productores de BLEE (Tschudin-sutter et al., 2017). Para el 2016 en un estudio se reveló que el 9,8% de enterobacterias en urocultivos de origen hospitalario presentaban fenotipo BLEE, de las cuales el 83% eran *E. coli* (Capilla, 2016).

La resistencia antibiótica es un problema de salud pública importante, un 70% de las bacterias son resistentes al menos a un antibiótico (Takahashi et al., 2010), y se sabe que la resistencia a antibióticos de nueva generación ha aumentado y que la creación de nuevos antibióticos está disminuyendo. Sin embargo, existen péptidos, producidos en las glándulas granulares de anfibios, con potencial antibiótico efectivo y con menos efectos secundarios (Torcato et al., 2012).

En general, la piel de los vertebrados es la primera barrera de protección entre el mundo exterior y el medio interno del organismo, es químicamente impermeable e inerte hacia muchas de las sustancias del entorno. Para los anfibios es un órgano muy dinámico y permeable, con gran diversidad de funciones como: Respiración cutánea, termorregulación, comunicación y protección química contra predadores y microorganismos (Brunetti, 2014).

La piel de anuros posee dos tipos principales de glándulas dérmicas, las glándulas mucosas y las glándulas serosas. Algunas de las diferencias más evidentes están relacionadas a dos funciones específicas, defensa y comunicación (Faivovich, McDiarmid y Myers, 2013). La defensa está asociada a las glándulas serosas, también conocidas como glándulas granulares o glándulas de veneno, las cuales producen sustancias tóxicas o repelentes. Las glándulas mucosas están relacionadas con la comunicación y la reproducción, y son glándulas sexualmente dimórficas (Brunetti, 2014).

La caracterización química de las secreciones glandulares, en más de 500 especies de anuros en los últimos cuarenta años (Conlon, Mechkarskaa, Radosavljevicb, Attoubc, King, Lukicb y McCleane, 2014), ha hecho posible poder agrupar a los compuestos bioquímicos presentes en: Aminas biogénicas, péptidos

bioactivos, alcaloides lipo- e hidrosolubles, tetrodotoxinas y bufadienólidos (Erspamer, 1994; Brunetti, 2014).

Las secreciones de los anfibios interactúan con la membrana citoplasmática de los microorganismos patógenos, aunque para algunos su blanco es intracelular. Muchos péptidos presentes en las secreciones, no causan la permeabilización de la membrana celular en CMI, sin embargo, causan la muerte celular. Se ha observado que estos péptidos se han trasladado a través de la membrana, acumulándose en el citoplasma, donde interfieren en varios procesos celulares, lo que determina la muerte celular (Cilveti, Rivera, Rodríguez Riglos y Alcocer, 2013).

En un estudio realizado en Ecuador se encontró que la especie de Hylidae, *Agalychnis spurrelli* posee un péptido relacionado con las dermaseptinas (Vargas et al., 2015). Esta familia de péptidos está relacionada con actividades citotóxicas y fueron los primeros péptidos de vertebrados en demostrar actividad membranolítica contra hongos filamentosos, responsables de infecciones letales oportunistas, en síndromes de inmunodeficiencia (Amiche et al., 1994).

En otro estudio realizado en Ecuador se analizó la actividad antimicrobiana de las secreciones peptídicas de una especie perteneciente a la familia Bufonidae, en bacterias productoras de carbapenemasas. Obtuvieron que la CMI₅₀ de las secreciones con las bacterias *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae* y *E. aerogenes*, fue de 250 µg/ml (Cilveti et al., 2013).

La piel de los anfibios constituye un gran laboratorio para el estudio de la bioquímica. Las biomoléculas secretadas en la piel de los anfibios constituyen una fuente biológica de compuestos con varias funciones fisiológicas (Vargas, Pérez, Paredes y Rivera, 2015). Sus secreciones han sido valoradas por diversos grupos a lo largo de la historia, quienes las han usado de forma medicinal, para la caza y en rituales. Desde un aspecto bioquímico, el análisis de biomoléculas en secreciones de anfibios posee un potencial enorme para la obtención de nuevos

tratamientos para infecciones bacterianas, dada la diversidad de compuestos (Brunetti, 2014).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la presencia de alelos que confieren resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Escherichia coli* proveniente de urocultivos obtenidos de pacientes hospitalizados colectados de agosto a octubre de 2015, por secuenciamiento y su inhibición por secreciones de la piel de *Boana rosenbergi* y *Rana* sp. por microdilución en caldo.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Colectar muestras del hospital para la obtención de la población de bacterias para el estudio.
- Identificar la especie de bacteria mediante el uso de matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF)
- Analizar la sensibilidad a antibióticos β -lactámicos de forma fenotípica por VITEK[®] 2 por CMI.
- Identificar la presencia o ausencia de los genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15}; *bla*_{SHV}; *bla*_{TEM} por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers específicos a través de ADN total obtenido de la población de estudio.
- Determinar la identidad de los alelos de los genes *bla*_{CTX-M-1}; *bla*_{SHV}; *bla*_{TEM}; encontrados en la población de estudio por secuenciamiento.
- Realizar pruebas de sensibilidad a péptidos de *Rana* sp. e *Boana rosenbergi* en *E. coli* con perfil de resistencia por microdilución en caldo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El estudio se realizó en aislados obtenidos de antibiogramas de muestras de orina de pacientes de un hospital de tercer nivel en Quito, Ecuador. Este fue realizado en la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), en el Laboratorio de Microbiología y en el Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL) en Quito, Ecuador.

Se colectaron 307 muestras, de hombres y mujeres, de agosto a octubre de 2015, caracterizadas por presentar patrones de resistencia provenientes de urocultivos. Las muestras fueron bacterias de la familia Enterobacteriaceae de las cuales se eligieron 70 muestras, exclusivas de la especie *Escherichia coli*.

La colección se realizó en el hospital, en el área de Microbiología donde se receiptó placas de antibiogramas los días lunes y miércoles de cada semana. Se trasladó las placas al Laboratorio de Microbiología de la PUCE donde se aisló las bacterias en agar eosina azul de metileno (EMB) y agar nutriente (AN) y se incubaron a 37 °C de 18 a 24 horas (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017; Instituto de Biotecnología, 2000). Posteriormente se envió las placas de AN sembradas para la identificación de la especie de las 70 muestras, por matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Pasch y Schrepp, 2003).

Las colonias aisladas en placas de EMB fueron sembradas en 4ml de caldo cerebro corazón (BHI) y se las incubó a 37 °C de 18 a 24 horas. A la suspensión bacteriana en BHI se colocó 1 ml de glicerol, a continuación se pasó 1ml de suspensión bacteriana, al 25% de glicerol, a cuatro crioviales por muestra y se congeló dos a -20 °C y dos a -80 °C para su posterior uso (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017; Leal y Ramírez, 2005).

5.2 IDENTIFICACIÓN DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Se aislaron las 70 muestras de *E. coli* en agar nutriente y se las envió a los Laboratorios Zurita & Zurita. Mediante el uso de VITEK® 2, fue analizada la sensibilidad antibiética a β -lactámicos.

El sistema analiza los patrones de concentración mínima inhibitoria (CMI) para la identificación fenotípica. Los cultivos de *E. coli* se suspendieron en solución acuosa 0,45% (wt/vol) NaCl para obtener la turbidez equivalente a 2,0 en la escala de McFarland (rango, 1,80 a 2,20) (Naz, Hussain, Khan, Farooqui y Malik, 2016).

La sensibilidad antimicrobiana fue probada con el sistema automatizado VITEK® 2 usando las tarjetas ID-GNB y AST-037, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. VITEK® 2 automáticamente llena, sella e incuba la suspensión del cultivo preparada. Las cartas se mantienen a 35,5 °C por 18 h, con lecturas ópticas realizadas automáticamente cada 15 minutos. Bajo estas lecturas fue establecido un perfil de susceptibilidad de la muestra a ampicilina (10 μ g) (AMP), ampicilina/sulbactam (10/10 μ g) (SAM), piperacilina/tazobactam (10/10 μ g) (PIP-TZ), cefazolina (30 μ g) (CZO), cefotaxima (30 μ g) (CTX), ceftazidima (30 μ g) (CAZ), ceftriaxona (30 μ g) (CRO), cefepima (30 μ g) (FEP), ertapenem (10 μ g) (ETP) e imipenem (10 μ g) (MEM), además de la identificación de la especie, de acuerdo a un algoritmo específico. Los resultados finales se introdujeron a la base de datos CBQ-CA y se compararon con los datos proporcionados por el hospital (Naz et al., 2016).

Del hospital se nos entregó placas de Agar Mueller Hinton (MHA) donde se encontraban sembradas las 70 muestras de *E. coli*. Estaban colocados discos de doxicilina (10 μ g) (DOX), ampicilina (10 μ g) (AMP), cefuroxima (30 μ g) (CXM), ampicilina/sulbactam (10/10 μ g) (SAM), cefoxitina (30 μ g) (FOX), cefazolina (30 μ g) (CZO), ceftriaxona (30 μ g) (CRO), ertapenem (10 μ g) (ETP) y amoxicilina/ácido clavulánico (10/10 μ g) (AMC), a 3 cm de distancia de cada una. Se realizó la lectura de la zona inhibitoria alrededor de los discos de antibióticos (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013 ; Mena y Armindo, 2009).

El aumento del tamaño del halo alrededor del antibiótico de prueba y el disco que contiene el ácido clavulánico es llamado efecto clavulánico. Un aumento del diámetro mayor a 6 mm es considerado positivo y fue tomado como evidencia de producción de BLEE (Begum et al., 2016; Naz et al., 2016).

5.3 EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN de las 70 bacterias de *E. coli* se realizó de las muestras almacenadas previamente en crioviales a -20 °C y se siguió las instrucciones dictadas por el protocolo de Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega, 2010), para bacterias Gram-negativas; el ADN extraído será almacenado a -20 °C. (Gil, Núñez, Benevidez y López, 2014).

5.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La amplificación de los genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} se realizó con primers específicos (Tabla 4). La reacción de PCR se realizó con un volumen final de 50 μ l con concentración de 10 ng/ μ l, con volumen de: 19 μ l de H₂O; 2 μ l de cada primer (forward y reverse); 25 μ l de máster mix y 2 μ l de ADN por muestra para los genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}. 13 μ l de H₂O; 1 μ l de cada primer (forward y reverse); 25 μ l de máster mix y 10 μ l de ADN por muestra para el gen *bla*_{CTX-M-1} y 20 μ l de H₂O; 2 μ l de cada primer (forward y reverse); 25 μ l de máster mix y 1,5 μ l de ADN por muestra para el gen *bla*_{CTX-M-15} (Blanco et al., 2013; Cartelle, 2005; Hayakawa et al., 2013; Kiratisin et al., 2008). El primer CTX-M-15/28 amplifica el final 3' del gen *bla*_{CTX-M-15}, por lo cual se lo uso para confirmar los resultados del secuenciamiento de las muestras analizadas con el primer CTX-M-1 (Leflon-Guibout et al., 2004).

El protocolo para PCR para *bla*_{CTX-M-15} fue: 95 °C de temperatura de desnaturalización por diez minutos; 25 ciclos, con 95 °C de desnaturalización por un minuto, 54 °C de annealing por un minuto y 72 °C de elongación por un minuto; al finalizar los ciclos se prosiguió con diez minutos a 72 °C para la elongación final (Blanco et al., 2013). Para el gen *bla*_{CTX-M-1}: 95 °C por 10 minutos de desnaturalización; 35 ciclos, 95 °C por un minuto de desnaturalización, 55° C por

un minuto de annealing y 72 °C por un minuto de elongación; al finalizar los ciclos se finalizó con diez minutos a 72 °C para la elongación final (Cartelle, 2005).

El protocolo para *bla_{SHV}* fue: 94 °C por dos minutos de desnaturalización; 25 ciclos, 94 °C por treinta segundos de desnaturalización, 55 °C por treinta segundos de annealing y 72 °C por un minuto de elongación; al terminar los ciclos se continuo con siete minutos a 72 °C de elongación final (Kiratisin et al., 2008). Para el gen *bla_{TEM}* el protocolo fue: 95 °C por diez minutos de desnaturalización; 30 ciclos, 94 °C por treinta segundos de desnaturalización, 58,5 °C por un minuto de annealing y 72 °C por un minuto con cincuenta segundos de elongación; se terminó con diez minutos de elongación a 72 °C (Hayakawa et al., 2013).

El producto de PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El tamaño del amplicon de la PCR se verificó usando un marcador de peso molecular de 100 pb. La agarosa fue disuelta y corrida en buffer tris, ácido bórico, EDTA (TBE) o tris, ácido acético, EDTA (TAE) al 0,5%. La corrida se realizó a 100V de 45 a 60 minutos. El gel de agarosa fue teñido con 1,5 μ l de SYBR Gold al cual se lo disolvió en 5 ml de buffer TBE o TAE 0,5%. El gel se colocó en un contenedor junto con la solución de SYBER Gold en un cajón oscuro por un periodo de 30 a 45 minutos. La imagen se realizó con foto documentador BioRad y se editó con el software ImageLab™. (Gil et al., 2014).

Los productos de PCR se enviaron a MacroGen en Corea del Sur vía FedEx. El análisis de secuencias se realizó con el software *Geneous 7.0*.

5.5 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A PÉPTIDOS DE ANUROS POR MICRODILUCIÓN EN CALDO

Se eligió 10 bacterias *E. coli* de la población de estudio que mostraban la presencia fenotípica de al menos uno de los genes de resistencia a β -lactámicos previamente analizados; se usaron los péptidos excretados de la piel de anuros de las especies *Boana rosenbergi* y *Rana* sp. Los liofilizados de los péptidos fueron proporcionados por el laboratorio de Citogenética de la PUCE dirigido por la Mtr. Miryan Rivera Íñiguez.

Para cada extracto de péptido se realizó lo siguiente: Se preparó dos soluciones de 10 ml cada una, A (0,02% de ácido acético que contiene 0,4% de BSA) y B (0,01% de ácido acético que contiene 0,2% de BSA). Se tomó 11 tubos eppendorf de 1,5 ml, se rotuló el primero como 20x y se enumeró los demás desde 1 hasta 10, equivalente con las concentraciones respectivas del péptido a ser utilizadas en las placas de microtitulación (Wiegand, Hilpert, y Hancock, 2008). Las concentraciones usadas fueron de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 32,25; 15,62; 7,81; 3,90 y 1,95 $\mu\text{g/ml}$.

El volumen final para cada concentración fue de 900 μl , para las 10 placas con las 10 bacterias. La concentración inicial fue: 1000 μg :1000 μl . Se inició con una solución de concentración veinte veces superior (20x) y a partir de esta se realizó disoluciones seriadas (10x) (Wiegand et al., 2008).

Para la solución 20x se pesó 0,018 μg de cada péptido y se lo disolvió en 900 μl de solución A. Se colocó 900 μl de solución B en los tubos del 2 al 10. En el tubo 1 se colocó 900 μl de la solución 20x y 900 μl de la solución B obteniendo una solución con concentración 10x, con volumen de 1800 μl ; de esta se tomó 900 μl y se la colocó en el tubo 2 con la solución B, se resuspendió cuidadosamente de 6 a 8 veces y se repitió el procedimiento hasta el tubo 10 desechando el volumen final (Wiegand et al., 2008).

Dentro de una cámara de flujo, se emplearon 10 placas estériles de poliestireno para microtitulación, con tapa, de 96 pocillos con fondo plano (Fernandez Andreu, Gonzalez Miranda, Illnait Zaragoza, y Martínez Machín, 1998), se puso 10 μl de cada solución desde la fila A hasta la G, de la columna 1 hasta la 10, equivalente a cada concentración, la fila H no se utilizó. En la columna 12 se colocó el caldo Mueller Hinton (MHB) sin bacteria, como blanco. Se realizó una suspensión bacteriana ajustada a la escala 0,5 de MacFarland (1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) ml^{-1}) y se la diluyo en proporción 1:200 en MHB, resultando en un inóculo final de 5×10^5 UFC ml^{-1} (Wiegand et al., 2008).

Se utilizó una caja Petri estéril como reservorio de la solución con bacteria. Se pipeteó 90 μl de la solución microbiana en cada pocillo de la columna 1-10 de

la placa de microtitulación donde se habían colocado previamente las soluciones con el péptido; se obtuvo una concentración 1x para cada solución. Se añadió 100 μ l de solución microbiana en la columna 11 como control de crecimiento. Se incubó la placa de microtitulación a 37 °C por un periodo entre 16 y 20 horas (Wiegand et al., 2008). Se leyó las placas de microtitulación en un lector de Elis as donde se obtuvo la turbidez con un filtro de 630 nanómetros y volumen final de 100 μ l. Se procedió a realizar una curva con los datos turbidez para observar la inhibición del crecimiento (Fernandez Andreu et al., 1998).

Con estos datos se calculó la CMI, que se definió como la menor concentración de péptido, contenido en pocillo de la serie, que inhibió el crecimiento visible de las bacterias ensayadas (Horna, Silva, Vicente, y Tamariz, 2012). El criterio de crecimiento se realizó considerando el desarrollo o su falta en cada pocillo, comparando con las características de crecimiento en el pocillo control de la columna 11 y el pocillo blanco de la columna 12 (Fernandez Andreu et al., 1998).

Como análisis estadístico se determinó los rangos y las medias geométricas de los valores de CMI obtenidos (Fernandez Andreu et al., 1998). Se determinaron los porcentajes acumulativos de CMI para los péptidos de *B. rosenbergi* y *Rana* sp. y se obtuvieron las CMI₅₀ y CMI₉₀ (concentración mínima inhibitoria del 50,0 y 90,0% de las cepas) (Horna et al., 2012)

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS DE ESPECTRO EXTENDIDO

Se obtuvo un total de 307 muestras pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae desde agosto a octubre de 2015. Las muestras provenían de urocultivos de pacientes, donde 283 muestras fueron de la especie *E. coli* (92,2%); las 24 muestras restantes pertenecieron a colonias de *Citrobacter freundii* (0,7%), *Klebsiella pneumoniae* (3,9%), *Proteus mirabilis* (1,6%) y *Pseudomona aeruginosa* (0,3%); 238 muestras se originaron de mujeres (77,5%) y 69 de hombres (22,5%).

De las 307 muestras obtenidas se seleccionaron 70 muestras al azar como población de estudio. Las 70 muestras se originaron de urocultivos y se confirmó su especie por MALDI-TOF, para todas las muestras seleccionadas la especie fue *E. coli* (Tabla 1). De la población de estudio 54/70 muestras se originaron de mujeres (77,1%) y 16/70 de hombres (22,9%); además, 46/70 (65,7%) de muestras provienen de consulta externa; 10/70 14,3% de emergencia; 1/70 (1,5%) de cuidado intensivo y 13/70 (18,5%) de hospitalización.

Por VITEK[®] 2 se obtuvo que 39/70 (55,7%) muestras de *E. coli* dieron positivo para el fenotipo BLEE. Se obtuvo a su vez el perfil de susceptibilidad a ampicilina (10 μ g) (AMP), ampicilina/sulbactam (10/10 μ g) (SAM), piperacilina/tazobactam (10/10 μ g) (PIP-TZ), cefazolina (30 μ g) (CZO), cefotaxima (30 μ g) (CTX), ceftazidima (30 μ g) (CAZ), ceftriaxona (30 μ g) (CRO), cefepima (30 μ g) (FEP), ertapenem (10 μ g) (ETP) e imipenem (10 μ g) (MEM) (Tabla 2).

De los antibiogramas otorgados por el hospital se obtuvo el perfil de susceptibilidad a doxicilina (10 μ g) (DOX), ampicilina (10 μ g) (AMP), cefuroxima (30 μ g) (CXM), ampicilina/sulbactam (10/10 μ g) (SAM), cefoxitina (30 μ g) (FOX), cefazolina (30 μ g) (CZO), ceftriaxona (30 μ g) (CRO), ertapenem (10 μ g) (ETP) y amoxicilina/ácido clavulánico (10/10 μ g) (AMC) (Tabla 3). Al ver el efecto

inhibitorio del ácido clavulánico se obtuvo el mismo resultado fenotípico que por VITEK® 2, donde 39/70 (55,7%) muestras de *E. coli* tuvieron fenotipo BLEE.

En la corrida en gel de agarosa al 1% del producto de PCR se obtuvo la presencia o ausencia de los genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, con primers específicos para cada gen (Tabla 4), con bandas de 1200 pares de bases (pb) para *bla*_{CTX-M-1}, 483 pb para *bla*_{CTX-M-15}, 862 pb para *bla*_{SHV} y 1210 pb para *bla*_{TEM} (Figuras 1, 2, 3 y 4).

Con el patrón de bandas se observó la presencia del genotipo de las muestras para los genes de β-lactamasas, se obtuvo que: 29/70 muestras tuvieron la presencia del gen *bla*_{CTX-M-1}; 27/70 muestras tuvieron la presencia del gen *bla*_{CTX-M-15}; 19/70 muestras tuvieron la presencia del gen *bla*_{TEM} y 3/70 muestras para el gen *bla*_{SHV} (Tabla 5).

Durante el análisis de las secuencias se obtuvo para el gen *bla*_{CTX-M-1} que todas las muestras analizadas presentaron al alelo CTX-M-15. Las muestras positivas para el gen *bla*_{CTX-M-1} fueron las mismas que para el primer CTX-M-15/28, con excepción de CB-QCA 4015, CB-QCA 4047 y CB-QCA 4151, lo que se puede ver en la tabla 6. Se obtuvo un total de 32/70 (45,7%) muestras positivas para el alelo CTX-M-15 en la población estudiada. No se obtuvo resultados de secuenciación con el gen *bla*_{SHV}. Para el gen *bla*_{TEM}, 14/19 muestras dieron negativo para el fenotipo BLEE y presentaron los alelos TEM-1 (18) y TEM-214 para el aislado CB-QCA 4156 (Tabla 7).

6.2 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A PÉPTIDOS DE ANUROS POR MICRODILUCIÓN EN CALDO

Las 10 bacterias *E. coli* seleccionadas tuvieron al menos un gen de resistencia a antibióticos β-lactámicos y fenotipo BLEE positivo (Tabla 8). Al finalizar las microdiluciones, comparando con el control de crecimiento, se obtuvo que no hubo inhibición mayor al 30% para los péptidos de *B. rosenbergi*, para ninguna cepa de *E. coli* ensayada (Tabla 9). Se observó que existió mayor crecimiento con las concentraciones más altas de 1000 µg/ml, 500 µg/ml e incluso

250 $\mu\text{g/ml}$, con un promedio de crecimiento 10% mayor que el control de crecimiento (Figura 5).

En la Figura 6 se puede encontrar el promedio de inhibición para las diferentes concentraciones de *B. rosenbergi* para todas las cepas utilizadas, se puede observar en la línea de tendencia exponencial con $R^2= 0,13$, es decir los puntos no se ajustan a la curva de crecimiento.

Para *Rana* sp. se puede observar los datos en porcentaje de CMI comparando con el control de crecimiento (Tabla 10), se puede notar que hubo inhibición de crecimiento para las concentraciones 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$ y 125 $\mu\text{g/ml}$ con un promedio de porcentaje de inhibición de 86; 89; 90 y 85%, respectivamente. A la concentración de 62,5 $\mu\text{g/ml}$ tuvo inhibición promedio de 75%. A las concentraciones de 31,25 $\mu\text{g/ml}$; 15,63 $\mu\text{g/ml}$ y 7,81 $\mu\text{g/ml}$ hubo menor inhibición, esta fue en promedio del 34, 33 y 31% para cada una; a las concentraciones de 3,91 $\mu\text{g/ml}$ y 1,95 $\mu\text{g/ml}$ hubo inhibición de 28 y 18 %, se puede observar en la línea de tendencia exponencial con $R^2= 0,875$, los puntos de ajustan en 87,5% a la curva (Figuras 7 y 8).

El rango para las medias geométricas estuvo entre las concentraciones de 1000 y 1,95 $\mu\text{g/ml}$, con medias geométricas que nos indican tasas de crecimiento muy altas para las bacterias en presencia del péptido de *B. rosenbergi*, es decir que no existió inhibición (Tabla 11). No se obtuvo resultados de número de cepas inhibidas, ni de porcentajes acumulados. Para *Rana* sp. los rangos para las medias geométricas estuvieron entre las concentraciones de 1000 $\mu\text{g/ml}$ y 1,95 $\mu\text{g/ml}$, las medias geométricas muestras tasas de crecimiento bacteriana bajas para la mayoría de cepas utilizadas en presencia del péptido, excepto la CB-QCA4136 (Tabla 12). El número de cepas inhibidas para cada concentración fue de 10 para 1000; 500 y 250 $\mu\text{g/ml}$, 9 para 125 $\mu\text{g/ml}$ y 8 para 62,5 $\mu\text{g/ml}$. Por los porcentajes acumulativos podemos saber que la CMI_{90} es de 500 $\mu\text{g/ml}$ y la CMI_{50} es de 250 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 13). Las series de campo (SC) de los individuos de donde se obtuvo los péptidos se pueden encontrar en la tabla 14.

7. DISCUSIÓN

7.1 CARACTERIZACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS DE ESPECTRO EXTENDIDO

Los porcentajes de origen de hombres y mujeres para las 307 muestras obtenidas se alinea con los datos hospitalarios internacionales (OMS, 2017). De los datos obtenidos, el 77,5% de muestras se originaron de urocultivos de mujeres con ITU. De estas el 92,2% fue ocasionado por la especie *E. coli*, donde normalmente el 85% de las ITU son causadas por esta bacteria (Geyer et al., 2016).

Para las 70 muestras de la población se puede observar que al menos 80% son cepas de origen comunitario provenientes de consulta externa y emergencias, lo que concuerda con las tendencias mundiales (Tschudin-sutter et al., 2017). Además tiene porcentajes de origen similares a la población total, donde 77,1% de muestras se originaron de mujeres con ITU, lo que está dentro de las estadísticas obtenidas por la organización mundial de la salud, para este tipo de infección (OMS, 2017).

Las 70 muestras fueron de la especie *E. coli*, confirmado por MALDI-TOF, por VITEK[®] 2 y los cultivos en medio EMB donde se apreció el típico color verde metálico (Alcocer, 2016). En los resultados de VITEK[®] 2 se obtuvo que el 55,7% de muestras de *E. coli* tenían fenotipo BLEE debido al patrón de sensibilidad a los antibióticos β -lactámicos (Tabla 2). Se puede notar una clara correlación entre las muestras que fueron BLEE positivas y los índices de susceptibilidad hacia los antibióticos probados por VITEK[®] 2 y las mediciones de los halos ocasionados por los antibióticos en los antibiogramas, tal como se puede constatar en tabla 3 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017).

Para los productos de PCR se obtuvo bandas que coinciden con el tamaño de las referencias utilizadas (Blanco et al., 2013; Cartelle, 2005; Hayakawa et al., 2013; Kiratisin et al., 2008) (Tabla 4 y Figura 2). Son bandas claras y brillantes;

demostrando así la calidad de los productos de PCR. Se obtuvo mayor presencia del gen *bla*_{CTX-M-15} en las cepas analizadas, este es uno de los genes más prevalentes en las ITU y se ha visto relacionado al clon pandémico ST131 (Geyer et al., 2016; Tschudin-sutter et al., 2017).

Las muestras de PCR para el primer SHV no poseían la calidad necesaria para ser analizadas, por lo que se las descartó, lo mismo sucedió con algunas muestras de CTX-M-1 (Tabla 6) y con todos los reverse de TEM. Por falta de tiempo y presupuesto no se repitió el análisis. Las muestras restantes si fueron analizadas.

El gen *bla*_{SHV} estuvo presente en tres cepas, este es un gen cromosómico de *K. pneumoniae*, más común en esta especie. La ausencia de este gen en la población de *E. coli* utilizada, se puede deber a la presencia de genes más virulentos, relacionados a ITU como *bla*_{CTX-M-15} (Collantes et al., 2012; Dziri et al., 2016).

Se notó que algunas cepas sin la presencia de los genes de resistencia a β -lactámicos estudiados presentaron fenotipo BLEE positivo. Se puede deber a que estas cepas BLEE positivas podrían tener otros genes de resistencia no ensayados como *bla*_{OXA}, por ejemplo. Se necesitan más análisis en estas tres cepas: CB-QCA 4062; CB-QCA 4076 y CB-QCA 4134 (Carrër et al., 2010).

Existieron muestras con fenotipo BLEE negativo, específicamente para el gen *bla*_{TEM}, excepto por las muestras CB-QCA 4041, CB-QCA 4043, CB-QCA 4136, CB-QCA 4151 y CB-QCA 4156. Estas últimas tuvieron la presencia conjunta del gen *bla*_{CTX-M-15} (Tabla 5). Se sabe que muchas de las enzimas β -lactamasas no tienen fenotipo BLEE (Rao, 2015). De las 70 muestras analizadas 19 muestras fueron positivas (27,1%) para la β -lactamasa TEM. En la tabla 2 y 3 se puede ver que todas las muestras que dieron positivo para *bla*_{TEM} con los alelos *bla*_{TEM-1} y *bla*_{TEM-214}, son sensibles hacia ampicilina.

La muestra CB-QCA 4064 también tuvo fenotipo BLEE negativo pero solo con la presencia del alelo *bla*_{CTX-M-15} y de igual forma mostro sensibilidad hacia

ampicilina. La ampicilina es una aminopenicilina de amplio espectro, de gran vida media (1 a 2,5h), es excretada por vía renal y *bla*_{TEM} es el gen normalmente presente en cepas resistentes a antibióticos β -lactámicos derivados de la penicilina al igual que *bla*_{CTX-M-15}, (Anexo 3) (Mosquito, Ruiz, Bauer y Ochoa, 2011; Vives et al., 2004).

Es notable la presencia del alelo *bla*_{CTX-M-15} en el 45% de las muestras analizadas. La enzima CTX-M-15 ha sido reportada en todos los continentes y es más afín a producir multirresistencia comparando con otros aislados productores de CTX-M-1. En *E. coli* está relacionado con el clon pandémico ST131 pero también ocurre transferencia por plásmidos. Este clon pandémico se encuentra frecuentemente en ITU de origen hospitalario y comunitario (Geyer et al., 2016; Rao, 2015).

7.2 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A PÉPTIDOS DE ANUROS POR MICRODILUCIÓN EN CALDO

Para *Boana rosenbergi* existió mayor crecimiento con las concentraciones más altas de 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ e incluso 250 $\mu\text{g/ml}$, las bacterias pudieron haber usado el péptido como alimento, ya que a estas concentraciones era muy abundante y por esto aumentó la biomasa de la bacteria en comparación con el control de crecimiento, al cual las células solo se encontraban suspendidas en el caldo de cultivo MHB.

A menores concentraciones existió un 30% de inhibición comparando con el control de crecimiento. Es difícil saber la razón, considerando que no se conocen los compuestos bioquímicos específicos, pero este porcentaje no es suficiente para decir que las cepas utilizadas son sensibles a los compuestos en el péptido, además de que existió una tasa de crecimiento muy alta para todas las cepas utilizadas (Tabla 12).

Para el péptido de *Rana sp.* existió inhibición de crecimiento en los pocillos con concentraciones altas de 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$ y 125 $\mu\text{g/ml}$ hasta del 90%, lo que se puede ver en la CMI_{90} que fue de 500 $\mu\text{g/ml}$, es decir que a

esta concentración el 90% de las cepas fue susceptible al péptido. Y la concentración a la que la mitad de las cepas fue susceptible al péptido fue de 250 $\mu\text{g/ml}$, es decir la CMI_{50} . No se conoce el compuesto bioquímico específico en la mezcla de péptido que causó esta inhibición, pero su presencia es notable, por lo que se hacen necesario más estudios que permitan conocer con certeza la naturaleza de las molécula responsables de su bioactividad y la forma de acción de cada compuesto bioquímico excretado por las glándulas granulares de la piel de la especie estudiada.

8. CONCLUSIONES

1. Las bacterias obtenidas del hospital proporcionaron una base sólida para el estudio.
2. Las proporciones de la población de estudio se ajustan correctamente a las estadísticas mundiales dadas por la OMS.
3. *E. coli* es un reservorio para el material genético responsable del origen y transmisión de la resistencia a antibióticos β -lactámicos y actualmente es responsable de una gran variedad de infecciones que alguna vez fueron tratadas fácilmente.
4. El gen *bla*_{CTX-M-1,15} predominante en este estudio, junto con, *bla*_{TEM-1} fueron los responsables de la morbilidad ocasionada a los pacientes de donde se obtuvo las muestras. Además, el gen *bla*_{CTX-M-15} parece estar directamente relacionado con ITU en este y otros estudios.
5. El gen *bla*_{TEM} con el alelo TEM-1, presente en la mayoría de muestras, aunque no presentó fenotipo BLEE, fue responsable de la resistencia a ampicilina en *E. coli* de los pacientes con ITU.
6. El gen *bla*_{SHV} no estuvo presente en un gran porcentaje de la población de estudio, pero sin duda es un gen peligroso que puede ocasionar morbilidad y aumentar los costos de control de enfermedades.
7. La sensibilidad de *E. coli* hacia los péptidos de *Rana* sp. fue un éxito que puede ser explotado por futuros estudios para encontrar nuevas alternativas para la terapia antibiótica en infecciones. Lastimosamente los péptidos de *B. rosenbergi* no dieron los resultados esperados, el uso de solo dos individuos puede ser la razón, así que sin duda más estudios son necesarios.

9. RECOMENDACIONES

Para adquirir mayor información sobre las bacterias de la población de estudio y su posible impacto en la sociedad ecuatoriana, es recomendable añadir análisis de clonalidad de las muestras analizadas. Además, sería interesante analizar y secuenciar el ADN de las bacterias con la enzima β -lactamasa CTX-M-15 para determinar si éstas se originaron del clon pandémico ST131.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcocer, I. (2016). Cuaderno de trabajo. Laboratorio de Microbiología, Universidad Católica del Ecuador. Quito.
- Ambler, R. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Science*, 289(1036), 321-331.
- Ambler, R., Coulson, A., Freire, J., Ghuysen, J., Joris, B., Forsman, M., Le´vesque, R., Tiraby, G. y Waley, G. (1991). A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochemistry Journal*, 276, 269-272.
- Anderson, R., Groundwater, P., Todd, A. y Worsley, A. (2012). *Antibacterial Agents: Chemistry, Mode of action, Mechanism of Resistance and Clinical Applications*. Wiley, United Kingdom.
- Amiche, M., Ducancel, F., Mor, A., Boulain, J. C., Menez, A. y Nicolas, P. (1994). Precursors of vertebrate peptide antibiotics dermaseptin b and adenoregulin have extensive sequence identities with precursors of opioid peptides dermorphin, dermenkephalin, and deltorphins. *Journal of Biological Chemistry*, 269(27), 17847-17852.
- Bado, I., García, V., Robino, L., Cordeiro, N., Seija, V. y Vignoli, R. (2008). *Principales Mecanismos de Resistencia antibiótica, Temas de bacteriología y Virología Médica* (3ra ed.). Montevideo: Oficina del libro FEFMUR.
- Bajaj, P., Kanaujia, P. K., Singh, N. S., Sharma, S., Kumar, S. y Viridi, J. S. (2016). Quinolone co-resistance in ESBL- or AmpC-producing *Escherichia coli* from an Indian urban aquatic environment and their public health implications. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2), 1954-1959. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5609-x>
- Barthélémy, M., Péduzzi, J., Ben Yaghlane, H. y Labia, R. (1988). Single amino acid substitution between SHV-1 beta-lactamase and cefotaxime-hydrolyzing SHV-2 enzyme. *FEBS letters*, 231(1), 217-220. [https://doi.org/10.1016/0168-8734\(88\)80734-8](https://doi.org/10.1016/0168-8734(88)80734-8) [pii]
- Begum, Y. A., Talukder, K. A., Azmi, I. J., Shahnaij, M., Sheikh, A., Sharmin, S., ... Qadri, F. (2016). Resistance Pattern and Molecular Characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) Strains Isolated in Bangladesh. *Plos One*, 11(7), 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157415>

- Blanco, J., Mora, A., Mamani, R., López, C., Blanco, M., Dahbi, G., ... Rodríguez-Baño, J. (2013). Four main virotypes among extended-spectrum- β -lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: Bacterial, epidemiological, and clinical characteristics. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), 3358-3367. <https://doi.org/10.1128/JCM.01555-13>
- Bonelli, R. R., Moreira, B. M. y Picão, R. C. (2014). Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. *Drug Resistance Updates*, 17(1-2), 24-36. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2014.02.001>
- Brunetti, A. (2014). *Comunicación química de anuros: una perspectiva integral a partir de aspectos comportamentales, morfológicos y químicos en dos especies de Hypsiboas (Amphibia: Anura: Hylidae)*. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Bush, K. (2013). The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 19(4), 549-559. <https://doi.org/10.1007/s10156-013-0640-7>
- Cantón, R., González-Alba, J. M. y Galán, J. C. (2012). CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 3(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>
- Capilla, V. (2016). *Frecuencia de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en muestras de urocultivos de pacientes de consulta externa, del Servicio de Urología y Nefrología, del Hospital Carlos Andrade Marín, período Enero – Diciembre de 2016*. Universidad Central del Ecuador.
- Carrër, A., Poirel, L., Yilmaz, M., Akan, Ö. A., Feriha, C., Cuzon, G., ... Nordmann, P. (2010). Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 1369-1373. <https://doi.org/10.1128/AAC.01312-09>
- Cartelle M. (2005). Ph.D. thesis. Universidad de Cataluña, Barcelona, España
- Cilveti, C., Rivera, M., Rodríguez Riglos, M. y Alcocer, I. (2013). Inhibición de enterobacterias portadoras de carbapenemasas con secreciones peptídicas de anfibios nativos ecuatorianos. *Revista Ecuatoria de Medicina y Ciencias Biológicas*, 85-98.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, C. (2017). *Performance Standards for*

- Antimicrobial Susceptibility Testing* (27.^a ed.). 950 West Valley Road, Suite 2500 Wayne, PA 19087 USA. Recuperado a partir de www.clsi.org
- Collantes, C. D. L., Alvargonzalez, J. C., Chacón, A. M. A., Ortega, M. J. C., Romero, I. S., Ascaso, M. G. y Pi, R. (2012). Infecciones del tracto urinario : sensibilidad antimicrobiana y seguimiento clínico. *Anales de Pediatría*, 76(4), 224-228. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2011.10.002>
- Datta, N. y Kontomichalou, P. (1965). Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature*, 208(5007), 239-241. <https://doi.org/10.1038/208239a0>
- Daza, D. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 22(3), 57-67. Recuperado a partir de <http://www.msc.es/fr/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
- Dolejska, M., Vill, L., Dobiasova, H., Fortini, D., Feudi, C. y Carattoli, A. (2013). Plasmid content of a clinically relevant klebsiella pneumoniae clone from the czech republic producing CTX-M-15 and QnrB1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(2), 1073-1076. <https://doi.org/10.1128/AAC.01886-12>
- Dziri, R., Klibi, N., Alonso, C. A., Said, L. Ben, Bellaaj, R., Slama, K. Ben, ... Torres, C. (2016). Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Klebsiella, Enterobacter and Citrobacter obtained in environmental samples of a Tunisian Hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.07.013>
- Fernandez Andreu, C., Gonzalez Miranda, M., Illnait Zaragoza, M. T. y Martínez Machín, G. (1998). Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico. *Revista Cubana Medicina Tropical*, 50(1), 48-53.
- Geyer, C. N., Fowler, R. C., Johnson, J. R., Johnston, B., Weissman, S. J., Hawkey, P. y Hanson, N. D. (2016). Evaluation of CTX-M steady-state mRNA, mRNA half-life and protein production in various STs of Escherichia coli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(3), 607-616. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv388>
- Gil, Z. A., Núñez, J. L., Benevidez, E. A. y López, E. L. (2014). Detección de los genes SHV, TEM Y CTX-M en cepas de Escherichia coli β -lactamasas de espectro extendido procedentes de un Hospital de Chiclayo-Perú. *Revista del*

- Cuerpo Médico del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*, 7(3), 27-30.
Recuperado a partir de http://www.cmhnaaa.org.pe/pdf/v7-n3-2014/RCM-V7-N3-2014_pag27-30.pdf
- Hayakawa K, Gattu S, Marchaim D, Bhargava A, Palla M, Alshabani K, Gudur UM, Pulluru H, Bathina P, Sundaragiri PR, Sarkar M, Kakarlapudi H, Ramasamy B, Nanjireddy P, Mohin S, Dasagi M, Datla S, Kuchipudi V, Reddy S, Shahani S, Upputuri V, Marrey S, Gannamani V, Madhanagopal N, Annangi S, Sudha B, Muppavarapu KS, Moshos JA, Lephart PR, Pogue JM, Bush K, Kaye KS. (2013). Epidemiology and risk factors for isolation of *Escherichia coli* producing CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase in a large U.S. Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 57:4010–8.
- Horna, G., Silva, M., Vicente, W. y Tamariz, J. (2012). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Medica Herediana*, 16(1), 39.
- Instituto de Biotecnología. (2000). Fundamentos y técnicas para la preservación de bacterias , hongos y levaduras. Universidad Nacional de Colombia.
- Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. (2008). Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2818–24.
- Kleibe, C., Nies, B., Meyer, J., Tolxdorff-Neutzlig, R. y Wiedemann, B. (1985). Plasmid-Coded Cephalosporins, 28(2), 302-307.
- Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M. y Mitsuhashi, S. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 11(6), 315-317. <https://doi.org/10.1007/BF01641355>
- Leal, L. C. S. y Ramírez, L. C. C. (2005). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Nova*, 3(4), 21-29. <https://doi.org/ISSN:1794-2470>
- Leflon-Guibout, V., Jurand, C., Bonacorsi, S., Espinasse, F., Guelfi, M. C., Duportail, F., ... Nicolas-Chanoine, M. H. (2004). Emergence and spread, of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli*

- with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3736-3742. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3736-3742.2004>
- Livermore, D. M. (1995). beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews*, 8(4), 557-84.
- Marinelli, F. y Genilloud, O. (2014). *Antimicrobials: New and old molecules in the fight against multi-resistant bacteria. Antimicrobials: New and Old Molecules in the Fight Against Multi-Resistant Bacteria* (Vol. 9783642399). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-39968-8>
- Mena, P. y Armindo, J. (2009). Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en cepas de la familia Enterobacteriaceae Extended Spectrum Betalactamase Detection in Enterobacteriaceae Family Strains, 37(1), 25-37.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., & Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en Escherichia coli asociadas a diarrea. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 28(4), 648-656. <https://doi.org/10.1590/S1726-46342011000400013>
- Naz, R., Hussain, A., Khan, S., Farooqui, M. K. y Malik, A. K. (2016). Antibiotic Susceptibility Pattern of ESBL producing Uropathogens, 5(8), 825-831.
- OMS. (2017). Estadísticas Sanitarias Mundiales. Recuperado a partir de www.who.int
- Paterson, D.L., Bonomo, R.A. (2005). Extended-spectrum betalactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews* 18: 657-686.
- Pérez, F., Endimiani, A., Hujer, K.M., Bonomo, R.A. (2007). The continuing challenge of ESBLs. *Current Opinion in Pharmacology* 7: 459-469.
- Pitton, J. S. (1972). Mechanisms Bacterial Resistance to Antibiotics. *Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie*, 65, 17-84. https://doi.org/10.1007/3-540-05814-1_2
- Promega. (2010). Wizard Genomic DNA Purification Kit Quick Protocol, FB022, 1123-1126.
- Rao, S. (2015). *Extended Spectrum Beta Lactamases- A Comprehensive Review*. Davangere.
- Rondon M., Rondon A. y Orence O. (2007) *Infección del tracto Urinario*, primera edición. Pg: 67 Extraído de: ([http://www.serbi.ula.ve/serbiula/librose/pva/Libros%20de%20PVA%20para%](http://www.serbi.ula.ve/serbiula/librose/pva/Libros%20de%20PVA%20para%20)

- 20libro%20digital/Infeccion%20Tracto%20urinario.pdf).
- Schwaber, M. J. y Carmeli, Y. (2007). Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(September), 913-920. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm318>
- Stoesser, N., Sheppard, A. E., Peirano, G., Sebra, R. P., Lynch, T., Anson, L. W., ... Pitout, D. (2016). First Report of bla IMP-14 on a Plasmid Harboring Multiple Drug Resistance Genes in Escherichia coli Sequence Type 131, 60(8), 5068-5071. <https://doi.org/10.1128/AAC.00840-16>. Address
- Takahashi, D., Shukla, S. K., Prakash, O. y Zhang, G. (2010). Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie* 92 (9): 1236-1241. doi:10.1016/j.biochi.2010.02.023.
- Tennessee.
- Torcato, I. M., Castanho, M. y Henriques, S. T. (2012). The Application of Biophysical Techniques to Study Antimicrobial Peptides. *Spectroscopy: An International Journal* 27 (5-6): 541-549. doi:10.1155/2012/460702.
- Tschudin-sutter, S., Lucet, J., Mutters, N. T., Tacconelli, E., Ralph, J. y Harbarth, S. (2017). Contact precautions for preventing nosocomial transmission of ESBL-producing Escherichia coli – a point / counterpoint review. *Clinical Infectious Diseases*, 1-22. <https://doi.org/10.1093/cid/cix258>
- Vargas, A. P., Pérez, Ó., Paredes, D. O. y Rivera, M. (2015). Caracterización molecular de péptidos antimicrobianos a partir de muestras de piel de Agalychnis spurrelli (Anura : Hylidae), 57-65.
- Vives, E. A., Medvedovsky, D. y Rot, R. (2004). Farmacología II. Inhibidores de la pared bacteriana, 1-36.
- Wiegand, I., Hilpert, K. y Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Publishing Group*, 3(2), 163-175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Zhang, H., Zhou, Y., Guo, S. y Chang, W. (2015). Prevalence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae isolated from rural well water in Taian, China, 2014. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(15), 11488-11492.

<https://doi.org/10.1007/s11356-015-4387-9>

Zurita, J. (2012). Resistencia Bacteriana en el Ecuador. Centro de Publicaciones PUCE. Quito, Ecuador.

11. FIGURAS

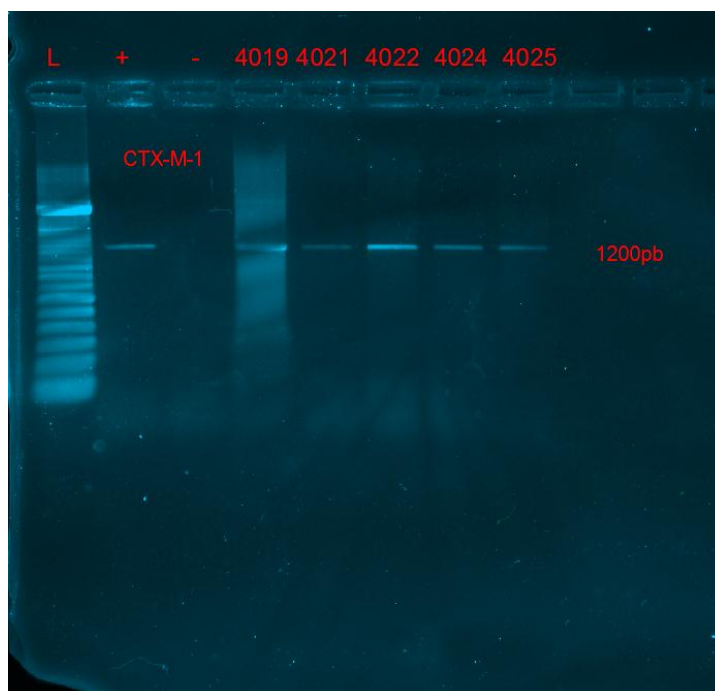


Figura 1. Registro de presencia de β -lactamasas tipo CTX-M-1. Resultados para la PCR con los primers de CTX-M-1 para las muestras de *E. coli* CB-QCA4019, CB-QCA4021, CB-QCA 4022, CB-QCA4024 y CB-QCA4025, con bandas de 1200 pb; L: ladder o marcador; +, control positivo; -, control negativo.

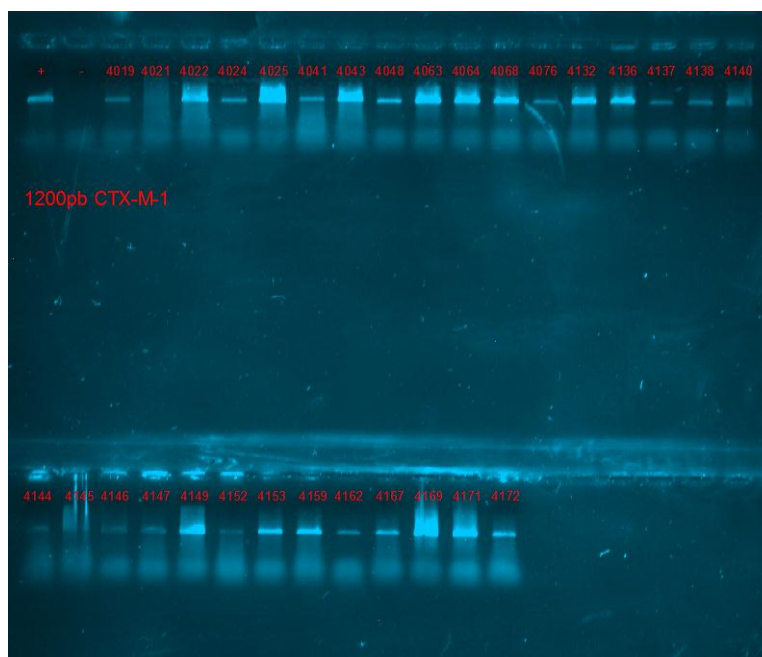


Figura 2. Muestras positivas para β -lactamasas tipo CTX-M-1. Bandas obtenidas de todas las cepas de *E. coli* que dieron positivo para la presencia del gen *bla*_{CTX-M-1}. Bandas de 1200 pb; +, control positivo; -, control negativo.

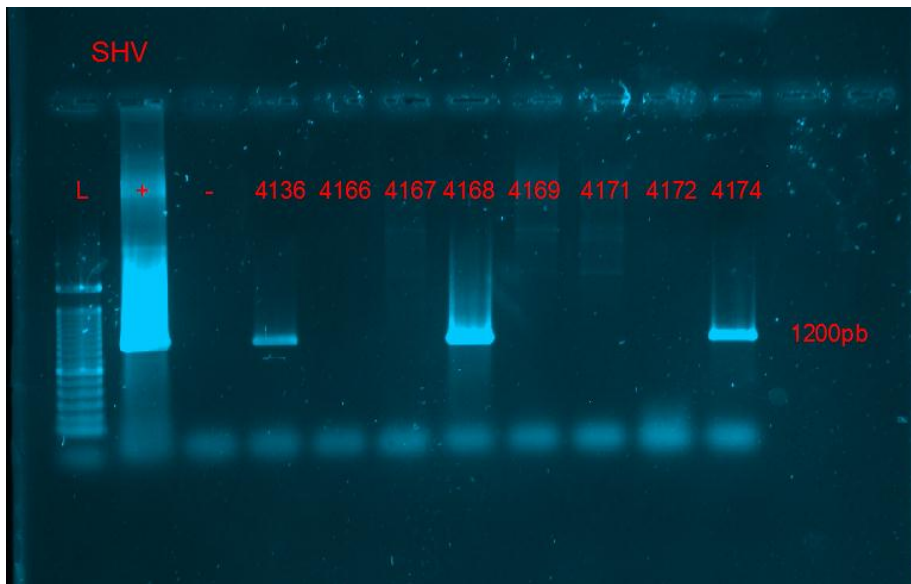


Figura 3. Muestras positivas para β -lactamasas tipo SHV. Bandas de las cepas de *E. coli* que dieron positivo para el gen *bla*_{SHV} los cuales fueron CB-QCA4136, CB-QCA4168 y CB-QCA4174 con un tamaño de 1200 pb; +, control positivo; -, control negativo; L, ladder o marcador.

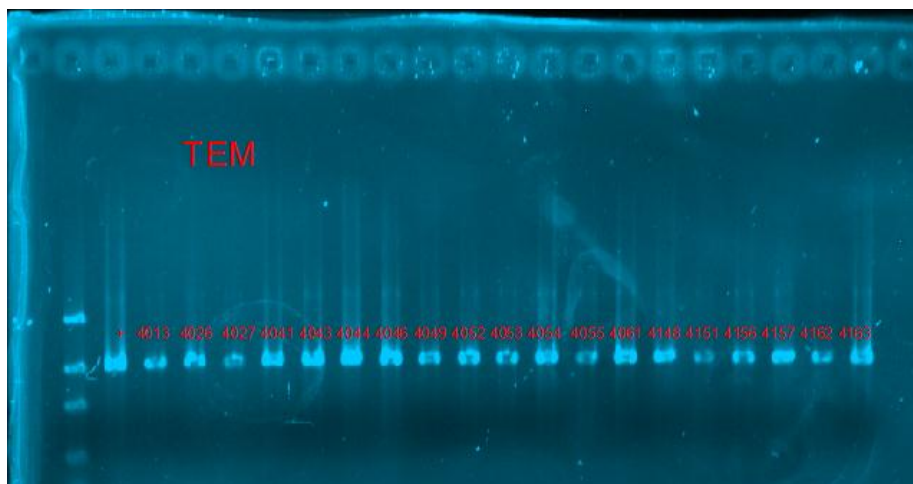


Figura 4. Muestras positivas para β -lactamasas tipo TEM. En esta figura se puede observar las bandas con ladder de concentración para las cepas positivas al gen *bla*_{TEM}.

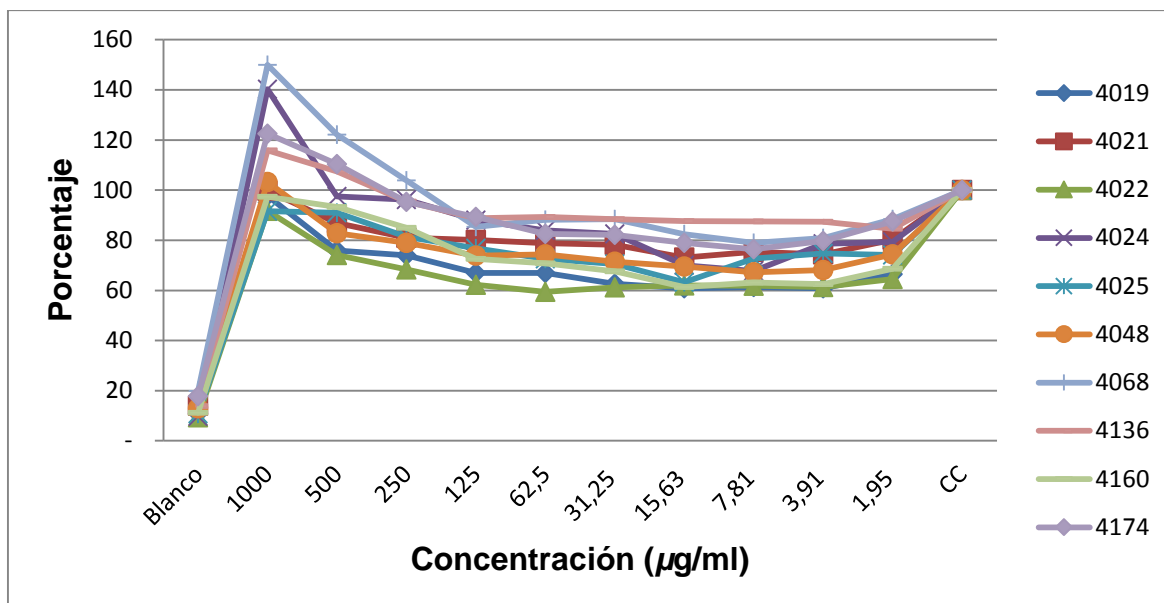


Figura 5. Porcentaje de inhibición bacteriana por péptidos de *B. rosenbergi*. Curva de crecimiento de las cepas de *E. coli* utilizadas en presencia del péptido de *B. rosenbergi*. en microdilución en caldo. En el eje “y” se puede observar porcentajes equivalentes a la turbidez comparada con el control de crecimiento. En el eje “x” se puede ver las concentraciones utilizadas en µg/ml; en la leyenda se encuentra el CB-QCA de las muestras de *E. coli* utilizadas para el ensayo y que están representadas en el gráfico.

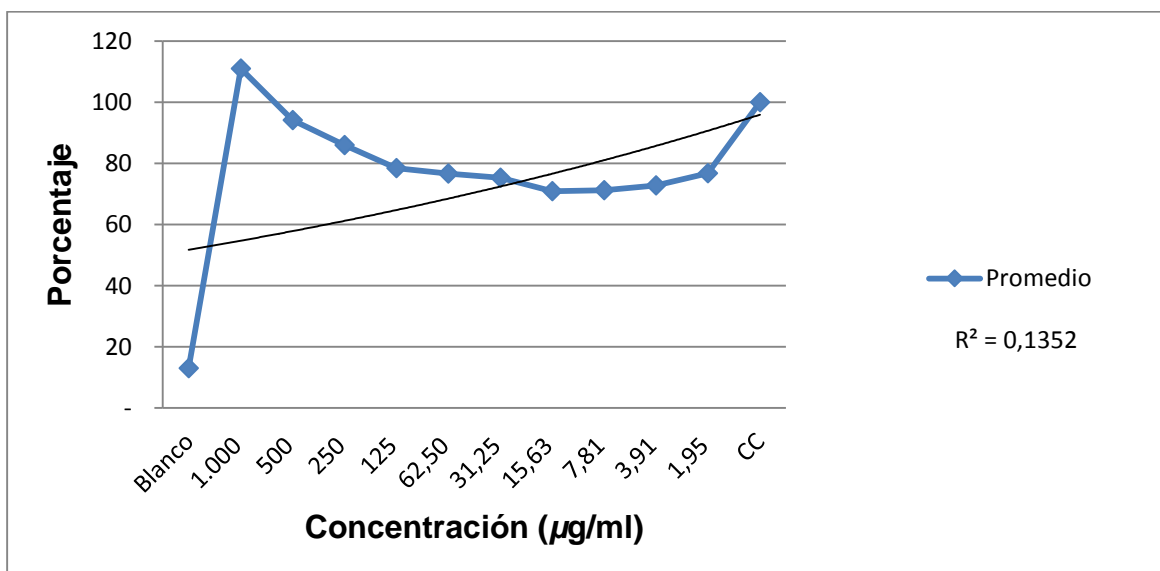


Figura 6. Promedio de porcentajes de inhibición bacteriana por péptidos de *B. rosenbergi*. Curva de crecimiento promedio de las cepas de *E. coli* utilizadas con el péptido de *B. rosenbergi*. En el eje “y” se puede observar porcentajes equivalentes a la turbidez comparada con el control de crecimiento. En el eje “x” se puede ver las concentraciones utilizadas en µg/ml; en la leyenda

se encuentra el nombre de la línea representada en el gráfico, que es el promedio de crecimiento de todas las cepas ensayadas. Se puede ver una curva exponencial, la curva nos indica un R^2 del 13,5% de ajuste de los puntos a la variable de crecimiento debido a la presencia del péptido, el valor bajo se debe a que no hubo inhibición por parte del péptido.



Figura 7. Porcentaje de inhibición bacteria por péptidos de *Rana* sp. Curva de crecimiento de las cepas de *E. coli* utilizadas en presencia del péptido de *Rana* sp. en microdilución en caldo. En el eje “y” se puede observar porcentajes equivalentes a la turbidez comparada con el control de crecimiento. En el eje “x” se puede ver las concentraciones utilizadas en $\mu\text{g/ml}$; en la leyenda se encuentra el CB-QCA de las muestras de *E. coli* utilizadas para el ensayo y que están representadas en el gráfico.

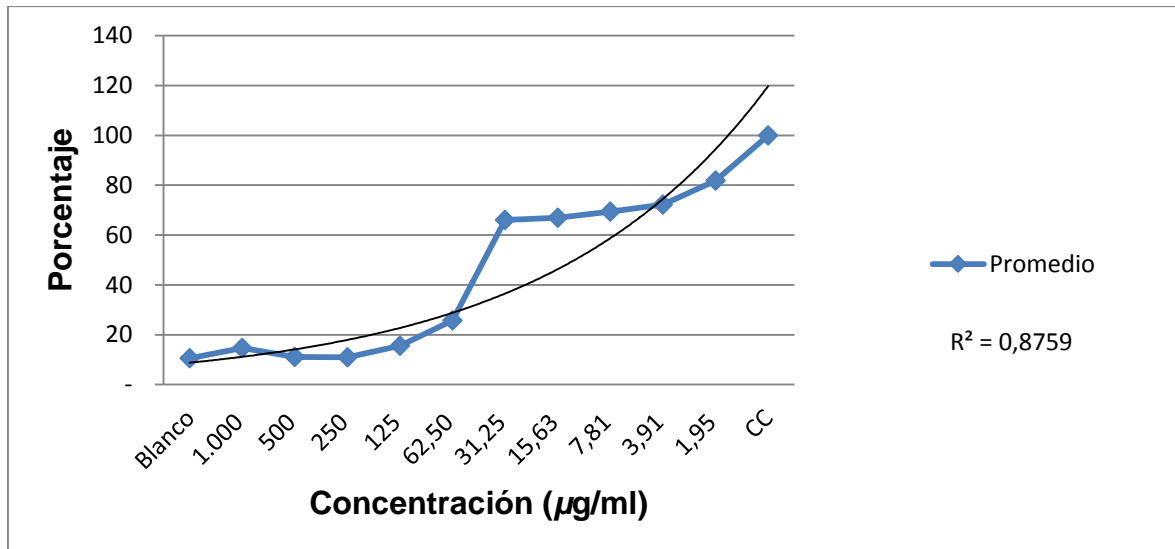


Figura 8. Promedio de porcentaje de inhibición bacteriana por péptidos de *Rana sp.* Curva de crecimiento promedio de las cepas de *E. coli* utilizadas con el péptido de *Rana sp.* En el eje “y” se puede observar porcentajes equivalentes a la turbidez comparada con el control de crecimiento. En el eje “x” se puede ver las concentraciones utilizadas en µg/ml; en la leyenda se encuentra el nombre de la línea representada en el gráfico, que es el promedio de crecimiento de todas las cepas ensayadas. Se puede ver una curva exponencial, la curva nos indica un R^2 del 87,6% de ajuste de los puntos a la variable de crecimiento debido a la presencia del péptido.

12. TABLAS

Tabla 1. Población de estudio identificada por MALDI-TOF

CÓDIGO	Fecha de colección	Sexo	Edad	Origen	Muestra	Identificación hospital	Identificación MALDI-TOF
CB-QCA 4012	29/7/2015	F	66	H	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4013	29/7/2015	F	49	H(EME)	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4014	29/7/2015	F	54	H(EME)	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4015	29/7/2015	F	69	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4016	29/7/2015	M	62	H(EME)	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4019	29/7/2015	F	5	CE	orina	<i>E. coli</i> BLEE	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4021	29/7/2015	F	26	H(EME)	orina	<i>E. coli</i> BLEE	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4022	29/7/2015	M	13	CE	orina	<i>E. coli</i> BLEE	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4024	29/7/2015	F	60	CE	orina	<i>E. coli</i> BLEE	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4025	29/7/2015	F	73	CE	orina	<i>E. coli</i> BLEE	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4026	29/7/2015	F	75	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4027	29/7/2015	F	47	H(EME)	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4041	3/8/2015	F	64	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4042	3/8/2015	F	74	CE	orina	<i>E. coli</i> BLEE	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4043	3/8/2015	F	42	CE	orina	<i>E. coli</i> BLEE	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4044	3/8/2015	F	81	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4045	3/8/2015	F	43	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4046	3/8/2015	F	77	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4047	3/8/2015	M	62	CE	orina	<i>E. coli</i> BLEE	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4048	3/8/2015	F	84	EME	orina	<i>E. coli</i> BLEE	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4049	3/8/2015	F	81	H	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4050	3/8/2015	M	69	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4051	3/8/2015	F	78	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4052	3/8/2015	F	70	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4053	3/8/2015	F	81	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4054	5/8/2015	F	72	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4055	5/8/2015	F	58	H	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>

**Tabla 1. Población de estudio identificada por MALDI-TOF
(Continuación...)**

CB-QCA 4061	12/8/2015	F	29	EME	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4062	12/8/2015	M	40	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4063	12/8/2015	F	62	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4064	12/8/2015	F	32	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4065	12/8/2015	M	65	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4066	12/8/2015	F	48	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4067	12/8/2015	F	25	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4068	12/8/2015	F	80	H	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4075	12/8/2015	F	76	H	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4076	12/8/2015	F	85	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4077	12/8/2015	F	65	H	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4130	17/8/2015	F	43	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4132	17/8/2015	F	68	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4133	17/8/2015	F	25	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4134	17/8/2015	M	92	H	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4136	17/8/2015	M	82	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4137	17/8/2015	F	32	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4138	17/8/2015	F	40	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4139	17/8/2015	F	77	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4140	19/8/2015	F	71	CE	orina	<i>E. coli</i> BLEE	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4144	19/8/2015	M	101	H	orina	<i>E. coli</i> BLEE	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4145	19/8/2015	F	19	H	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4146	19/8/2015	F	69	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4147	19/8/2015	F	29	H	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4148	19/8/2015	M	29	EME	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4149	19/8/2015	F	50	H	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4150	19/8/2015	F	53	EME	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4151	19/8/2015	F	69	EME	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>

Tabla 1. Población de estudio identificada por MALDI-TOF (Continuación)

CB-QCA 4152	24/8/2015	M	39	H	orina	<i>E. coli</i> BLEE	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4153	24/8/2015	F	59	CE	orina	<i>E. coli</i> BLEE	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4156	24/8/2015	F	59	CE	orina	<i>E. coli</i> BLEE	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4157	24/8/2015	F	76	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4159	24/8/2015	F	72	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4160	24/8/2015	M	69	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4162	24/8/2015	F	87	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4163	24/8/2015	F	55	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4166	24/8/2015	M	76	CE	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4167	24/8/2015	M	81	H	orina	<i>E. coli</i> BLEE	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4168	26/8/2015	F	84	UCI	orina	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4169	26/8/2015	M	78	CE	orina	<i>E. coli</i> BLEE	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4171	26/8/2015	F	55	CE	orina	<i>E. coli</i> BLEE	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4172	26/8/2015	F	4	CE	orina	<i>E. coli</i> BLEE	<i>E. coli</i>
CB-QCA 4174	26/8/2015	M	85	CE	orina	<i>E. coli</i> Amp-C	<i>E. coli</i>

En la tabla 1 se puede observar el código de la muestra en la base de datos (CB-QCA); la fecha de colección de cada una; el sexo, la edad y el lugar de hospitalización de los pacientes (CE, consulta externa; UCI, unidad de cuidado intensivo; H, hospital; EME, emergencias); el origen del cultivo, en este caso todos son de urocultivos; la identificación dada por el hospital y la identificación dada por MALDI-TOF.

Tabla 2. Sensibilidad antibiótica por VITEK® 2 (Continuación...)

CB-QCA 4061	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	-	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CB-QCA 4062	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	R	S	R	S	I	R	I	S	S
CB-QCA 4063	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	I	S	R	S	I	R	I	S	S
CB-QCA 4064	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	-	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S
CB-QCA 4065	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	-	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
CB-QCA 4066	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CB-QCA 4067	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4068	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4075	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CB-QCA 4076	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
CB-QCA 4077	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	-	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S
CB-QCA 4130	17/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	-	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S
CB-QCA 4132	17/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4133	17/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	-	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S
CB-QCA 4134	17/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4136	17/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	R	S	R	S	I	R	I	S	S
CB-QCA 4137	17/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4138	17/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4139	17/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	-	*	S	S	*	S	S	*	S	S	S
CB-QCA 4140	19/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	R	I	R	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4144	19/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	*	I	S	*	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4145	19/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	*	R	S	*	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4146	19/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	*	R	S	*	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4147	19/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4148	19/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	-	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S
CB-QCA 4149	19/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4150	19/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	-	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S
CB-QCA 4151	19/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	I	S	R	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4152	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S

Tabla 2. Sensibilidad antibiótica por VITEK® 2 (Continuación)

CB-QCA 4153	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S
CB-QCA 4156	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	I	S	R	S	I	R	I	S	S
CB-QCA 4157	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	-	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
CB-QCA 4159	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4160	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4162	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	I	S	R	I	R	R	I	S	S
CB-QCA 4163	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	-	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S
CB-QCA 4166	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	-	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S
CB-QCA 4167	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4168	26/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4169	26/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4171	26/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4172	26/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
CB-QCA 4174	26/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	+	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S

En la tabla 2 se puede observar el código de la base de datos (CB-QCA); la fecha de colección; el origen del cultivo de la muestra, en este caso urocultivos; la identificación de especie por MALTDI-TOF; el perfil BLEE dado por el VITEK 2 (+: positivo; -: negativo) y la sensibilidad antibiótica a ampicilina (10 µg) (AMP), ampicilina/sulbactam (10/10 µg) (SAM), piperacilina/tazobactam (100/10 µg) (PIP-TZ), cefazolina (30 µg) (CZO), cefotaxima (30 µg) (CTX) , ceftazidima (30 µg) (CAZ), ceftriaxona (30 µg) (CRO), cefepima (30 µg) (FEP), ertapenem (10 µg) (ETP) e imipenem (10 µg) (MEM) (R: resistente; S: susceptible; I: intermedio; *: sin fenotipo).

Tabla 3. Datos de antibiograma medidos desde las placas proporcionadas por el hospital

CÓDIGO	Fecha de colecta	Muestra	Identificación MALDI TOF	Resultados Antibiograma									BLEE
				DOX	AMP	CXM	SAM	FOX	CZO	AMC	CRO	ETP	
CB-QCA 4012	29/7/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	17	6	19	21	15	34	36	-
CB-QCA 4013	29/7/2015	orina	<i>E. coli</i>	23	6	27	17	25	21	21	37	37	-
CB-QCA 4014	29/7/2015	orina	<i>E. coli</i>	22	18	25	22	21	25	22	34	35	-
CB-QCA 4015	29/7/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	6	6	19	6	6	14	31	+
CB-QCA 4016	29/7/2015	orina	<i>E. coli</i>	20	6	18	6	17	21	6	33	33	-
CB-QCA 4019	29/7/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	6	6	24	6	13	10	31	+
CB-QCA 4021	29/7/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	6	6	23	6	14	14	32	+
CB-QCA 4022	29/7/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	6	6	17	6	11	6	30	+
CB-QCA 4024	29/7/2015	orina	<i>E. coli</i>	10	6	6	6	6	6	13	6	11	+
CB-QCA 4025	29/7/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	6	10	24	6	14	11	30	+
CB-QCA 4026	29/7/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	28	19	26	24	22	36	34	-
CB-QCA 4027	29/7/2015	orina	<i>E. coli</i>	11	23	22	14	19	20	19	35	35	-
CB-QCA 4041	3/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	11	6	6	15	23	6	19	15	33	+
CB-QCA 4042	3/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	14	27	20	27	25	23	35	34	-
CB-QCA 4043	3/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	6	12	22	26	19	14	33	+
CB-QCA 4044	3/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	23	6	25	18	24	24	23	35	36	-
CB-QCA 4045	3/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	25	23	26	23	28	28	25	35	35	-
CB-QCA 4046	3/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	10	6	26	16	20	20	20	36	36	-
CB-QCA 4047	3/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	10	6	6	6	25	6	6	6	31	+
CB-QCA 4048	3/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	20	6	6	6	20	6	6	6	29	+
CB-QCA 4049	3/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	19	6	19	6	12	35	30	-
CB-QCA 4050	3/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	18	6	22	20	14	32	34	-
CB-QCA 4051	3/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	10	17	22	22	19	20	22	33	34	-
CB-QCA 4052	3/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	28	10	25	21	22	38	35	-
CB-QCA 4053	3/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	24	11	24	20	18	32	35	-
CB-QCA 4054	5/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	23	6	24	10	27	16	14	33	34	-

Tabla 3. Datos de antibiograma medidos desde las placas proporcionadas por el hospital (Continuación...)

CB-QCA 4055	5/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	26	17	27	22	20	33	33	-
CB-QCA 4061	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	22	6	18	13	26	21	20	33	30	-
CB-QCA 4062	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	6	6	23	6	6	18	32	+
CB-QCA 4063	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	24	6	6	21	27	6	22	10	29	+
CB-QCA 4064	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	11	6	6	6	23	6	6	6	30	-
CB-QCA 4065	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	16	6	23	14	12	30	30	-
CB-QCA 4066	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	23	10	24	20	17	34	30	-
CB-QCA 4067	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	23	6	6	10	20	6	19	6	33	+
CB-QCA 4068	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	22	6	19	6	25	19	13	34	35	+
CB-QCA 4075	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	10	19	21	20	21	24	22	35	35	-
CB-QCA 4076	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	6	6	12	6	11	6	28	+
CB-QCA 4077	12/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	10	6	22	11	23	18	19	32	32	-
CB-QCA 4130	17/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	25	11	26	22	23	36	34	-
CB-QCA 4132	17/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	6	6	23	12	13	11	32	+
CB-QCA 4133	17/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	24	11	23	10	20	34	36	-
CB-QCA 4134	17/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	13	6	6	18	21	35	35	+
CB-QCA 4136	17/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	16	6	6	6	19	6	12	10	28	+
CB-QCA 4137	17/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	6	6	19	6	11	6	29	+
CB-QCA 4138	17/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	21	6	6	13	21	6	17	11	33	+
CB-QCA 4139	17/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	28	17	25	23	22	34	33	-
CB-QCA 4140	19/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	6	10	24	6	17	10	31	+
CB-QCA 4144	19/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	6	10	24	6	17	10	26	+
CB-QCA 4145	19/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	10	6	6	6	22	6	6	6	30	+
CB-QCA 4146	19/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	11	6	6	6	23	6	11	6	28	+
CB-QCA 4147	19/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	6	6	23	6	6	6	28	+
CB-QCA 4148	19/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	18	12	18	20	17	30	32	-
CB-QCA 4149	19/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	21	6	6	10	23	6	13	6	29	+
CB-QCA 4150	19/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	11	6	24	16	25	17	18	33	36	-
CB-QCA 4151	19/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	6	14	13	6	20	10	31	+

Tabla 3. Datos de antibiograma medidos desde las placas proporcionadas por el hospital (Continuación)

CB-QCA 4152	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	12	6	6	15	19	6	12	6	28	+
CB-QCA 4153	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	6	6	6	6	12	6	18	+
CB-QCA 4156	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	6	11	25	6	17	6	31	+
CB-QCA 4157	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	21	6	23	11	11	32	34	-
CB-QCA 4159	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	6	6	13	6	13	10	31	+
CB-QCA 4160	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	11	6	6	6	24	6	13	6	30	+
CB-QCA 4162	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	11	6	6	6	6	6	12	6	20	+
CB-QCA 4163	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	22	12	24	14	13	31	33	-
CB-QCA 4166	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	18	12	22	21	19	30	33	-
CB-QCA 4167	24/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	16	6	6	11	19	6	12	6	31	+
CB-QCA 4168	26/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	6	6	6	6	17	6	18	6	26	+
CB-QCA 4169	26/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	12	6	6	6	24	6	15	6	35	+
CB-QCA 4171	26/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	10	6	6	6	21	6	12	10	30	+
CB-QCA 4172	26/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	10	6	6	6	24	6	11	6	31	+
CB-QCA 4174	26/8/2015	orina	<i>E. coli</i>	18	6	15	6	6	6	14	29	26	+

En la tabla 3 se puede observar el código de la muestra en la base de datos; la fecha de colección; el origen del cultivo, en este caso urocultivos; la identificación de especie por MALDI-TOF; los resultados de las mediciones de las placas de antibiograma, donde: doxicilina (10 µg) (DOX), ampicilina (10 µg) (AMP), cefuroxima (30 µg) (CXM), ampicilina/sulbactam (10/10 µg) (SAM), cefoxitina (30 µg) (FOX), cefazolina (30 µg) (CZO), ceftriaxona (30 µg) (CRO), ertapenem (10 µg) (ETP) y amoxicilina/ácido clavulánico (10/10 µg) (AMC) y el fenotipo BLEE observado en las placas (+: positivo; -:negativo).

Tabla 4. Primers utilizados para PCR

Gen	Secuencia	Temperatura °C	Pb	Referencias
<i>bla_{CTX-M-1}</i>	F: CTATGGATCCATTTTGTAAATAATGT R: CTATGGATCCGAACAGGAACCACGGA	55°	1200	(Cartelle, 2005)
<i>bla_{CTX-M-15}</i>	F: ATAAAACCGGCAGCGGTG R: GAATTTTGACGATCGGGG	54°	483	(Blanco et al., 2013)
<i>bla_{SHV}</i>	F: TGGTTATCGGTTATATTCGCC R: GGTTAGCGTTGCCAGTGCT	55°	862	(Kiratisin et al., 2008)
<i>bla_{TEM}</i>	F: TTCTTGAAGACGAAAGGGC R: ACGCTCAGTGGAACGAAAAC	58,5°	1210	(Hayakawa et al., 2013)

En la tabla 4 se puede observar en la primera columna el gen blanco al que se van a unir los primers; en la segunda columna, la secuencia del primer forward y reverse; en tercera columna la temperatura de annealing de cada primer; en la cuarta columna el tamaño del fragmento final en pares de bases (pb) y en la quinta columna la referencia de donde se obtuvo cada primer.

Tabla 5. Perfil fenotípico de población de *E. coli* después de PCR

CB-QCA	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	BLEE	CB-QCA	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	BLEE
4012					-	4075					-
4013				*	-	4076					+
4014					-	4077					-
4015		*			+	4130					-
4016					-	4132	*	*			+
4019	*	*			+	4133					-
4021	*	*			+	4134					+
4022	*	*			+	4136	*	*	*		+
4024	*	*			+	4137	*	*			+
4025	*	*			+	4138	*	*			+
4026				*	-	4139					-
4027				*	-	4140	*	*			+
4041	*			*	+	4144	*	*			+
4042					-	4145	*	*			+
4043	*	*		*	+	4146	*	*			+
4044				*	-	4147	*				+
4045					-	4148				*	-
4046				*	-	4149	*	*			+
4047		*			+	4150					-
4048	*	*			+	4151		*		*	+
4049				*	-	4152	*				+
4050					-	4153	*	*			+
4051					-	4156				*	+
4052				*	-	4157				*	-
4053				*	-	4159	*	*			+
4054				*	-	4160		*			+
4055				*	-	4162	*			*	+
4061				*	-	4163				*	-
4062					+	4166					-
4063	*	*			+	4167	*	*			+
4064	*	*			-	4168			*		+
4065					-	4169	*	*			+
4066					-	4171	*				+
4067					+	4172	*				+
4068	*	*			+	4174			*		+

En la tabla 5 se puede observar el código de la muestra en la base de datos (CB-QCA); los genes BLEE analizados, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}; *, presencia del gen de resistencia en la muestra y el fenotipo BLEE obtenido previamente por VITEK 2 (+: positivo; -: negativo).

Tabla 6. Resultados se secuenciamiento primer CTX-M-1

CB-QCA	CTX-M-1	CTX-M-15/28
4015	-	*
4019	∅	*
4021	∅	*
4022	CTX-M-15	*
4024	∅	*
4025	CTX-M-15	*
4041	CTX-M-15	-
4043	CTX-M-15	*
4047	-	*
4048	CTX-M-15	*
4063	CTX-M-15	*
4064	CTX-M-15	*
4068	CTX-M-15	*
4132	∅	*
4136	CTX-M-15	*
4137	CTX-M-15	*
4138	CTX-M-15	*
4140	∅	*
4144	CTX-M-15	*
4145	CTX-M-15	*
4146	CTX-M-15	*
4147	CTX-M-15	-
4149	CTX-M-15	*
4151	-	*
4152	CTX-M-15	-
4156	∅	*
4157	∅	*
4162	CTX-M-15	*
4163	∅	-
4167	CTX-M-15	*
4169	∅	*
4171	CTX-M-15	-
4172	CTX-M-15	-

En esta tabla se puede observar los resultados para el primer de grupo CTX-M-1 y el primer CTX-M-15/28. (∅) no se pudo analizar la secuencia por falta de calidad; (-) la muestra dio negativa a ese primer; (*) la muestra dio positiva al primer CTX-M-15/28 es decir dio positiva para el alelo de la β -lactamasa CTX-M-15.

Tabla 7. Resultados de secuenciamiento primer TEM

CB-QCA	TEM
4013	TEM-1
4026	TEM-1
4027	TEM-1
4041	TEM-1
4043	TEM-1
4044	TEM-1
4046	TEM-1
4049	TEM-1
4052	TEM-1
4053	TEM-1
4054	TEM-1
4055	TEM-1
4061	TEM-1
4148	TEM-1
4151	TEM-1
4156	TEM-214
4157	TEM-1
4162	TEM-1
4163	TEM-1

En esta tabla se puede observar los alelos obtenidos con el uso del primer TEM para cada muestra con CB-QCA, después del secuenciamiento y el análisis de los amplicones de PCR obtenidos se obtuvo los alelos TEM-1 y TEM-214.

Tabla 8. Perfil genotípico y fenotípico de la población usada en microdiluciones

CB-QCA	CTX-M-1	CTX-M-15	SHV	BLEE
4019	*	*		+
4021	*	*		+
4022	*	*		+
4024	*	*		+
4025	*	*		+
4048	*	*		+
4068	*	*		+
4136	*	*	*	+
4160		*		+
4174			*	+

En esta tabla se puede observar el perfil genotípico y fenotípico de las bacterias *E. coli* utilizadas para el ensayo de microdiluciones con péptidos de *Rana* sp. y *B. rosenbergi*; *, presencia de la enzima β -lactamasa, CTX-M-1, CTX-M-15, SHV; +, presencia de fenotipo BLEE.

Tabla 9. Concentración Mínima Inhibitoria de *B. rosenbergi*

CB-QCA	1000 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$	125 $\mu\text{g/ml}$	62,5 $\mu\text{g/ml}$	31,25 $\mu\text{g/ml}$	15,63 $\mu\text{g/ml}$	7,81 $\mu\text{g/ml}$	3,91 $\mu\text{g/ml}$	1,95 $\mu\text{g/ml}$
4019	97,79	75,92	73,97	66,97	66,94	62,68	60,89	61,36	60,78	66,51
4021	99,82	86,92	81,03	80,11	78,84	78,17	73,03	75,39	74,40	80,18
4022	91,68	74,05	68,34	62,29	59,37	61,22	61,98	61,87	61,36	64,48
4024	140,24	97,46	96,23	87,97	83,99	82,55	70,01	67,77	78,57	79,37
4025	91,55	90,95	81,38	76,78	72,53	70,59	63,22	72,73	74,80	74,11
4048	103,22	82,81	79,02	73,83	74,39	71,42	69,47	67,16	68,13	74,42
4068	149,98	122,10	103,92	85,41	88,11	88,44	82,38	79,02	80,89	88,44
4136	115,81	107,40	95,42	88,83	89,36	88,46	87,67	87,47	87,40	84,64
4160	97,32	93,22	84,91	72,61	70,74	67,55	61,28	63,18	62,49	68,64
4174	122,45	110,36	95,33	89,34	82,60	82,16	78,93	76,38	79,74	87,53
Promedio	110,98	94,12	85,96	78,41	76,69	75,32	70,89	71,23	72,85	76,83

En esta tabla se puede observar los porcentajes de inhibición de crecimiento de cada muestra (CB-QCA) a cada concentración utilizada en $\mu\text{g/ml}$, comparando con el control de crecimiento de *B. rosenbergi*. y el promedio de cada columna a cada concentración.

Tabla 10. Concentración Mínima Inhibitoria de *Rana* sp.

CB-QCA	1000 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$	125 $\mu\text{g/ml}$	62,5 $\mu\text{g/ml}$	31,25 $\mu\text{g/ml}$	15,63 $\mu\text{g/ml}$	7,81 $\mu\text{g/ml}$	3,91 $\mu\text{g/ml}$	1,95 $\mu\text{g/ml}$
4019	9,47	7,82	7,17	7,00	11,11	58,41	60,25	60,47	64,84	71,82
4021	11,90	9,77	9,05	8,61	8,78	67,31	65,68	70,18	67,28	79,04
4022	12,48	9,74	8,88	8,45	25,54	80,96	76,57	79,21	86,27	89,41
4024	13,49	10,99	9,26	9,30	13,31	71,75	68,47	75,65	73,30	83,06
4025	14,24	10,39	9,01	9,04	23,97	64,02	65,04	70,13	67,44	76,98
4048	13,00	9,37	7,81	7,66	7,52	47,89	60,86	59,48	67,82	73,30
4068	21,57	14,93	12,86	12,81	19,98	70,10	75,04	73,25	78,75	90,32
4136	16,91	13,10	24,77	73,57	77,91	77,80	76,61	82,25	82,05	101,36
4160	12,97	10,38	8,40	7,95	7,76	58,74	58,14	57,75	57,60	69,13
4174	21,18	14,45	11,92	10,88	61,79	64,13	63,13	66,13	76,45	84,43
Promedio	14,72	11,09	10,91	15,53	25,77	66,11	66,98	69,45	72,18	81,88

En esta tabla se puede observar los porcentajes de inhibición de crecimiento de cada muestra (CB-QCA) a cada concentración utilizada en $\mu\text{g/ml}$, comparando con el control de crecimiento de *Rana* sp. y el promedio de cada columna a cada concentración.

Tabla 11. Rangos y Medias Geométricas de *B. rosenbergi*

CB-QCA	Rango	MG
4019	1000-1,95	0,69
4021	1000-1,95	0,80
4022	1000-1,95	0,66
4024	1000-1,95	0,87
4025	1000-1,95	0,76
4048	1000-1,95	0,76
4068	1000-1,95	0,95
4136	1000-1,95	0,93
4160	1000-1,95	0,73
4174	1000-1,95	0,89

En esta tabla se puede observar el rango entre 1000 y 1,95 $\mu\text{g/ml}$ y las medias geométricas (MG) para cada muestra, lo que equivale a las tasas de crecimiento de cada cepa *E. coli* (CB-QCA) para el péptido de *B. rosenbergi*.

Tabla 12. Rangos y Medias Geométricas de *Rana sp.*

CB-QCA	Rango	MG
4019	1000-1,95	0,23
4021	1000-1,95	0,26
4022	1000-1,95	0,31
4024	1000-1,95	0,29
4025	1000-1,95	0,29
4048	1000-1,95	0,23
4068	1000-1,95	0,35
4136	1000-1,95	0,51
4160	1000-1,95	0,24
4174	1000-1,95	0,37

En esta tabla se puede observar el rango entre 1000 y 1,95 $\mu\text{g/ml}$ y las medias geométricas (MG) para cada muestra, lo que equivale a las tasas de crecimiento de cada cepa *E. coli* (CB-QCA) para el péptido de *Rana sp.*

Tabla 13. Número de cepas inhibidas y porcentajes acumulados

Concentración	<i>Rana sp.</i>		<i>B. rosenbergi</i>	
	No. de cepas inhibidas	Porcentajes acumulativos	No. de cepas inhibidas	Porcentajes acumulativos
1000 $\mu\text{g/ml}$	10 (22,7)	100	-	-
500 $\mu\text{g/ml}$	10 (22,7)	77,3	-	-
250 $\mu\text{g/ml}$	10 (22,7)	54,5	-	-
125 $\mu\text{g/ml}$	9 (20,5)	31,8	-	-
62,5 $\mu\text{g/ml}$	5 (11,4)	11,4	-	-
31,25 $\mu\text{g/ml}$	-	-	-	-
15,63 $\mu\text{g/ml}$	-	-	-	-
7,81 $\mu\text{g/ml}$	-	-	-	-
3,91 $\mu\text{g/ml}$	-	-	-	-
1,95 $\mu\text{g/ml}$	-	-	-	-

En esta tabla se puede observar el número de cepas inhibidas para cada concentración y los porcentajes acumulados, el guion significa que no hubo inhibición (-). La CMI₉₀ es 500 $\mu\text{g/ml}$ y la CMI₅₀ es 250 $\mu\text{g/ml}$.

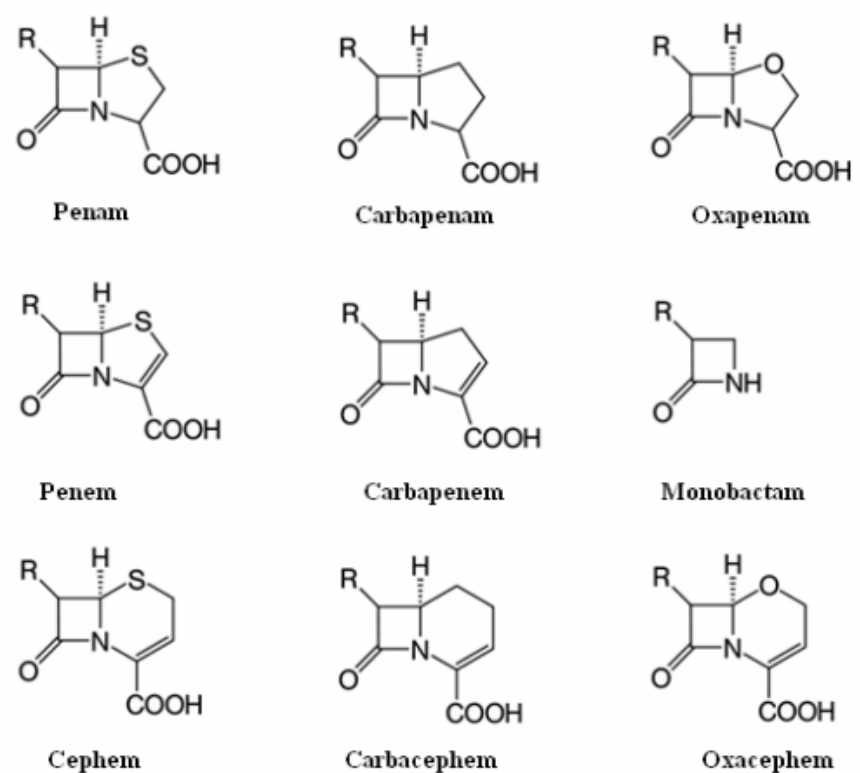
Tabla 14. Serie de Campo de los individuos de cada especie

Especie	Serie de Campo
<i>B. rosenbergi</i>	57694
	26706
<i>Rana sp.</i>	27141

En esta tabla se puede observar la serie de campo de los individuos de los cuales se originaron los péptidos utilizados durante las microdiluciones en caldo. Las series de campo son de la base de datos del Laboratorio de Citogenética dirigido por Mtr. Myrian Rivera.

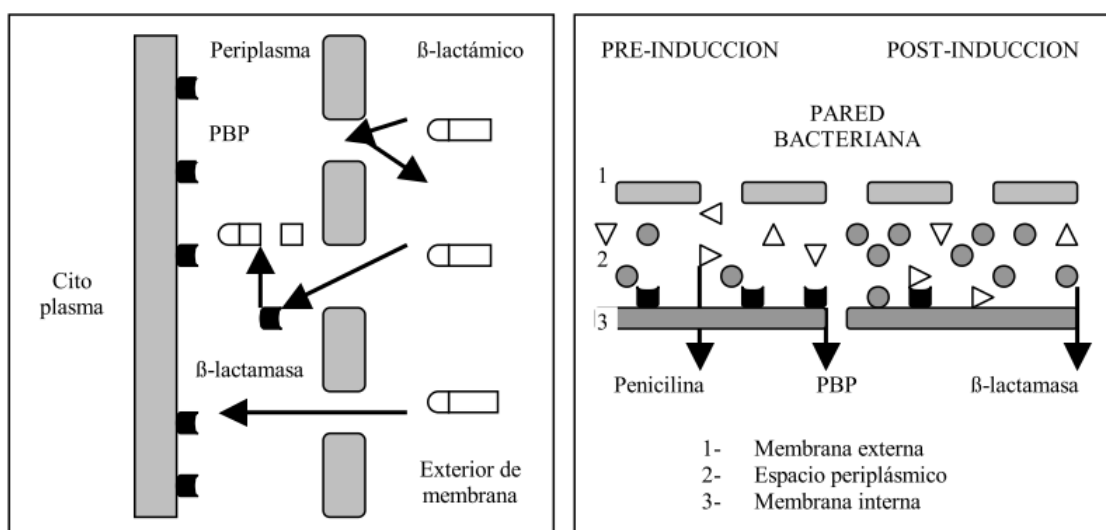
13. ANEXOS

Anexo 1. Estructura química de antibióticos β -lactámicos



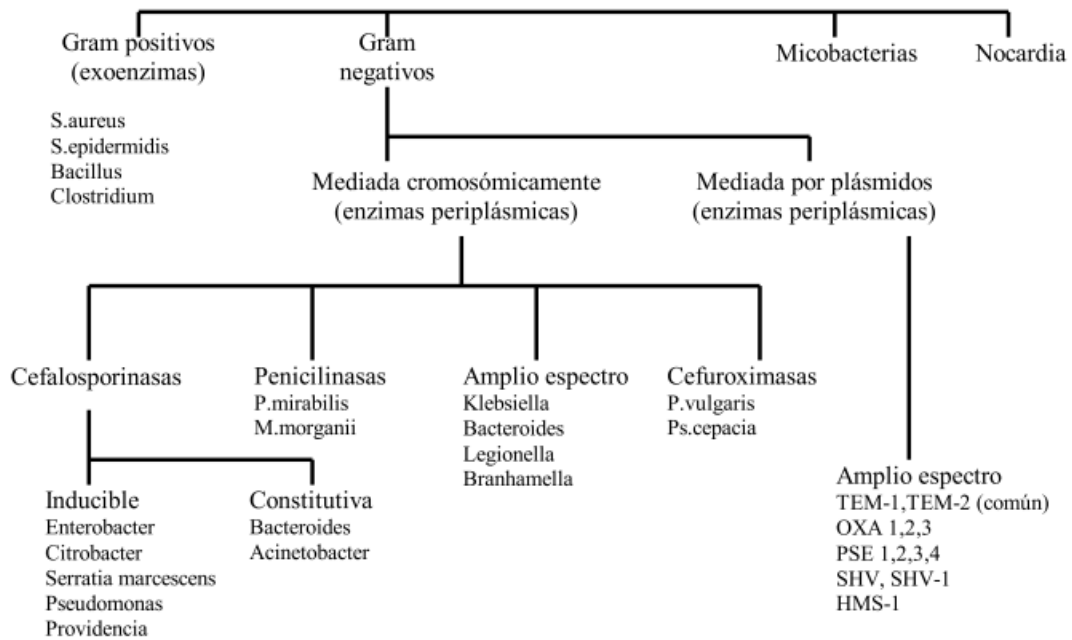
En este anexo se puede ver la estructura química de los antibióticos β -lactámicos (Rao, 2015).

Anexo 2. Acción de antibióticos β -lactámicos



En este anexo se puede ver la forma de acción de los antibióticos β -lactámicos en la pared de las bacterias (Rao, 2015).

Anexo 3. Resistencia a antibióticos β -lactámicos



En este anexo se puede observar el tipo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos (Rao, 2015).