PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Genotipaje de la resistencia a antimicrobianos en bacterias entéricas productoras de carbapenemasas y pruebas de inhibición con secreciones peptídicas de anfibios nativos

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Biológicas

Camila Cilveti Rodríguez Riglos

Quito, 2013

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por el apoyo constante y el excelente ejemplo de vida que son, por enseñarme todos los días cómo ser mejor persona y ver siempre las cosas desde una perspectiva espiritual. A mi mamá y mi hermana por ser, además, mis mejores amigas. A Ricardo Jaramillo por ser siempre mi fuerza, mi impulso y mi paz.

Agradezco a la Dra. Iliana Alcocer por darme la oportunidad de realizar este trabajo y apoyarme incondicionalmente, dándome el ejemplo de no sólo una gran profesional sino de una gran persona. A la Dra. Jeannete Zurita por la colaboración brindada a todo el equipo del Laboratorio de Microbiología.

A la Mtr. Miryan Rivera por abrirme las puertas de su laboratorio y enseñarme todo lo necesario tanto profesional como personalmente para poder crecer en todos los ámbitos de mi vida.

A la Lcda. María Fernanda Yauri por darme todo el apoyo y la ayuda necesaria para lograr este estudio y por ser un ejemplo de buena persona. A todos los miembros del Laboratorio de Microbiología por abrirme las puertas, generar siempre el mejor ambiente de trabajo y por su amistad incondicional.

Al Dr. Andrés Merino y a todo el personal de la Balsa de los Sapos por darme la oportunidad de trabajar con anfibios tan especiales como *Atelopus elegans*. Al Ingeniero Julio Sánchez por su guía y ayuda en la parte estadística de este estudio. Al Dr. Pablo Pozo por su ayuda y sabiduría compartida. Al CIEI por colaborar en la parte metodológica de este estudio. A la PUCE por su apoyo financiero en este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

1 RESUMEN 9

2 ABSTRACT 10

3 INTRODUCCIÓN 11

3.1 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA 11

3.2 CARBAPENEMES 13

3.3 BETALACTAMASAS 15

3.3.1 BETALACTAMASAS CLASE A 16

3.3.2 BETALACTAMASAS CLASE B 19

3.3.3 BETALACTAMASAS CLASE C 19

3.3.4 BETALACTAMASAS CLASE D 20

3.4 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS 20

3.4.1 MODELO DE BARRENO O “BARREL STAVE” 23

3.4.2 MODELO DE ALFOMBRA O “CARPET MODEL” 25

3.4.3 MODELO DE CANAL AGREGADO 26

3.5 OBJETIVOS 27

3.5.1 OBJETIVO GENERAL 27

3.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 28

4 METODOLOGÍA 29

4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO 29

4.2 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS 30

4.3 DETECCIÓN MOLECULAR DE LA PRESENCIA DE LOS GENES 31

4.4 EXTRACCIÓN DE LA SECRECIÓN PEPTÍDICA DE *Atelopus elegans* . 32

4.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE *Atelopus elegans* 33

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 34

5 RESULTADOS 35

5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO 35

5.2 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS 38

5.3 DETECCIÓN MOLECULAR DE LA PRESENCIA DE LOS GENES 39

5.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA 50 (CIM-50) DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE *Atelopus elegans* 40

6 DISCUSIÓN 43

7 CONCLUSIONES 50

8 LITERATURA CITADA 52

9 FIGURAS 61

10 TABLAS 78

11 ANEXOS 89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Secuencia de pasos para la prueba del Test Modificado de Hodge (MHT)……..……..62

Figura 2. Anfibio perteneciente a la especie *Atelopus elegans*……..…63

Figura 3. Recolección de secreción peptídica de *Atelopus elegans*……64

Figura 4. Caja Petri con la colección de secreción peptídica de *Atelopus elegans*……...65

Figura 5. Placa de ELISA utilizada en los ensayos de inhibición peptídica……66

Figura 6. Porcentajes del origen de los aislados clínicos resistentes a carbapenemes…….....67

Figura 7. Porcentaje de origen de los aislados según el género……..68

Figura 8. Porcentaje de origen de los aislados según las edades de los pacientes……69

Figura 9. Placa de MHT positivo para la cepa analizada……...70

Figura 10. Gel representativo de la detección de los genes *bla*$_{GES}$ y *bla*$_{KPC}$ en los aislados clínicos……..…71

Figura 11. Gel representativo de la detección de los genes *bla*$_{VIM}$ y *bla*$_{IMP}$ en los aislados clínicos……..…72

Figura 12 Frecuencia en la presencia de genes codificantes para betalactamasas en los aislados hospitalarios analizados entre noviembre de 2009 a mayo de 2012…….....73

Figura 13. Porcentaje de aislados hospitalarios resistentes a carbapenemes por especie.……...74

Figura 14. Porcentaje de muerte de bacterias de la especie *Serratia marcescens* frente al péptido antimicrobiano de *Atelopus elegans*…….75

Figura 15. Porcentaje de muerte de bacterias de la especie *Klebsiella pneumoniae* frente al péptido antimicrobiano de *Atelopus elegans*……..……75

Figura 16. Porcentaje de muerte de bacterias frente al péptido antimicrobiano de *Atelopus elegans*……76

Figura 17. Figura representativa de la Concentración Inhibitoria Mínima 50 para las especies analizadas……..……...77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Datos de origen de los aislados clínicos analizados……...79

Tabla 2. Primers utilizados para la detección de los genes……...81

Tabla 3. Programas de amplificación utilizados para la identificación genotípica de los genes analizados……82

Tabla 4. Número de individuos se *Atelpus elegans* utilizados para la extracción de secreciones……...83

Tabla 5. Porcentaje de aislados hospitalarios pertenecientes a las diferentes especies analizadas……84

Tabla 6. Resultados bioquímicos característicos de las diferentes especies bacterianas analizadas……..……..85

Tabla 7. Presencia y ausencia de los genes *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{GES}$, *bla*$_{VIM}$ y *bla*$_{IMP}$……86

Tabla 8. Valores promedio de mortalidad bacteriana de *Klebsiella pneumoniae* (22 aislados) y de *Serratia marcescens* (28 aislados) frente a las secreciones peptídicas de *Atelopus elegans*……88

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Estructuras principales de los péptidos antimicrobianos (AMPs)……90

Anexo 2. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos con el modelo de barreno…….91

Anexo 3. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos con el modelo tipo alfombra…….92

Anexo 4. Blancos intracelulares de los péptidos antimicrobianos……93

Anexo 5. ANOVA de un factor de los datos obtenidos……...94

Anexo 6. Análisis descriptivo del ANOVA de un factor de los datos obtenidos……...94

Anexo 7. Promedio +/-1 desviación estándar de la sensibilidad de tres especies de bacterias ante el péptido de *Atelopus elegans*……...95

1 RESUMEN

La aparición de la resistencia bacteriana ha sido motivo constante de preocupación, ya que en las últimas dos décadas ha aumentado significativamente; especialmente la relacionada a los betalactámicos. Las betalactamasas constituyen el mayor mecanismo de defensa en contra de drogas en anillos betalactámicos. El objetivo de este estudio fue analizar la inhibición a los carbapenemes en aislados clínicos provenientes de Hospitales del Ecuador con secreciones peptídicas de *Atelopus elegans* y la identificación genotípica de los principales genes que confieren resistencia a los carbapenemes. La población de estudio incluye únicamente a aquellos resistentes a carbapenemes entre los años 2009 y 2012. De los 58 aislados analizados, 91,4% presentaron el gen bla_{KPC}, 8,6% el gen bla_{GES}, 6,9% el gen bla_{VIM} y 1,7% presentó el gen bla_{IMP}. En las pruebas de inhibición peptídica se vio que todos los aislados son inhibidos por péptido, la concentración inhibitoria mínima necesaria para matar al 50% de las bacterias fue de 250,0 µg/ml para *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes* y *E. cloaceae*, seguido de *Morganella morganii* con una concentración de 125,0 µg/ml, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* y *Serratia rubidea* con un valor de 62,5 µg/ml y finalmente *Escherichia coli* con una concentración inhibitoria mínima de 31,3 µg/ml. La prevalencia de enzimas tanto tipo serin betalactamasas como metalo betalactamasas es relativamente baja en Latinoamérica, sin embargo la presencia de sus genes en elementos móviles facilita su propagación a otras bacterias. Por esta razón la importancia de analizar nuevos compuestos con actividad antimicrobiana.

Palabras clave: carbapenemes, resistencia bacteriana, betalactamasas, secreciones peptídicas, concentración inhibitoria mínima.

2 ABSTRACT

The bacterial resistance appearance has been a major concern, since in the last two decades there has been a significant increase of resistance, specially related to betalacmic antibiotics. The betalactamases are the primary defense mechanism against betalactamic drugs. The main objective of this study was to analyze the genotypic profile of the carbapenem resistance of clinical isolates and their possible inhibition with peptidic secretions of *Atelopus elegans.* The study subjects includes only the carbapenem resistant isolates between the years of 2009 and 2012. Out of the 58 analyzed isolates, 91,4% presents the bla_{KPC} gene, 8,6% the bla_{GES} gene, 6,9% the bla_{VIM} gene and 1,7% presented the bla_{IMP} gene. The peptidic inhibition test, showed that every isolate were inhibited by the peptide, with a highest peptide concentration necessary to kill at least 50% of the bacteria of 250,00 µg/ml for *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes* and *E. cloaceae*, followed by *Morganella morganii* with a concentration of 125,0 µg/ml, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* and *Serratia rubidea* with a value of 62,5 µg/ml and finally *Escherichia coli* with a minimal inhibitory concentration of 31,3 µg/ml. The prevalence of serin betalactamases and metalo betalactamases enzymes is relatively low in Latin-America, although the presence of their genes on mobile elements facilitates their propagation to other bacteria. This is way is very important to analyze new compounds with antimicrobial activity.

Key words: carbapenemes, bacterial resistance, betalactamases, peptide secretions, minimal inhibitory concentration.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

La resistencia antimicrobiana se define como la disminución en la habilidad de un agente antimicrobiano de matar o inhibir el crecimiento de un microorganismo. A nivel mundial, la resistencia antimicrobiana ha aumentado rápidamente, particularmente en el ambiente hospitalario. Los microorganismos multirresistentes representan un grave peligro para la vida de los pacientes que ingresan con diferentes patologías a los hospitales (Zurita, 2012; Del Río *et al.,* 2007).

Existen tres principales tipos de resistencia: (1) la resistencia intrínseca que es una característica inherente de una especie como resultado de la falta de actividad de una droga o de una clase de drogas. Ésta se puede dar debido a la falta de sitio blanco antimicrobiano apropiado, la inhabilidad de la droga para acceder al sitio blanco o por la presencia de enzimas inactivadoras de antimicrobianos. (2) La resistencia circunstancial que se refiere a la disparidad entre la actividad "in vitro" e "in vivo". Los antibióticos que son activos "in vitro" no necesariamente son efectivos clínicamente, debido a la inhabilidad de penetrar de la droga a lugares protegidos como el líquido cefalorraquídeo, o la inactividad de la droga a bajos pH o al ambiente anaerobio. (3) La resistencia adquirida que se refiere al cambio en características fenotípicas de un patógeno, dando como resultado la disminución en la efectividad de una droga previamente activa. Este tipo de resistencia es una consecuencia natural de microorganismos

genéticamente adaptables en respuesta a las presiones selectivas de los agentes antimicrobianos (en este caso codificada en el material genético cromosómico) o por la adquisición de estas características agrupadas en elementos genéticos móviles (resistencia codificada por plásmidos) (Fraimow y Tsigrelis, 2011; Vignoli y Seija, 2002). La resistencia microbiana adquirida ha estado presente en el campo de las enfermedades infecciosas desde el descubrimiento de la penicilina. Sin embargo, los plásmidos de colecciones bacterianas que datan de la era pre-antibióticos, poseen genes de resistencia a los antibióticos. Estos resultados sugieren que la presencia de antibióticos es una importante fuerza selectiva en la evolución y en la propagación de genes de resistencia y puede contribuir de manera significativa en la alteración de la microbiota natural (Bhullar *et al.,* 2012).

Muchos de los avances del desarrollo de drogas antimicrobianas han resultado de los esfuerzos para combatir los mecanismos de resistencia que hacen a los agentes existentes obsoletos, buscando así nuevas moléculas que prometen ser más efectivas (Kanj y Kanafani, 2011).

Las infecciones causadas por bacterias Gram negativas multirresistentes traen como consecuencia alta morbilidad y mortalidad en pacientes críticamente enfermos; es por esto que es crucial que los médicos en cuidados intensivos conozcan los conceptos claves de la resistencia de bacterias Gram negativas (Fraimow y Tsiegrelis, 2011).

Un factor que contribuye a los diferentes mecanismos de resistencia entre bacterias Gram negativas y Gram positivas es la diferencia en la estructura

celular. Las Gram negativas poseen una membrana externa que no está presente en bacterias Gram positivas. Esta membrana funciona como una barrera selectiva, y sus propiedades de permeabilidad determinan si los antimicrobianos pueden entrar a la célula bacteriana. En general, pequeñas drogas hidrofílicas como los betalactámicos, fluoroquinolonas y tetraciclinas se difunden a través de la membrana externa por medio de las porinas, mientras que los antibióticos hidrofóbicos como los aminoglucósidos y las polimixinas se difunden directamente a través de la membrana lipídica. Los agentes más comúnmente utilizados para tratar infecciones de bacterias Gram negativas multirresistentes son justamente los betalactámicos, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, polymixinas y tigeciclinas (Fraimow y Tsigrelis, 2011).

Otra diferencia estructural entre bacterias Gram negativas y Gram positivas es la capa gruesa de peptidoglicano en bacterias Gram positivas, que es aproximadamente 90 veces más gruesa que la capa de peptidoglicano de las bacterias Gram negativas (Fraimow y Tsigrelis, 2011).

3.2 CARBAPENEMES

Los carbapenemes son derivados de la tienamicina, un antibiótico natural producido por el microorganismo de suelo *Streptomyces catleya* (Knapp y English, 2001). Los carbapenemes son una clase relativamente nueva de antibióticos betalactámicos de amplio espectro, es decir, son capaces de actuar sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Están relacionados estructuralmente con las penicilinas y con las cefalosporinas, cuyo mecanismo de acción se basa

en la inhibición de la síntesis de la pared celular del microorganismo, debido a su alta afinidad por la proteína de unión a la penicilina, PBP, que transporta a las transpeptidasas que establecen los enlaces peptídicos de la pared celular (Findlay *et al.,* 2012). Se diferencian de las penicilinas en una sustitución de un átomo de sulfuro por un carbono en la posición 1 y por la presencia de doble enlace entre C-2 y C-3.

Los carbapenemes son tradicionalmente considerados antibióticos de la última línea de defensa en contra bacterias Gram negativas multirresistentes, especialmente para aquellos patógenos que producen betalactamasas de espectro extendido, BLEE. Sin embargo, el uso excesivo de estos antimicrobianos puede inducir a la aparición de resistencia a este grupo de antimicrobiano (Findlay *et al.,* 2012).

Desafortunadamente, en el año 2001 se reportó por primera vez aislados de *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas que hidrolizan a los carbapenemes (KPC) en California del Norte. Para el 2004 se registraron los primeros brotes de KPC en Nueva York. En el año 2005 se realizó el primer aislamiento clínico de esta bacteria fuera de Estados Unidos, en Francia, alrededor del año 2006 se detectó un brote en Colombia y Argentina, el siguiente año se registró la presencia de esta bacteria en Israel. En los años 2007 y 2008 se registraron brotes en Puerto Rico y Brasil (Nguyen *et al.,* 2010). En el año 2010 Íñiguez *et al.* registraron el primer caso de esta bacteria en el Ecuador, en Azogues.

Las bases moleculares de la resistencia a los carbapenemes han sido caracterizadas en *Pseudomonas aeruginosa* e incluyen el reclutamiento de nuevas betalactamasas, o modificaciones específicas de las enzimas existentes, alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa debido a la disminución de canales proteicos específicos, aumento de la expresión de bombas de eflujo, y/o modificaciones en los contenidos de la PBP (Mussi *et al.,* 2005).

3.3 BETALACTAMASAS

Los agentes antimicrobianos del grupo de los betalactámicos son los más comunes para el tratamiento de las infecciones bacterianas y la producción de betalactamasas es el mecanismo más frecuente de resistencia bacteriana para este grupo de antimicrobianos. Estas enzimas son numerosas, y mutan continuamente en respuesta a la fuerte presión del uso de antibióticos, lo cual lleva al desarrollo de nuevas betalactamasas. Desde su descripción inicial, se han identificado alrededor de 900 betalactamasas y de éstas más de 300 son de tipo BLEE (Zurita, 2012).

Las betalactamasas son enzimas que destruyen la actividad antimicrobiana de los antibióticos betalactámicos como las penicilinas (carbapenémicos) y cefalosporinas, hidrolizando el enlace amida del anillo betalactámico. Este anillo es el grupo acilante químicamente reactivo de la molécula y que está implicado en la modificación del sitio activo de las cadenas laterales de la PBP (Walsh, 2003).

Las betalactamasas se dividen en cuatro clases llamadas A, B, C y D de acuerdo a la clasificación propuesta por Ambler en 1980 según los mecanismos de interacción enzima-sustrato y su secuencia aminoacídica (Zurita, 2012; Matagne *et al.,* 1998).

Las clases A, C y D son enzimas que cuentan con un residuo de serina en el sitio activo, con similaridades tanto de arquitectura como de mecánica con las PBP, sugiriendo una evolución a partir de estas proteínas. Mientras que las betalactamasas de clase B requieren del Zinc como cofactor para poder realizar su actividad catalítica (Walther-Rasmussen y Hoiby, 2007).

3.3.1 BETALACTAMASAS CLASE A

Las betalactamasas de clase A, también conocidas como serin betalactamasas, son las enzimas más ampliamente distribuidas y son responsables de numerosas fallas en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Dentro de este grupo se pueden identificar cinco miembros: Guiana extended-spectrum (GES), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC), *Serratia marcescens* enzyme (SME), imipenemase (IMI) y non-metallocarbapenemase-A (NMC-A). Las enzimas SME, IMI y NMC-A son codificadas en el cromosoma bacteriano, mientras que las enzimas GES y KPC son codificadas en plásmidos (Queenan y Bush, 2007; Matagne *et al.,* 1998).

Las enzimas SME se han encontrado exclusivamente en *Serratia marcescens* y fueron descritas por primera vez en 1982. SME-1 tiene un amplio

espectro de hidrólisis que incluye a las penicilinas, cefalosporinas, aztreonam y carbapenemes. Desde su descubrimiento en Londres, Inglaterra, se han encontrado aislados de *Serratia marcescens* que expresan también otras variantes del gen, SME-2 y SME-3, en los Estados Unidos. En las tres décadas desde su aparición, las infecciones por SME han sido extremadamente raras (Adler y Cameli, 2011; Queenan *et al*., 2006).

Las enzimas IMI/NMC-A forman dos subgrupos, IMI y NMC-A, respectivamente. Las enzimas NMC-A se diferencian por una sustitución de ocho aminoácidos de las dos variantes de enzimas IMI encontradas. La primera variante, IMI-1, fue descrita por primera vez en 1982 en California, Estados Unidos, a partir de una cepa de *Enterobacter cloaceae*, y en el 2001 se encontró la segunda variante, IMI-2, en Hangzhou, China. Por otro lado, la enzima NMC-A fue identificada por primera vez en París, Francia y posteriormente fue descrita en Buenos Aires, Argentina en el 2000, y en Washington, Estados Unidos, en el 2003. Estas dos enzimas han sido agrupadas en un mismo miembro de las betalactamasas debido a que tienen una similitud aminoacídica del 97% (Queenan y Bush, 2007; Walther-Rasmussen y Hoiby, 2007).

La enzima GES fue descrita por primera vez en 1998 en Guiana, Francia, a partir de un aislado de *Klebsiella pneumoniae* y se la denominó GES-1. Actualmente la familia de enzimas GES cuenta con nueve miembros diferentes, de los cuales sólo cuatro, GES-1, -2, -4 y -5, tienen actividad enzimática hacia los carbapenemes. Estas enzimas se han encontrado principalmente en *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo, se ha descrito su presencia también en

miembros de la familia Enterobacteriaceae. El gen *bla*$_{GES}$ se ha encontrado como gen "cassette" dentro de estructuras genéticas llamadas integrones (Walther-Rasmussen y Hoiby*,* 2007).

El último grupo de betalactamasas abarca a las enzimas KPC. Estas enzimas son las más frecuentes de la clase A y son principalmente codificadas en plásmidos. Fueron descritas por primera vez en 1996 en Carolina del Norte, Estados Unidos. Actualmente existen alrededor de once variantes reconocidas de KPC, siendo las variantes KPC-2 y -3 las más frecuentemente encontradas en los aislados de *Klebsiella pneumoniae*. Sin embargo el gen *bla*$_{KPC}$ se ha diseminado hacia otras especies de Enterobacterias (Andrade*,* 2011; Nguyen *et al.,* 2010; Woodford *et al*., 2008; Yigit *et al.*, 2001).

Estudios bioquímicos de KPC muestran que estas enzimas son capaces de hidrolizar todas las moléculas betalactámicas incluyendo penicilinas, cefalosporinas y aztreonam. Los análisis genéticos del gen *bla*$_{KPC}$ muestran que la movilidad de estos caracteres está asociada con la diseminación de cepas, plásmidos conjugativos y transposones. El hecho de que diferentes especies bacterianas y diferentes clones de *K. pneumoniae* tengan KPC betalactamasas es evidencia de la rápida y fácil propagación de estas enzimas (Nordmann *et al.,* 2009).

3.3.2 BETALACTAMASAS CLASE B

También conocidas como metalo betalactamasas (MBLs), son enzimas que no tienen ninguna similaridad de secuencia o estructura con las enzimas tipo serina de las clases A, C y D debido a que requieren de la presencia de Zinc (Zn^{2+}) para iniciar la actividad hidrolítica. Estas enzimas confieren resistencia hacia carbapenemes comercialmente disponibles, además de cefalosporinas y penicilinas, pero no contra el aztreonam. Se han determinado cuatro grupos principales de MBLs: Verona integron-encoded metallo betalactamase (VIM), active on Imipenem (IMP), German imipenemase (GIM), Sao Pablo metallo betalactamase (SPM) y Seoul imipenemase (SIM). Debido a que se pueden encontrar tanto en el cromosoma bacteriano como en plásmidos, son producidas por patógenos clínicos comunes, y debido a la presión selectiva para estas enzimas es posible que la prevalencia de las MBLs continúe aumentando (Zurita, 2012; Queenan y Bush, 2007; Tolson *et al.,* 1997).

3.3.3 BETALACTAMASAS CLASE C

Este tipo de enzimas se conocen como betalactamasas tipo AmpC y pueden ser inducidas por la exposición a antibióticos betalactámicos. Esto se debe a la presencia de un gen regulador denominado AmpR, el cual en condiciones de crecimiento normal tiene la función de reprimir la expresión de AmpC. Cuando la bacteria es expuesta al betalactámico, el antibiótico causa la disrupción de la pared celular con producción en aumento de muropéptidos en el citoplasma, los cuales bloquean la expresión del gen AmpR y, al estar bloqueado

este, se pierde su efecto represor sobre AmpC, con una sobreproducción de betalactamasas clase C y convierte bacterias inicialmente sensibles en variantes resistentes. El acrónimo “AMPCES” representa a las bacterias que producen este tipo de enzimas: *Acinetobacter*, *Morganella*, *Proteus/Providencia, Citrobacter*, *Enterobacter* y *Serratia*. Sin embargo estas enzimas han sido reportadas también en *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens* y *Mycobacterium smegmatis*. Las betalactamasas tipo AmpC hidrolizan cefalosporinas, cefamicinas, penicilinas y monobactámicos (Zurita, 2012; Jacoby, 2009).

3.3.4 BETALACTAMASAS CLASE D

Son conocidas como betalactamasas de tipo OXA, son débilmente activas frente carbapenemes y son, en gran parte, limitadas a *Pseudomonas* y *Acinetobacter* y muy raramente se han detectado en enterobacterias. Estas enzimas se han encontrado en el cromosoma bacteriano o en integrones y se desconoce si en realidad se convertirán en importantes causas de la resistencia en otras bacterias además de *Acinetobacter.* Sin embargo, es importante continuar con la investigación de estas enzimas, debido a que podrían tener la misma relevancia clínica que poseen otras betalactamasas (Zurita, 2012; Ayala, 2011; Paetzel *et al.,* 2000).

3.4 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

La resistencia antimicrobiana es uno de los problemas de salud pública más importantes. Se estima que el 70% de las bacterias son resistentes a por lo menos un antibiótico de los que se prescriben hoy en día Takahashi *et al.* (2010).

A pesar de todo el progreso en el descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos, la prevalencia de las bacterias resistentes ha aumentado y el número de antibióticos aprobados ha decaído. Sin embargo, existen péptidos de defensa del hospedero (HDPs) o péptidos antimicrobianos (AMPs) que tienen el potencial de desarrollar una nueva generación de agentes antimicrobianos que sean más efectivos y que tengan menos efectos secundarios (Torcato *et al.,* 2012).

La piel de los anfibios ha mostrado ser una fuente importante de péptidos antimicrobianos genéticamente codificados, con más de 900 péptidos aislados de la familia Hylidae en Sudamérica y Europa, y la familia Ranidae en Asia y América del Norte. Más de 80 péptidos se han aislado de 12 individuos pertenecientes a los géneros: *Agalychnis, Cruziohyla, Hylomantis, Pachymedusa, Phasmahyla, Phyrynomedua* y *Phyllomedusa* (Amiche *et al.,* 2008).

Los péptidos antimicrobianos actúan como respuesta no específica del sistema que se complementa con la respuesta inmune altamente específica en todos los organismos, incluyendo plantas y humanos. Las glándulas granulares presentes en la piel de los anuros, sintetizan y almacenan polipéptidos de amplio espectro de actividad antimicrobial. Estos péptidos se movilizan rápidamente después de una infección microbiana, y actúan de una manera ágil para neutralizar un amplio rango de microbios. Esta respuesta rápida es crucial, ya que la activación de la respuesta inmune ocurre relativamente despacio en comparación con el potencial de proliferación de los patógenos. Los péptidos antimicrobianos son armas evolutivamente antiguas y su amplia distribución en

los reinos Animalia y Plantae sugiere que estos han cumplido un rol fundamental en el éxito evolutivo de organismos complejos (Rudi *et al.,* 2010; Rollins-Smith *et al.,* 2005; Papo y Shai*,* 2003).

Los diferentes AMPs pueden ser divididos en varios grupos basándose en su longitud, estructuras secundarias y terciarias y en la presencia de puentes de disulfuro. Sin embargo, la mayoría de los péptidos comparte ciertas propiedades: su tamaño varía de 9 aminoácidos a 100 aminoácidos, su carga neta es positiva, son hidrofóbicos, flexibles y usualmente se activan en la membrana. Adicionalmente, la mayoría de ellos son lineares con un potencial de formar estructuras anfipáticas tipo α-hélice u hoja plegada β, mientras que otros son cíclicos debido a la presencia de uno o más enlaces tioéteres o de disulfuro y estos pueden adoptar también las estructuras tanto de α-hélice, hoja plegada β o ambas (Anexo 1) (Jenssen *et al.,* 2006; Papo y Shai*,* 2003; Shai, 2002).

Para poder interactuar con la membrana diana, los AMPs deben pasar por cambios conformacionales. En el agua, su estructura debe ser hidrofílica. Sin embargo, cuando interactúan con las membranas, estos deben exponer una región hidrofóbica al constituyente lipídico de la membrana. Esto puede lograrse de maneras generales: (1) Un péptido monomérico que adopta una estructura al azar en una solución y adquiere una estructura anfipática cuando llega a la membrana; (2) el péptido forma oligómeros en solución de tal manera que la región hidrofóbica se encuentre en el lumen del oligómero y la región hidrofílica está expuesta a la solución. Cuando llega a la membrana la organización se revierte, dejando así la parte hidrofóbica hacia los constituyentes lipídicos de la

membrana y la parte hidrofílica hacia el lumen del oligómero (Urbán *et al.,* 2007; Shai, 2002).

Todos los péptidos deben interactuar con la membrana citoplasmática, aunque su blanco sea intracelular. Actualmente, se sabe que muchos péptidos antimicrobianos no causan la permeabilización de la membrana en la concentración mínima efectiva y, sin embargo, causan la muerte celular. Un creciente número de péptidos han demostrado translocarse a través de la membrana y acumularse en el citoplasma, donde actúan en una variedad de procesos celulares para mediar la muerte celular. El AMP buforin II se transloca a través de la membrana bacteriana sin causar la permeabilización y se une tanto al DNA como al RNA dentro del citoplasma de *E. coli* (Jenssen *et al.,* 2006; Hancock y Chapple*,* 1999).

3.4.1 MODELO DE BARRENO O “BARREL STAVE”

Este modelo describe la formación de poros clásica, en la que los péptidos anfipáticos forman paquetes, en los que las superficies hidrofóbicas interactúan con la parte lipídica de la membrana y las superficies hidrofílicas se localizan hacia la parte interna, produciendo un canal que permite la entrada de agua y la fuga de moléculas de la célula, generando la muerte. Debido a que estos péptidos pueden insertarse en el núcleo hidrofóbico de la membrana, su unión con ésta se da predominantemente por interacciones hidrofóbicas. Como consecuencia estos se pueden unir a membranas tanto zwitteriónicas como cargadas positivamente (Yount *et al.,* 2006; Tossi *et al.,* 2000; Oren y Shai*,* 1999).

El mecanismo de barreno involucra cuatro pasos principales: (1) la unión de los monómeros a la membrana en una estructura de hélice, (2) el reconocimiento molecular entre los monómeros unidos a la membrana, que lleva a la formación del ensamblaje de los monómeros peptídicos en bajas concentraciones, (3) la inserción de, por lo menos, dos monómeros ensamblados hacia el interior de la membrana, iniciando la formación del poro, y (4) el reclutamiento progresivo de monómeros para aumentar el tamaño del poro. Es necesario que los péptidos que actúan de este modo tengan ciertas características que les ayuden a la formación de los poros: todos deben ser hidrofóbicos para penetrar la parte lipídica de la membrana, deben asociarse en la superficie de la membrana, y deben ensamblarse más monómeros para aumentar el tamaño del poro, es necesario que exista una longitud mínima de alrededor de 22 aminoácidos para que puedan atravesar la bicapa lipídica en forma de hélice alfa, u 8 aminoácidos se están en forma de hoja plegada beta y sólo unos pocos poros transmembranales son necesarios para disipar el potencial en las células. Como consecuencia, los péptidos antimicrobianos pueden atravesar membranas de bacterias, protozoos y células de mamíferos, es por esta razón que la concentración mínima inhibitoria debe ser la necesaria para eliminar a las bacterias pero que no ataque a las membranas normales de los mamíferos (Shai, 2002; Oren y Shai, 1999), como se observa en el Anexo 2.

3.4.2 MODELO DE ALFOMBRA O “CARPET MODEL”

Este modelo se utilizó para la descripción del mecanismo de acción de la dermaseptina y de sus análogos naturales como la cecropina, el péptido antimicrobiano humano LL-37, la caerina 1.1, la trichogina GA IV, la androctonina, diasterómeros de péptidos líticos, entre otros (Shai, 2002).

De acuerdo con este modelo, los péptidos se unen a la superficie de la membrana y la cubren subsecuentemente como una alfombra sobre el piso. La membrana puede ser permeada únicamente después de alcanzar una concentración umbral que ayuda a la permeabilización de la membrana de manera similar a la de un detergente (Shai y Oren*,* 2001; Oren y Shai*,* 1999).

Mientras los péptidos cubren la célula, se forman agujeros transitorios, por donde se fugan, de igual manera, las moléculas de bajo peso molecular de la célula bacteriana antes de la lisis completa. Estos agujeros son conocidos como poros toroidales o agujeros de gusanos. Sin embargo, en contraste con el mecanismo de barreno, este modelo no requiere una estructura específica del péptido, ni tampoco la formación de canales estructurados, ya que los péptidos no se insertan en el núcleo hidrofóbico de la membrana sino que se unen a la cabeza de los fosfolípidos en la membrana. Inicialmente, se dan interacciones electrostáticas con la membrana cargada negativamente, ya que los péptidos activos están cargados positivamente (Oren *et al.,* 1999).

Los cuatro pasos involucrados en este modelo son (1) se da una unión preferencial de los péptidos catiónicos con la membrana cargada negativamente, (2) los monómeros anfipáticos se tienden sobre la membrana, de manera que las cargas positivas de los aminoácidos interactúen con la cabeza de los fosfolípidos cargados negativamente o con moléculas de agua, (3) se da una rotación de las moléculas que lleva a una reorientación de los residuos hidrofóbicos hacia el núcleo hidrofóbico de la membrana y (4) se da la desintegración de la membrana por medio de la disrupción de la bicapa lipídica que lleva a una micelización (Shai, 2002; Shai y Oren, 2001; Oren y Shai, 1999). Como se ve en el Anexo 3.

3.4.3 MODELO DE CANAL AGREGADO

Este modelo ejemplifica la formación de poros por medio de la unión con grupos fosfolipídicos de la membrana y posteriormente la inserción de los monómeros dentro de esta. La principal diferencia de este modelo con los anteriormente descritos, es que las aglomeraciones peptídicas para la formación de los canales son transitorias y de corta vida sin causar una depolarización significativa, con el fin de permitir el ingreso de los péptidos a través de la membrana y atacar a sus blancos intracelulares. Estos blancos pueden ser: disrupciones en las funciones celulares como en la biosíntesis de proteínas, RNA y DNA, inhibición de actividad enzimática, unión al DNA o RNA para evitar su síntesis, e inhibición en la regeneración de la pared de la células (Brogden, 2005), como se observa en el Anexo 4.

La selección positiva sobre los genes de AMPs es muy común y resulta en una gran diversidad funcional de estas moléculas entre las especies y entre los loci de muchos taxa (Tennessen y Blouin, 2008). Por lo tanto, el estudio de los péptidos antimicrobianos es de gran importancia, porque tienen gran potencial como base para el desarrollo de nuevos agentes que permitan controlar a microorganismos multirresistentes, hongos, protozoos e incluso virus. El potencial uso biomédico de estas secreciones abre un camino en la búsqueda de soluciones farmacológicas a los problemas de salud pública. Por otro lado, el estudio de las secreciones de especies endémicas ecuatorianas es de gran importancia, porque aporta otra razón para la protección y conservación de anfibios que se encuentran en peligro de extinción.

3.5 OBJETIVOS

3.5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la inhibición a los carbapenemes en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Serratia marcescens, Enterobacter aerogens, Enterobacter cloaceae, Escherichia coli, Morganella morganii* y *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de Hospitales del Ecuador con secreciones peptídicas de *Atelopus elegans* y la identificación genotípica de los principales genes que confieren resistencia a los carbapenemes.

3.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar que los aislados bacterianos pertenezcan al género previamente identificado mediante pruebas bioquímicas.
- Verificar fenotípicamente la presencia de carbapenemasas mediante el Test Modificado de Hodge (TMH).
- Identificar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la presencia de los genes de resistencia a carbapenemes: *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{GES}$, *bla*$_{VIM}$ y *bla*$_{IMP}$.
- Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de secreción total extraída de la piel de *Atelopus elegans* frente a las cepas productoras de KPC mediante pruebas de micro-ELISA.

4 METODOLOGÍA

4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El presente estudio fue realizado con un total de 58 aislados: 28 aislados de *Serratia marcescens,* 22 aislados de *Klebsiella pneumoniae,* 2 aislados de *Enterobacter cloaceae,* y 1 aislado de *Klebsiella oxytoca, Enterobacter aerogens, Escherichia coli, Morganella morganii* y *Pseudomonas aeruginosa* cada una. Los aislados provienen de pacientes con diversas patologías atendidos en varios hospitales entre noviembre de 2009 a mayo de 2012 y donados por Zurita&Zurita Laboratorios (Tabla 1).

Los aislados bacterianos hospitalarios fueron identificados fenotípicamente como resistentes a carbapenemes por Zurita&Zurita Laboratorios, de modo que la población de estudio del presente análisis representa únicamente a la población resistente a carbapenemes que fueron encontrados entre noviembre de 2009 a mayo de 2012.

A pesar de que todas las muestras fueron analizadas e identificadas en Zurita&Zurita Laboratorios mediante el método el sistema VITER, el laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador realizó una reidentificación de los aislados bacterianos mediante pruebas bioquímicas: citrato, triple sugar iron (TSI), motility indole ornitine (MIO), motility indol lisina (MILI), rojo de metilo (RM), fenilalanina (FA), úrea y el medio sulfuro indol motilidad (SIM).

Los aislados confirmados fueron conservados a -20 °C, a -80 °C en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI por sus siglas en inglés "Brain Heart Infusion", Difco^{TM}), con 30% de glicerol y a temperatura ambiente en agar nutriente para ser parte de la Colección Bacteriana Quito Católica (CB-QCA).

4.2 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS

Una vez identificado el género y especie de los aislados se procedió a la identificación fenotípica de producción de carbapenemasas en aislados de enterobacterias por medio del Test de Hodge modificado (THM). Se preparó una dilución de 0,5 en la escala de Mc Farland de una cepa *E. coli* ATCC 25922 en 5 mL de caldo Müeller Hinton (MHB por sus siglas en inglés Müeller Hinton Broth, Difco^{TM}). Se realizó una dilución 1:10 tomando 0,5 mL de la solución 0,5 de Mc Farland y adicionando 4,5 mL de MHB (Figura1).

Posteriormente, se sembró esta dilución en una placa de Müeller Hinton Agar (Difco ^{TM}) y se dejó secar por 3 minutos. Se colocó un disco de 10 µg de meropenem o ertapenem en el centro de la placa. En una línea recta se inoculó el microorganismo sospechoso desde el borde del disco al borde de la placa; se repitió el procedimiento con un control positivo (*Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705) y un control negativo (*Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1706). Se dejó incubar la placa por 24 horas a una temperatura de 35 °C (Figura 1).

4.3 DETECCIÓN MOLECULAR DE LA PRESENCIA DE LOS GENES

Para obtener el ADN a utilizar en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó el kit comercial de extracción Wizard Genomic DNA Purification kit (PROMEGA). Los microorganismos criopreservados fueron cultivados en caldo BHI (Difco ^{TM}) a 35 ºC por 24 horas para el posterior aislamiento de colonias en agar nutriente (Difco ^{TM}). Cinco colonias fueron transferidas a 5 ml de caldo TSB (Difco ^{TM}) e incubadas a 35 ºC por 18 horas. Una vez obtenido el cultivo se procedió a la extracción de ADN siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para la amplificación de cada gen se utilizaron primers específicos según la Tabla 2. Los programas de amplificación de los genes se realizaron en el termociclador Multigene Gradient 080845 de Labnet International Inc y fueron diseñados en el Laboratorio de Microbiología. Para los genes *bla*$_{KPC}$ y *bla*$_{GES}$ el programa consistió en una denaturación inicial de 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 segundos, hibridización de 55 °C durante 30 segundos y extensión de 72 °C por 30 segundos; por último, un período de extensión final de 10 minutos a 72 °C (Tabla 3).

El programa para amplificar los genes *bla*$_{VIM}$ y *bla*$_{IMP}$ consistió de una denaturación inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de denaturación a 95 °C por 1 minuto, hibridización de 52 °C por 1 minuto y una extensión de 72 °C por 2 minutos y un período de extensión final de 10 minutos a 72 °C (Tabla 3).

Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis (125 V, 50 minutos) en geles de agarosa al 1% diluidos en 89mM Tris Base, 89 mM ácido bórico, 25mM EDTA, TBE (1X), en tampón de corrida 44,5mM Tris Base, 44,5 mM ácido bórico, 12,5mM EDTA,TBE al 0,5X. Se empleó como marcador de peso molecular ADN de 100pb (Invitrogen). La tinción del gel se realizó con SYBR® Gold 10.000x (Invitrogen ^{TM}) y la visualización de las bandas se realizó en el sistema de captura de imagen Molecular Imager ® Gel Doc ^{TM} XR+ (BIO-RAD).

4.4 EXTRACCIÓN DE LA SECRECIÓN PEPTÍDICA DE *Atelopus elegans*

La extracción de la secreción peptídica se realizó en 32 individuos de *Atelopus elegans* preservados en la Balsa de los Sapos de la PUCE (Tabla 4). Los individuos eran tanto parentales como de las líneas de descendencia F1 (Figura 2). Todo el péptido obtenido de los individuos fue reunido y probado como uno solo. No hubo diferenciación ni por individuo ni por generación.

Para la extracción peptídica se modificó el protocolo de manera que en lugar de aplicar un voltaje eléctrico, se estimuló a la rana haciendo masajes a lo largo del dorso durante 30 segundos y luego un lavado de 30 segundos con agua MiliQ, este proceso se repitió 3 veces para poder recolectar la mayor cantidad de secreción posible (Figura 3). Los péptidos diluidos fueron colectados en una caja Petri y congelados a -80 °C para su posterior liofilización, para poder realizar los ensayos de CIM. Esto se realizó en la Balsa de los Sapos de la PUCE (Figura 4).

La liofilización se realizó en el Laboratorio de Citogenética de Anfibios de la PUCE en el equipo VirTis *adVantage* Plus. Con un programa de 16 horas diseñado en el laboratorio específicamente para péptidos catiónicos.

4.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE *Atelopus elegans*

La sensibilidad de las secreciones peptídicas de *Atelopus elegans* fue analizada con un total de 58 cepas bacterianas. Las bacterias a probar fueron aisladas en placas de agar nutriente, donde cuatro o cinco colonias aisladas fueron transferidas a caldo Müller Hinton broth, MHB e incubadas a 37 °C durante 18 horas. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 1,0 de la escala de McFarland, de modo que al momento de diluir la bacteria con el péptido se obtenga un 0,5 de la escala de McFarland, es decir una concentración de 1,5 x 10^8 UFC/mL de bacterias.

Se realizaron 10 diluciones seriadas de los péptidos a 10 veces las concentraciones deseadas en 0,01% de ácido acético y 0,2% de Suero Albúmina Bovino (BSA por sus siglas en inglés "Bovine Serum Albumin", Invitrogen) (Wiegand *et al*., 2008) de tal manera que al agregar 11 µl en la solución de 100 µl con la bacteria, la primera concentración sea de 2000,0 µg/ml, y continuamente con la dilución baje la concentración de péptido siendo así: 1000,0 µg/ml, 500,0 µg/ml, 250,0 µg/ml, 125,0 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,3 µg/ml, 15,6 µg/ml, 7,8 µg/ml y 3,9 µg/ml (Figura 5).

Se distribuyeron 100 µl del caldo bacteriano en cada pocillo de la placa de ELISA de poliestireno (Costar ®) desde la columna 1 a la 10, en donde se realizaron los ensayos con 11 µl del péptido antimicrobiano de la manera antes mencionada. La columna 11 es el control positivo de la bacteria, en estos pocillos se agregó la bacteria y el caldo, en la columna 12 se agregó únicamente el caldo MHB como control negativo (Figura 5).

El resultado fue leído en un lector de ELISA en el Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas (CIEI) de la PUCE a una longitud de onda de 620 nm.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los análisis estadísticos se realizó un ANOVA de un factor para determinar la significación entre los grupos. Se realizó también una regresión Probit para determinar la CIM y una transformación de datos para disminuir el valor del CV. Todo esto fue realizado en el programa estadístico PASW Statistics versión 18 (Sánchez-Otero, 2010).

5 RESULTADOS

5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

De los 58 aislados obtenidos a partir de pacientes hospitalarios 28 (48,3%) corresponden a *Serratia marcescens*, 22 (37,9%) pertenecen a *Klebsiella pneumoniae*, 2 (3,5%) pertenecen a *Enterobacter cloaceae*, y para *Enterobacter aerogenes, Pseudomonas aeruginosa, Morganella morganii, Klebsiella oxytoca, Serratia rubidea y Escherichia coli* su frecuencia es de 1,7% ya que sólo presentan un aislado por especie (Tabla 5).

Serratia marcescens se puede identificar como un bacilo Gram negativo, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, anaerobio facultativo, oxidasa negativo, con flagelos perítricos, productor de pigmento rojo conocido como prodigiosina. Bioquímicamente es productor de citratasa, fermentador de glucosa y sacarosa pero no de la lactosa (K/A), productor de gas, con una fermentación ácido mixta (RM positivo), productor de lisina descarboxilasa y no productor de gas sulfídrico, triptofanasa, ureasa, fenilalanina deaminasa ni ornitina descarboxilasa (Tabla 6).

Klebsiella pneumoniae es un bacilo Gram negativo, presenta cápsula como mecanismo de patogenicidad y virulencia, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, inmóvil, catalasa positivo, oxidasa negativo, productor de citratasa, fermentador de la lactosa, sacarosa y glucosa (A/A), gas positivo, con un tipo de fermentación butilén glicólica (RM negativo), no productor de gas

sulfídrico, triptofanasa, fenilalanina deaminasa ni ornitina descarboxilasa y productor de lisina descarboxilasa y ureasa (Tabla 6).

Enterobacter es un bacilo Gram negativo, de la familia Enterobacteriaceae, que presenta cápsula menos mucosa que *Klebsiella*. Sus principales especies son *cloacaeae* y *aerogenes* que se diferencian bioquímicamente por la prueba de lisina, *E. aerogenes* es productor de lisina descarboxilasa y *E. cloaceae* no. Adicionalmente, ambas especies son productoras de citratasa, fermentadoras de lactosa, sacarosa y glucosa (A/A), gas positivas, con fermentación butilén glicólica (RM negativas), móviles, no productor de gas sulfídrico, triptofanasa, ureasa ni fenilalanina deaminasa y productor de ornitina descarboxilasa (Tabla 6).

Morganella morganii es un bacilo Gram negativo, de la familia Enterobacteriacae, de la tribu Proteaceae, presenta flagelos perítricos y bioquímicamente es la única de las especies analizadas que es productora de fenilalanina deaminasa. Es fermentadora de la glucosa y sacarosa pero no de la lactosa (K/A), no productora de gas sulfídrico, de citratasa, triptofanasa ni de ureasa, gas positiva, RM positivo, productora de lisina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa (Tabla 6).

El último miembro de la familia Enterobacteriacae de este estudio es *Escherichia coli,* un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, oxidasa negativo, catalasa positivo, que presenta flagelos perítricos, A/A, no productor de citratasa, gas positivo, RM positivo, productor de triptofanasa, lisina descarboxilasa, ureasa

y ornitina descarboxilasa y no productor de gas sulfídrico ni fenilalanina deaminasa (Tabla 6).

Adicionalmente, se encontró una muestra de *Pseudomonas aeruginosa*, un bacilo Gram negativo de la familia Pseudomonadaceae, con flagelos monótricos, oxidasa y catalasa positivo, perteneciente al grupo de los no fermentadores, produce pigmentos fluorescentes verdes que permiten identificar a sus colonias en placas de agar nutriente.

La reidentificación de los aislados concordó en 56 de los 58 aislados con la identificación original enviada de los hospitales. Sin embargo, dos aislados fueron reidentificados y se notificó a los hospitales la nueva identificación de estos aislados. Estos casos son: *Serratia rubidea* y *Klebsiella oxytoca.*

En el caso de *S. rubidea,* originalmente constaba como *S. marcescens*, sin embargo, la identificación bioquímica no coincidía, debido a que en la prueba del TSI, se mostró como una bacteria fermentadora de la lactosa, sacarosa y glucosa (A/A), gas negativa, RM negativa y ornitina descarboxilasa positiva (Tabla 6).

Por otro lado, en el caso de *Klebsiella oxytoca* hubo error de identificación, debido a que la diferenciación bioquímica entre colonias típicas de *K. oxytoca* y *K. pneumoniae* que se basa en la prueba de indol. Siendo negativa para *K. pneumoniae* y positiva para *K. oxytoca*. La enzima triptofanasa se encuentra solamente en *K. oxytoca*.

De los 58 aislados 20,7% provienen de sangre, 12% de un brote en neonatos de la ciudad de Guayaquil, 10,4% de un aspirado traqueal, 10,3% de orina, 5,2% de esputo y de secreciones traqueales, mientras que sólo se obtuvo una muestra (1,7%) de herida de pierna, herida de tórax, úlcera de muslo, histopatología de la tibia, secreción de herida de tibia, líquido subgaleal, biopsia de tobillo, absceso peritoneal, muslo, tejido muscular de muslo derecho, lavado broncoalveolar, fístula esternal, ligación peritoneal, secreción gástrica, secreción de fístula, secreción de herida quirúrgica y líquido de pared abdominal (Figura 6).

De estos, 46,6% pertenecen al género masculino y 27,6% al género femenino (Figura 7) y 25,8 no tienen definido el sexo por falta de datos o por ser recién nacidos sin registro del sexo. En cuanto a la clasificación de edades (OMS, 2001) 24,1% pertenecen a niños menores a 1 año de edad, 1,7% son niños entre 1 y 4 años, 3,5% a adolescentes entre 10 y 19 años, 25,9% son adultos jóvenes entre 20 y 49 años de edad y, de igual manera, 25,9% son adultos de más de 50 años de edad Figura 8.

5.2 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS

Para la interpretación de los resultados del MHT es necesario examinar la placa, después de 16-24 horas de incubación, para verificar la presencia de una hendidura en forma de hoja de trébol en la intersección entre el organismo de prueba y la *E. coli* ATCC 25922, dentro de la zona de inhibición del disco de carbapenem. La hoja de trébol se forma debido a que el organismo de muestra produce la enzima carbapenemasa y degrada el antibiótico, permitiendo así el

crecimiento de la *E. coli* ATCC 25922 hacia el disco, esto se interpreta como un resultado positivo.

El Test Modificado de Hodge permitió observar un resultado positivo para 31 de los 58 aislados, es decir el 53,4% mostraron tener producción de carbapenemasas fenotípicamente con la característica hoja de trébol con borde dentado en la región de la *E. coli* 25922 (Figura 9).

5.3 DETECCIÓN MOLECULAR DE LA PRESENCIA DE LOS GENES

La visualización de la PCR para la amplificación de los genes codificantes para las betalactamasas permitió identificar las diferentes bandas de los cuatro genes analizados. Al compararlas con la escalera de peso molecular se pudo evidenciar una banda de 738 pb que corresponde al gen *bla*$_{KPC}$, una banda de 864 pb perteneciente al gen *bla*$_{GES}$, una de 500 pb del gen *bla*$_{VIM}$ y una de 587 pb que corresponde al gen *bla*$_{IMP}$ (Figuras 10 y 11).

De los 58 aislados analizados, 53 (91,4%) presentaron el gen *bla*$_{KPC}$, 5 (8,6%) el gen *bla*$_{GES}$, 4 (6,9%) el gen *bla*$_{VIM}$ y únicamente 1 aislado (1,7%) presentó el gen *bla*$_{IMP}$ (Figura 12), incluyendo los primeros registros de resistencia a carbapenemes para *Serratia marcescens*, *E. coli*, *Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae* (Tabla 7).

De los 53 aislados que presentaron resistencia a los carbapenemes, 24 (45,3%) pertencen a *Serratia marcescens*, 22 (41,5%) son *Klebsiella penumoniae*,

y *Enterobacter cloaceae*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa, Morganella morganii, Escherichia coli, Serratia rubidea y Klebsiella oxytoca* presentan únicamente un aislado (1,9%) cada uno, Figura 13.

5.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA 50 (CIM-50) DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE *Atelopus elegans*

Se analizaron 58 bacterias de aislados clínicos con secreciones peptídicas provenientes de 32 individuos de la especie *Atelopus elegans*. En la Figura 14 se evidencia cómo a medida que disminuye la concentración peptídica, el porcentaje de bacterias muertas también disminuye, siendo así cuando están las bacterias frente a una concentración de 2000,0 µg/ml, se puede ver que muere entre el 70,0% y 90,0% de bacterias, a una concentración de 62,5 µg/ml muere hasta el 60,0% de las bacterias y a una concentración de 3,9 µg/ml muere hasta un 40,0% de bacterias. Esta tendencia de muerte bacteriana corresponde a las bacterias que pertenecen a la especie *Serratia marcescens* frente a las diferentes concentraciones de péptido.

En la Figura 15 se ve la misma tendencia de muerte de bacterias que pertenecen a la especie *Klebsiella pneumoniae* frente a las secreciones. En este caso, a una concentración de 2000,0 µg/ml se ve una muerte bacteriana entre el 60,0 y 90,0%, a una concentración de 62,5 µg/ml se puede ver una muerte bacteriana que llega hasta el 60,0% y finalmente a la menor concentración peptídica (3,9 µg/ml) se evidencia una muerte desde 0,0% a 50,0%.

Por último en la Figura 16 se ve la misma tendencia en las especies restantes del análisis: *Klebsiella oxytoca*, *Serratia rubidea*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloaceae.* En estos casos a una concentración de 2000,0 µg/ml se ve una muerte bacteriana entre el 70,0% y 90,0%, a una concentración de 62,5 µg/ml hay muerte del 30,0% al 60,0% de bacterias y finalmente a 3,9 µg/ml hay muerte de 10,0% al 40,0% de los aislados.

Los valores promedio máximo (con 2000,0 µg/ml de péptido) y mínimo (con 3,91 µg/m de péptido) de la mortalidad bacteriana de *Klebsiella pneumoniae* por acción de las secreciones peptídicas de *Atelopus elegans* son de 82,9% y 24,0, respectivamente, mientras que para *Serratia marcescens* son de 83,1% y 7,2% como se ve en la Tabla 8.

Los resultados de los valores de péptido que eliminan a por lo menos el 50,0% de las bacterias mostraron que para *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, y *Enterobacter,* tanto *aerogenes* como *cloaceae*, el valor es de 250,0 µg/ml, para *Morganella morganii* el valor de la CIM-50 es de 125,0 µg/ml, para *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* y *Serratia rubidea* es de 62,5 µg/ml y para *Escherichia coli* es de 31,3 µg/ml como se puede ver en la Figura 17.

Los resultados del ANOVA mostraron que no existen diferencias entre los grupos con una significación de 0,154 en los datos transformados y una significación de 0,830 en los datos originales (Anexo 5). El análisis se realizó en tres especies: *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* y *Enterobacter*

cloaceae, Debido a que las especies *Enterobacter aerogenes, Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* y *Serratia rubidea* presentaron únicamente un aislado clínico y las pruebas estadísticas requieren, para estas especies, de más datos.

En el Anexo 6 se muestran las medias cuadráticas de las tres especies con su desviación estándar tanto de los datos originales como de los datos transformados. En el caso de los datos transformados se puede ver que la media cuadrática para *Serratia marcescens* es 2,3317, para *Klebsiella pnuemoniae* es 2,1424 y para *Enterobacter cloaceae* es 2,4418.

Por último, en el Anexo 7 se detalla el promedio y la desviación estándar de la sensibilidad de las tres especies frente al péptido antimicrobiano. En este caso se ve que el promedio, representado por un círculo, de *Klebsiella pneumoniae,* de *Serratia marcescens* y de *Enterobacter cloaceae* está entre 200 y 300 de absorbancia.

6 DISCUSIÓN

A pesar de que la resistencia antibiótica ha sido motivo de preocupación desde la introducción de la penicilina, las últimas dos décadas han mostrado un aumento significativo en la resistencia, especialmente relacionada a los betalactámicos. Esta resistencia se ha convertido en la principal preocupación tanto dentro como fuera del ambiente hospitalario (Bush, 2010).

Los patógenos resistentes a betalactámicos generan desafíos en el sistema de salud tanto en el diagnóstico como en el tratamiento, y se ven amplificados en el ambiente de cuidados intensivos, donde el riesgo de transmisión y de aparición de resistencia es muy alto (Fraimow y Tsigrelis, 2011).

Las betalactamasas confieren resistencia antibiótica significativa a sus hospederos bacterianos, ya que hidrolizan el enlace amida de anillo betalactámico. Estas enzimas son especialmente importantes en bacterias Gram negativas, debido a que constituyen el mayor mecanismo de defensa en contra de drogas basadas en betalactámicos. La diseminación de los genes betalactámicos se ha visto exacerbada por su integración a elementos genéticos móviles, como plásmidos y transposones, lo que facilita la rápida transferencia de material genético entre microorganismos (Wilke *et al.,* 2005).

Algunos estudios multicéntricos hospitalarios han evidenciado enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y otras bacterias Gram negativas, productoras de betalactamasas con una frecuencia de 13,1% a 24,0% a nivel

mundial. Dicha problemática podría estar afectando hasta en un 60,0% de las muertes en sujetos internados en la unidad de cuidados intensivos (del Río *et al.*, 2007; Walther-Rasmussen y Hoiby*,* 2007).

En vista de este alto porcentaje de muerte es necesaria la identificación de carbapenemasas en los aislados hospitalarios. En este estudio, para la identificación fenotípica de estas enzimas, se utilizó el Test Modificado de Hodge. Esta prueba está estandarizada por "Clinical and Laboratory Standars Institute", CLSI (2007). Consiste principalmente en que si la bacteria produce la enzima carbapenemasa, esta permite el crecimiento de una cepa susceptible a los carbapenemes (*E. coli* ATCC 25922) hacia el disco de carbapeneme. En este estudio se encontró que el 53,4% de los 58 aislados tuvieron un MHT positivo. Mientras que dentro de la población previamente seleccionada genéticamente se encontró que el 91,4% presentaban el gen codificante para la enzima. Esta diferencia de resultados se puede deber a que el método de MHT tiene algunas limitaciones como el no poder determinar la clase de carbapenemasas, además de tener un alto riesgo de falsos positivos y falsos negativos (CDC, 2010).

Por este motivo es necesaria la identificación genética de la resistencia a carbapenemes. Los resultados de este estudio demuestran que, dentro de la población previamente seleccionada como productora de carbapenemeasas, hay una frecuencia de 91,4% de bacterias con el gen bla_{KPC}. A pesar de que en el año 2007 Walther-Rasmussen *et al.* determinaron que la presencia de enzimas tipo serin betalactamasas predominan en Norteamérica, Asia y Europa, es necesario recalcar que las enzimas KPC son las más frecuentes dentro del grupo y con

mayor diseminación entre Enterobacterias (Zurita, 2012; Nguyen *et al.,* 2010). Como fue señalado en el alerta realizado por Argentina, que en el año 2010 encontraron una prevalencia del 86,0% de patógenos portadores de KPC en todos los aislados clínicos del año (Malbrán, 2010).

El gen *bla*$_{GES}$ fue identificado en 5 (8,6%) de los aislados portadores de genes que codifican para serin betalactamasas. Este gen se encuentra principalmente en *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo, se han encontrado bacterias de la familia Enterobacteriaceae que presentan este gen. La frecuencia (8,6%) de la presencia de este gen concuerda con análisis de prevalencia de carbapenemasas que revelan su poca frecuencia en Latinoamérica, como se ha mencionado previamente (Walther-Rasmussen y Hoiby, 2007).

En cuanto a los genes *bla*$_{VIM}$ y *bla*$_{IMP}$ que codifican para metalo betalactamasas se encontró una frecuencia de 6,9% y 1,7%; respectivamente. Estos resultados concuerdan con estudios en donde plantean que la presencia de enzimas metalo betalactamasas se ha expandido rápidamente alrededor del mundo, y dentro de estas se destacan dos grupos principales comunes: VIM e IMP. El grupo VIM, especialmente la variante VIM-2, es el que se aísla de manera predominante en todo el mundo, incluyendo Latinoamérica. Por otro lado, a pesar de que la producción de IMP se ha visto incrementada en América en los últimos años, en países como Argentina, Chile, Colombia y Ecuador la frecuencia de esta enzima continúa siendo menor que la de VIM (Zurita, 2012; Colón *et al.,* 2009).

Debido al aumento de la resistencia a antimicrobianos, especialmente a carbepenemes en enterobacterias, en este estudio se analizó la actividad antimicrobiana de las secreciones peptídicas de *Atelopus elegans* (Anura: Bufonidae), en contra de las bacterias previamente identificadas como productoras de carbapenemasas. Este anfibio que se encuentra en peligro crítico de extinción según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) del presente año. Estas secreciones en bufónidos pueden contener esteroides como bufogeninas y bufotoxinas que están involucradas en la defensa química en contra de microorganismos (Jared *et al*., 2009).

Para estos análisis se utilizó la técnica de microdilución en caldo estandarizada por el CLSI (2007) debido a las cantidades limitadas de secreciones que se obtuvieron.

Un factor importante en la microdilución en caldo fue la solubilidad de la secreción peptídica, ya que esto afecta al grado de interacción entre la bacteria y el péptido. De acuerdo con lo sugerido por Wiegand *et al*., (2008) se solubilizó la secreción en una solución de 0,01% de ácido acético y 0,2% de Suero Albúmina Bovino (BSA). Esto se debe a que las proteínas diluidas son vulnerables a la inactivación, degradación y a la pérdida debido al bajo nivel de unión con el agua, es por esta razón que se añade BSA, también conocida como proteína “portador” o de relleno para protegerlas de la degradación y pérdida. El ácido acético, por otro lado, tiene la propiedad de solvente y ayuda a disolver compuestos polares y no polares asegurando la solubilidad de las secreciones. El ácido acético tiene la propiedad de desinfectante, lo que implica que a altas concentraciones ejerce

dicha acción sobre superficies u objetos inanimados. Sin embargo, estudios previos realizados por Wiegand *et al*., (2008) demuestran que al 0,01% no existe una actividad de desinfectante, de modo que la inhibición o muerte bacteriana se debe únicamente a la acción antimicrobiana de la secreción peptídica.

En los resultados de la CIM-50 de las secreciones con las diferentes bacterias, podemos ver que para *Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens y Enterobacter,* tanto *cloaceae* como *aerogenes,* el valor es de 250,0 µg/ml, el valor más alto del estudio que elimina a por lo menos el 50,0% de bacterias. Por ejemplo, *Serratia marcescens* es responsable por más del 90,0% de infecciones causadas por el género *Serratia*, esto explica por qué es más resistente a los péptidos (con una CIM de 250,0 µg/ml) que *Serratia rubidea* que tiene como valor de CIM 62,5 µg/ml (Hu *et al.,*2010).

En el caso de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter*, tanto *aerogenes* como *cloaceae*, estas cuentan con una cápsula de polisacáridos (más gruesa en *Klebsiella)* que las hace más impermeables hacia diferentes proteínas. Además, siendo esta cápsula mucosa, dificulta el movimiento del péptido hacia la membrana externa explicando el alto valor de CIM-50 necesario (250 µg/ml). La diferencia en la patogenicidad de *Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca* explica la diferencia en concentraciones inhibitorias mínimas 50 (250,0 µg/ml en *K. pneumoniae* y 62,5 µg/ml en *K. oxytoca*), de la misma manera que *S. marcescens* y *S. rubidea*.

Los análisis estadísticos muestran que no existe diferencia significativa entre los grupos, es decir que el comportamiento básico de las tres especies analizadas frente al péptido es similar, lo que concuerda con la frecuencia de infecciones hospitalarias que estas producen, ya que entre noviembre de 2009 a mayo de 2012 encontramos que las tres especies que necesitan mayor CIM-50 (*Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloaceae)* son las que más frecuentemente se encontraron en los aislados (48,3%, 37,9% y 3,5%; respectivamente).

En el caso de *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia rubidea* y *Escherichia coli* presentan un valor de CIM que se encuentra entre 31,5 µg/ml y 125,0 µg/ml, en estos casos al tener únicamente un aislado clínico no es posible realizar pruebas estadísticas que ayuden a agrupar a estas especies de acuerdo con su comportamiento frente al péptido antimicrobiano.

Este estudio representa el primer reporte de actividad antimicrobiana de la secreción peptídica de *Atelopus elegans* y fue basado en el estudio realizado por Caicedo (2007) en el que se utilizó la secreción cutánea de *Agalychnis spurrelli* demostrando su alta actividad antimicrobiana a concentraciones de 2000 µg/ml. En los ensayos realizados con *Atelopus elegans* no se obtuvo un valor de CIM-90 en vista de que para obtener la cantidad de secreción necesaria para establecer esta concentración de inhibición, los individuos, que se encuentran en peligro crítico de extinción, tenían que ser estresados y su crianza *in vitro* podía verse comprometida.

Sin embargo, Caicedo (2007) estableció que aquellas bacterias con CIM-50 peptídica igual o menor a 250,0 µg/ml se consideraban como cepas inhibidas por las secreciones peptídicas, y que cada bacteria reacciona de manera independiente a las secreciones. En base a esto se puede determinar que todas las bacterias analizadas desde noviembre de 2009 hasta mayo de 2012 son inhibidas a las secreciones peptídicas de *Atelopus elegans* con una CIM igual o menor a 250,0 µg/ml.

En vista de la gravedad a la que nos estamos enfrentando actualmente con la resistencia bacteriana en ambientes hospitalarios y al alto potencial de transmisión de cepas con resistencia antibiótica múltiple, se puede comprender la importancia de la caracterización microbiológica molecular de enterobacterias productoras de carbapenemasas. Este estudio pretende ayudar a proveer información acerca de una posible fuente de agentes antimicrobianos que ayuden a minimizar este problema, además de ampliar la investigación de la resistencia bacteriana en el Laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Adicionalmente, el contar con secreciones de una especie de anfibio endémica del Ecuador que se encuentra en peligro crítico de extinción puede ayudar a crear una conciencia de conservación en la gente y a prevenir la destrucción de sus hábitats.

7 CONCLUSIONES

1. Los aislados bacterianos hospitalarios fueron reidentificados con éxito, incluyendo los dos casos en los que hubo que notificar a los hospitales que su identificación original estaba equivocada.

2. De los 58 aislados preseleccionados como multirresistentes, la gran mayoría corresponde a *Serratia marcescens,* seguido de *Klebsiella pneumoniae, Enterobacter*, tanto *aerogenes* como *cloaceae, Pseudomonas aeruginosa, Morganella morganii, Klebsiella oxytoca, Serratia rubidea* y finalmente *Escherichia coli*.

3. La detección fenotípica de carbapenemasas utilizando el Test Modicado de Hodge fue positiva en cerca de la mitad de la población (53,4%) de los aislados bacterianos analizados. Al comparar, en el presente estudio, los resultados de la detección fenotípica con la identificación molecular de la presencia de genes de resistencia a carbapenemes se evidencia un porcentaje más elevado. Revelando la eficiencia de la identificación molecular de enterobacterias productoras de carbapenemasas.

4. Los genes que codifican para enzimas tipo serin carbapenemasas se los encuentra con mayor frecuencia en este estudio. El gen bla_{KPC} fue identificado con mayor frecuencia (91,4%) en los aislados bacterianos. Mientras que el gen bla_{GES} fue detectado en menor frecuencia (8,6% de los aislados).

5. Los genes que codifican para enzimas tipo metalo betalactamasas fueron identificados en menor frecuencia en los aislados que los genes que codifican para enzimas tipo serin betalactamasas (6,9% para *bla*$_{VIM}$ y 1,7% para *bla*$_{IMP}$).

6. Este estudio ha logrado demostrar por primera vez en el Ecuador, genes que codifican KPC en especies como *Serratia marcescens*, *E. coli*, *Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae*.

7. Todos los aislados estudiados fueron inhibidos por la secreción cutánea de *Atelopus elegans,* presentándose un valor de CIM mayor para *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, y *Enterobacter*, tanto *aerogenes* como *cloaceae,* seguido por *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia rubidea*, y finalmente *Escherichia coli*.

8. Es necesario crear una conciencia de conservación para los anfibios que se encuentran en peligro de extinción, ya que sus secreciones peptídicas son una potencial fuente de antimicrobianos que pueden llegar a ayudar a minimizar el problema de la resistencia bacteriana.

8 LITERATURA CITADA

Andrade, I. 2011. Informe de Confirmación de Enterobacterias con presencia de Carbapenemasas tipo KPC. Antimicrobial Agents Chemotherapy 55: 3579-3583.

Adler, A. y Carmeli, Y. 2011. Dissemination of the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in the Health Care Settings : Tracking the Trails of an Elusive Offender. mBio 2 (6): 1-2. e00280-11. doi:10.1128/mBio.00280-11.Updated.

Amiche, M., Ladram, A. y Nicolas, P. 2008. A consistent nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily Phyllomedusinae. Peptides 29 (11): 2074-2082. doi:10.1016/j.peptides.2008.06.017.

Ayala, S. 2011. Detección de genes que codifican la resitencia a carbapenemes (tipo Serin-β-lactamasa) en *Pseudomonas aeruginosa* Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E. D. y Johnston, M. 2012. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. PloS one 7 (4): 1-11 e34953. doi:10.1371/journal.pone.0034953.

Brogden, K. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nature Reviews. Microbiology 3 (3): 238-250. doi:10.1038/nrmicro1098.

Bush, K. 2010. Alarming β-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. Current Opinion in Microbiology 13 (5): 558-564. doi:10.1016/j.mib.2010.09.006.

Caicedo, A. 2007. Análisis de secreciones peptídicas de anfibios ecuatorianos con pruebas de susceptibilidad en bacterias patógenas. Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

CDC. 2010. Modified Hodge Test for Carbapenemase Detection in Enterobacteriaceae.

CLCI. 2007. Perfomance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement 27 (1).

Colón, E. F., García, Z. B., Balderrama, J. Z., Zabalaga, S., Davalos, J. P., Espinoza, F. y Peña, E. 2009. Determinación de carbapenemasas y su relación con estructuras genéticas en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* de hospitales de la ciudad de Cochabamba. Biofarbo 17 (1): 30-38.

Del Río, J., Arango, R., Buritaca, C. y Estrada, I. 2007. Producción Bacteriana de Betalactamasas de Espectro Extendido en Pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital de Caldas. Biosalud 6: 69-83.

Findlay, B., Zhanel, G. G. y Schweizer, F. 2012. Investigating the antimicrobial peptide “window of activity” using cationic lipopeptides with hydrocarbon and fluorinated tails. International Journal of Antimicrobial Agents 40 (1): 36-42. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.03.013.

Fraimow, H. S. y Tsigrelis, C. 2011. Antimicrobial resistance in the intensive care unit: mechanisms, epidemiology, and management of specific resistant pathogens. Critical Care Clinics 27 (1): 163-205. doi:10.1016/j.ccc.2010.11.002.

Hancock, R. E. W. y Chapple, D. S. 1999. Peptide Antibiotics 43 (6): 1317-1323.

Hu, Z., Zhao, W. y Hu, Z. 2010. *Serratia*. Taylor and Francis Group. Showa, Japón:

Iñiguez, D., Zurita, J., Alcocer, I., Ortega, D., Gómez, A. M. y Maldonado, L. 2010. *Klebsiella pneumoniae* productora de Carbapenemeasa tipo KPC: Primer Reporte en el Ecuador. XX Congreso Latinoamericano de Patología Clínica ALAPAC/ML.

Jacoby, G. 2009. AmpC beta-lactamasas. Clinical Mcrobiology Reviews 22: 161-182.

Jared, C., Antoniazzi, M. M., Jordão, A., Silva, J., Greven, H. y Rodrigues, M. 2009. Parotoid macroglands in toad (Rhinella jimi): their structure and functioning in passive defence. Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology 54 (3): 197-207. doi:10.1016/j.toxicon.2009.03.029.

Jenssen, H., Hamill, P. y Hancock, R. 2006. Peptide antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews 19 (3): 491-511. doi:10.1128/CMR.00056-05.

Kanj, S. S. y Kanafani, Z. 2011. Current concepts in antimicrobial therapy against resistant gram-negative organisms: extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae, carbapenem-resistant. Mayo Clinic proceedings. 86 (3): 250-259. doi:10.4065/mcp.2010.0674.

Knapp, K. M. y English, B. K. 2001. Carbapenems. Seminars in Pediatric Infectious Diseases 12 (3): 175-185. doi:10.1053/spid.2001.24093.

Malbrán, C. 2010. Diseminación de kpc en argentina. Programa Nacional de Control de Calidad en Bacteriología, INEI 1 (1): 2-5.

Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J. y Frere, J. 1998. Biochemical Journey 330: 581-598.

Mussi, M. A., Limansky, A. S. y Viale, A. M. 2005. Acquisition of Resistance to Carbapenems in Multidrug-Resistant Clinical Strains of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49 (4): 1432-1440. doi:10.1128/AAC.49.4.1432.

Nguyen, L. T., Haney, E. F. y Vogel, H. J. 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. Trends in biotechnology 29 (9): 464-472. doi:10.1016/j.tibtech.2011.05.001.

Nguyen, M., Eschenauer, G., Bryan, M., O'Neil, K., Furuya, E., Della-Latta, P. y Kubin, C. 2010. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: factors correlated with clinical and microbiologic outcomes. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 67 (2): 180-184. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.02.001.

Nordmann, P., Cuzon, G. y Naas, T. 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. The Lancet infectious diseases 9 (4): 228-236. doi:10.1016/S1473-3099(09)70054-4.

OMS. 2001. Informe Sobre La Salud Mental en el Mundo. Disponible en www.eho.int (Consultado el 10 de diciembre de 2012).

Oren, Z. y Shai, Y. 1999. Mode of Action of Linear Amphipathic alfa -Helical Antimicrobial Peptides. Biopolymers 47: 451-463.

Paetzel, M., Danel, F., Castro, L., Mosimann, S., Page, M. y Strynadka, N. 2000. Crystal structure of the class D β-lactamase. Nature Structural Biology 7 (10): 918-925.

Papo, N. y Shai, Y. 2003. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? Peptides 24 (11): 1693-1703. doi:10.1016/j.peptides.2003.09.013.

Queenan, A. M. y Bush, K. 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clinical Microbiology Reviews 20 (3): 440-458, doi:10.1128/CMR.00001-07.

Queenan, A. M., Shang, W., Schreckenberger, P., Lolans, K., Bush, K. y Quinn, J. 2006. SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy 50 (10): 3485-3487. doi:10.1128/AAC.00363-06.

Rollins-Smith, L., King, J. D., Nielsen, P. F., Sonnevend, A. y Conlon, J. M. 2005. An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura: Leptodactylidae). Regulatory Peptides 124 (1-3): 173-178. doi:10.1016/j.regpep.2004.07.013.

Rudi, J., Muller, D., Siano, A., Sminoetta, A. y Tonarelli, G. 2010. Péptido antimicrobiano quimérico de dermaseptina-s1 y tigerinina-1: Estructura secundaria y selectividad hacia membranas. Revista FABICIB 14: 148-161.

Sánchez-Otero, J. 2010. Introducción al Diseño Experimental. Innovación Digital. Quito, Ecuador.

Shai, Y. y Oren, Z. 2001. From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. Peptides 22 (10): 1629-1641. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11587791.

Shai, Y. 2002. Mode of Action of Active Antimicrobial Peptides. Biopolymers 66: 236-248.

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.

Tennessen, J. y Blouin, M. S. 2008. Balancing selection at a frog antimicrobial peptide locus: fluctuating immune effector alleles? Molecular Biology and Evolution 25 (12): 2669-2680. doi:10.1093/molbev/msn208.

Tolson, D. A., Bell, D., Skett, P. W., Marshall, A. C., Reid, R., Combret, Y. y Payne, D. J.1997. Inhibition of Metallo- beta-Lactamases by a Series of Mercaptoacetic Acid Thiol Ester Derivatives. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 41 (1): 135-140.

Torcato, I. M., Castanho, M. y Henriques, S. T. 2012. The Application of Biophysical Techniques to Study Antimicrobial Peptides. *S*pectroscopy: An International Journal 27 (5-6): 541-549. doi:10.1155/2012/460702.

Tossi, A., Sandri, L. y Giangaspero, A. 2000. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. Biopolymers 55 (1): 4-30. doi:10.1002/1097-0282(2000)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M.

Urbán, E., Nagy, E., Pál, T., Sonnevend, A. y Conlon, J. M. 2007. Activities of four frog skin-derived antimicrobial peptides (temporin-1DRa, temporin-1Va and the melittin-related peptides AR-23 and RV-23) against anaerobic bacteria. International Journal of Antimicrobial Agents 29 (3): 317-321. doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.09.007.

Vignoli, R. y Seija, V. 2002. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. Temas de Bacteriología y Virología Médica 14: 145-151.

Walsh, C. 2003. Antibiotics Actions, Origins, Resistance. ASM Press,Estados Unidos.

Walther-Rasmussen, J. y Hoiby, N. 2007. Class A carbapenemases. Journal of Antimicrobial Activity 60: 470-482.

Wiegand, I., Hilpert, K., y Hancock, R. E. W. 2008. Agar and Broth dilution methods to determine the minimal inhinitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature Protocols 3 (2): 163-175.

Wilke, M. S., Lovering, A. L. y Strynadka, N. C. J. 2005. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. Current Opinion in Microbiology 8 (5): 525-533. doi:10.1016/j.mib.2005.08.016.

Woodford, N., Zhang, J., Warner, M., Kaufmann, M. E., Matos, J., Macdonald, A. y Brudney, D. 2008. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 62 (6): 1261-1264. doi:10.1093/jac/dkn396.

Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D. y Alberti, S. 2001. Novel Carbapenem-Hydrolyzing beta-Lactamase, KPC-1 , from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45 (4): 1151-1161. doi:10.1128/AAC.45.4.1151.

Yount, N. Y., Bayer, A. S. y Xiong, Y. Q. 2006. Advances in Antimicrobial Peptide Immunobiology. Biopolymers 84: 435-458. doi:10.1002/bip.

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

9 FIGURAS

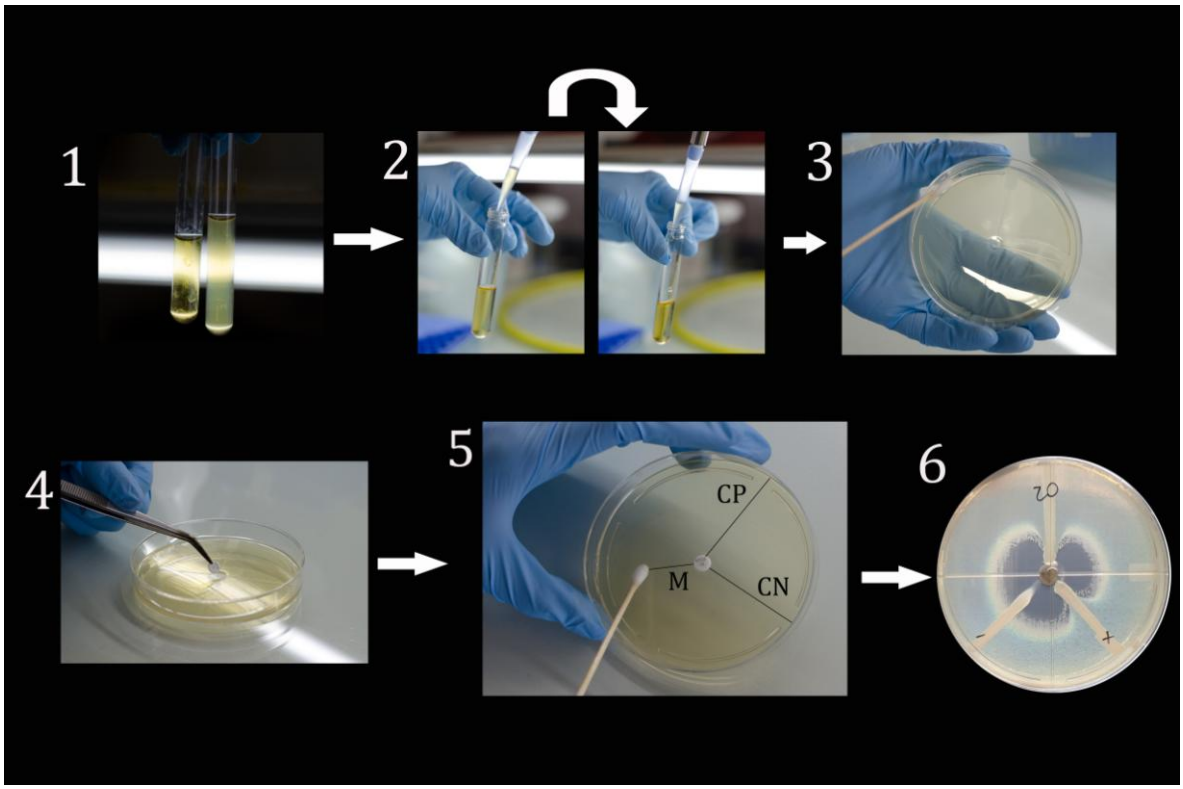


Figura 1. Secuencia de pasos para la prueba del Test Modificado de Hodge (MHT). 1, A la derecha tubo con *E. coli* ATCC 25922 al 0,5 de la escala de Mc Farland en 5 mL de Müeller Hinton broth y a la izquierda tubo con 4,5 mL de Müeller Hinton broth; **2**, dilución 1:10 con 0,5 mL de la solución al 0,5 de la escala de Mc Farland en 4,5 mL de Müeller Hinton broth; **3**, siembra de la dilución 1:10 en placa de Müeller Hinton Agar; **4**, disco de meropenem en el centro de la placa; **5**, siembra de control positivo (CP), control negativo (CN) y muestra a analizar (M); **6**, Resultado positivo para la prueba de MHT después de 24 horas de incubación.



Figura 2. Anfibio perteneciente a la especie *Atelopus elegans*

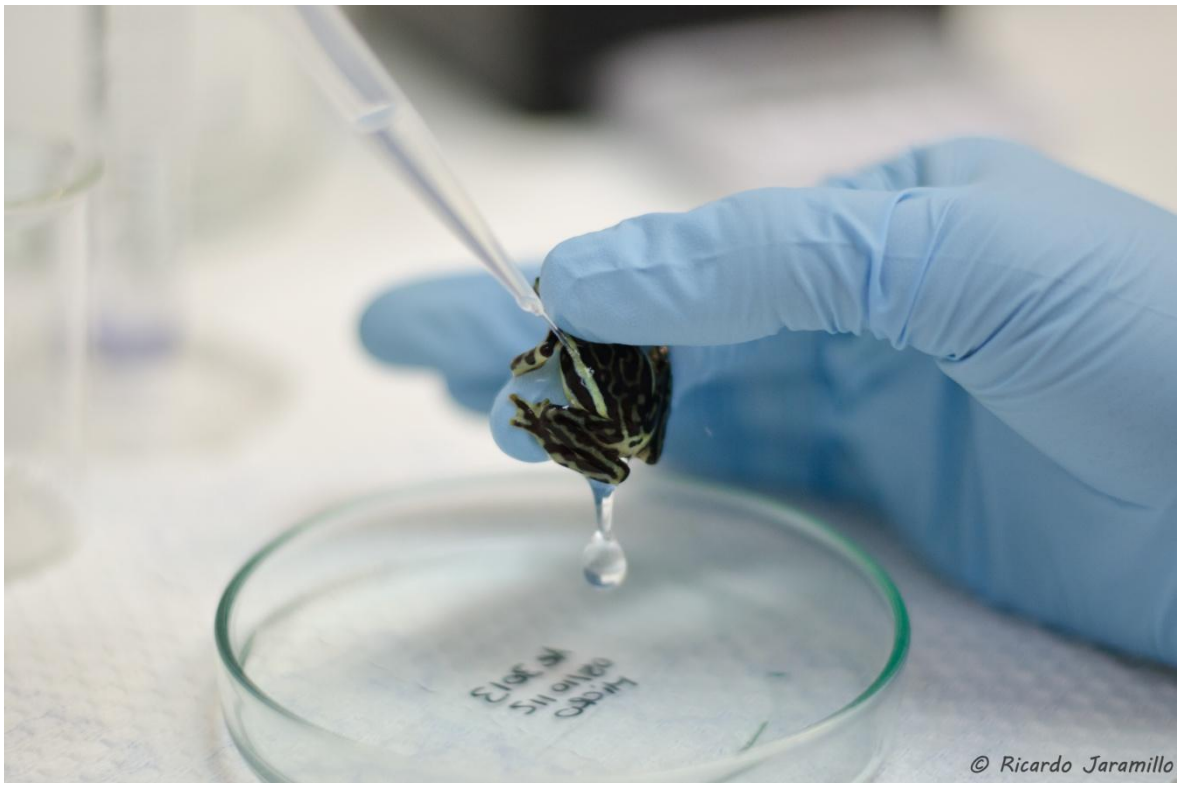


Figura 3. Recolección de secreción peptídica de *Atelopus elegans*

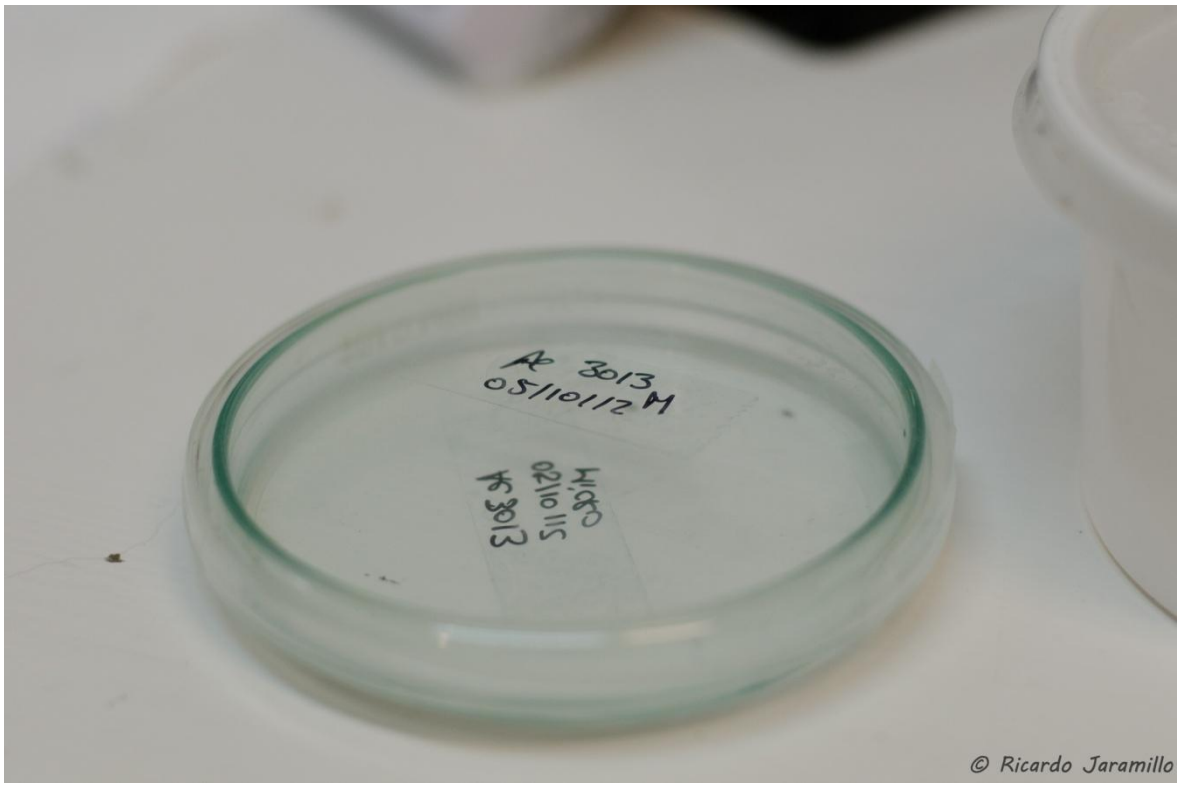


Figura 4. **Caja Petri con la colección de secreción peptídica de *Atelopus elegans***

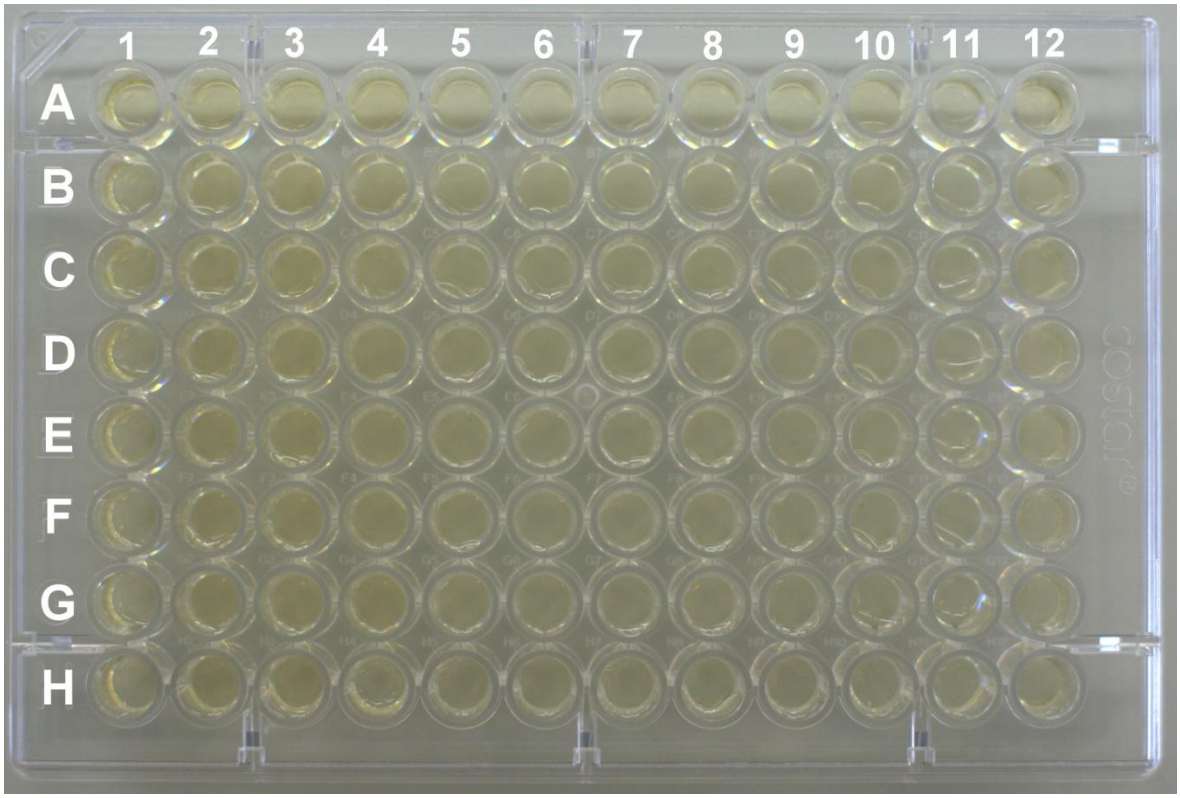


Figura 5. **Placa de ELISA utilizada en los ensayos de inhibición peptídica**

Columnas: **1**, 2000,0 µg/ml; **2**, 1000,0 µg/ml; **3**, 500,0 µg/ml; **4**, 250,0 µg/ml; **5**, 125,0 µg/ml; **6**, 62,5 µg/ml; **7**, 31,3 µg/ml; **8**, 15,6 µg/ml; **9**, 7,8 µg/ml; **10**, 3,9 µg/ml; **11**, Control positivo y **12**, Control negativo. Las filas de la A a la H constituyen las repeticiones de las bacterias.



Figura 6. Porcentajes del origen de los aislados clínicos resistentes a carbapenemes

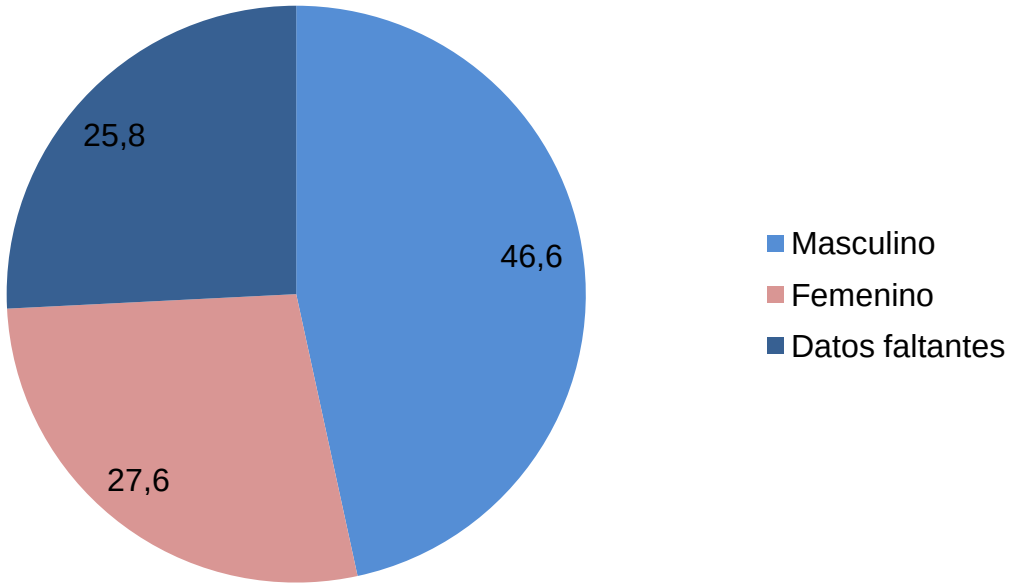


Figura 7. Porcentaje de origen de los aislados según el género

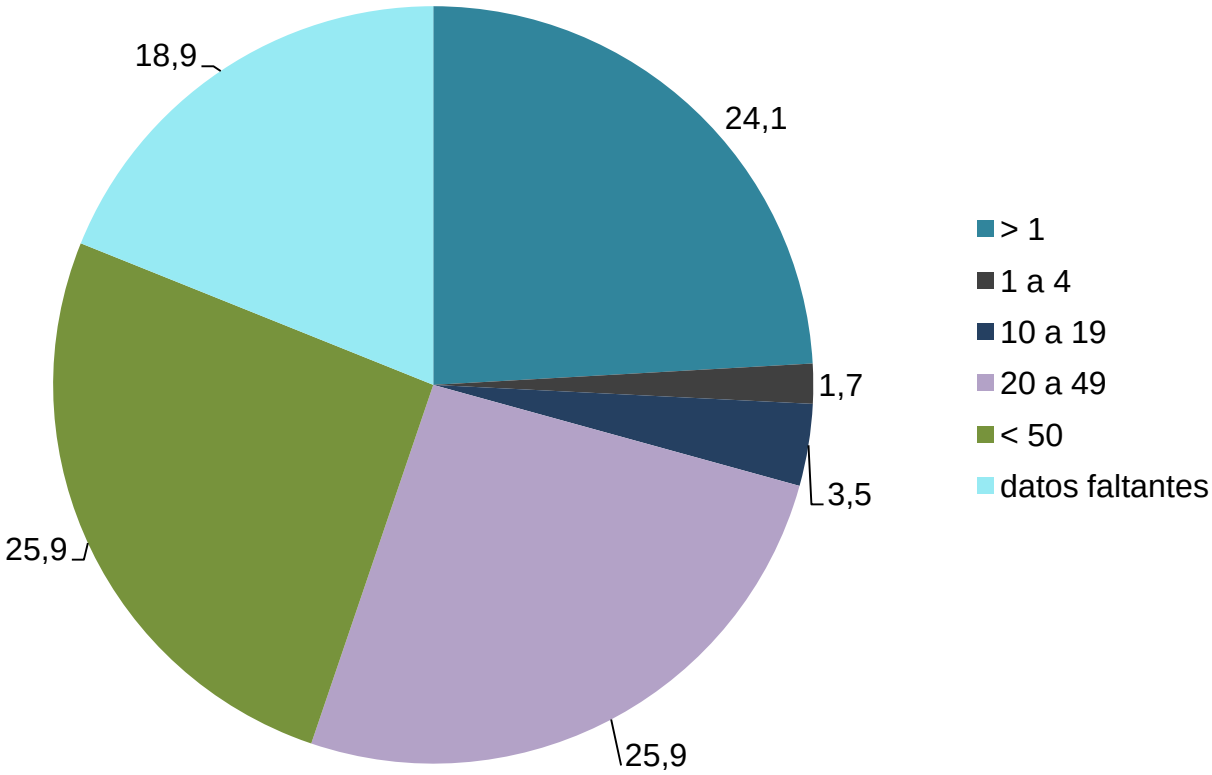


Figura 8. **Porcentaje de origen de los aislados según las edades de los pacientes**

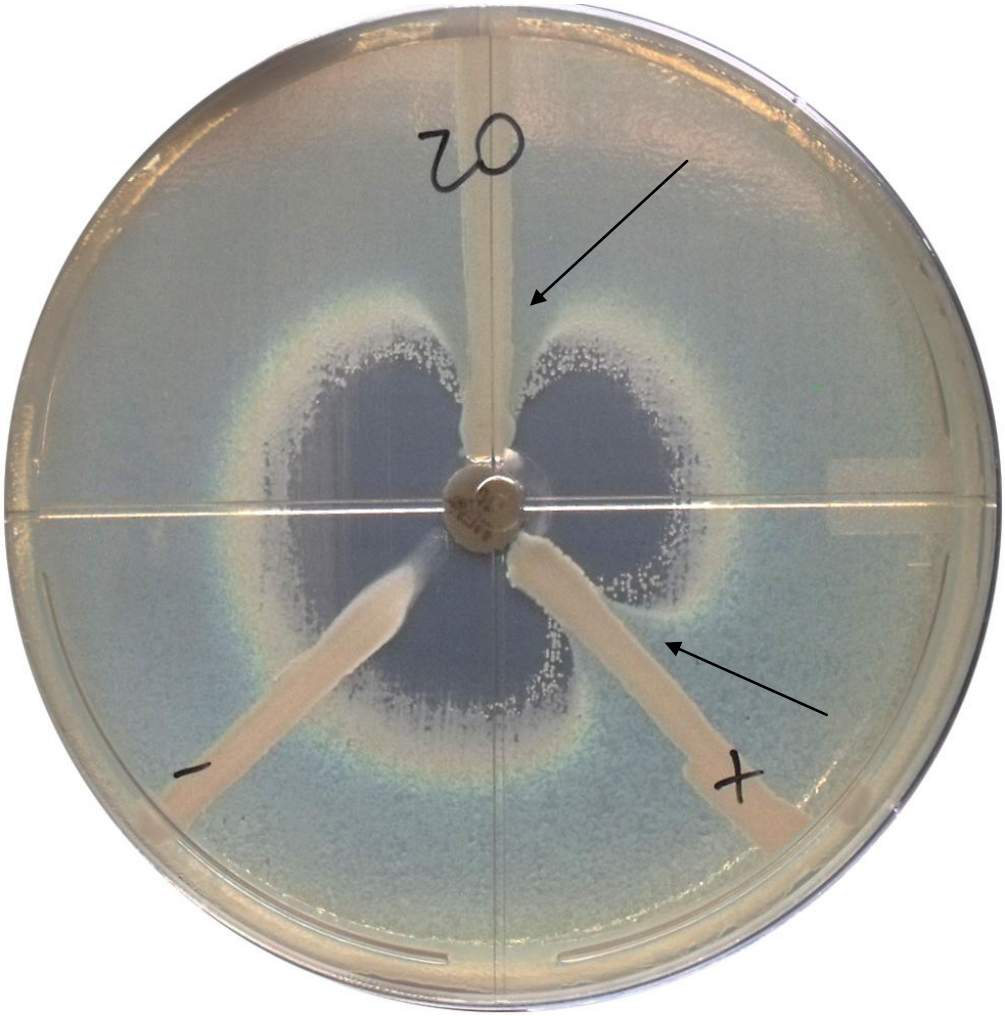


Figura 9. Placa de MHT positivo para la cepa analizada. La presencia de hoja de trébol evidencia la producción de carbapenemasas de parte de la bacteria. +, Control positivo de KPC; -, Control negativo de KPC; 20, Muestra a analizar CB-QCA 3439. Las flechas muestran la hendidura en forma de hoja de trébol.

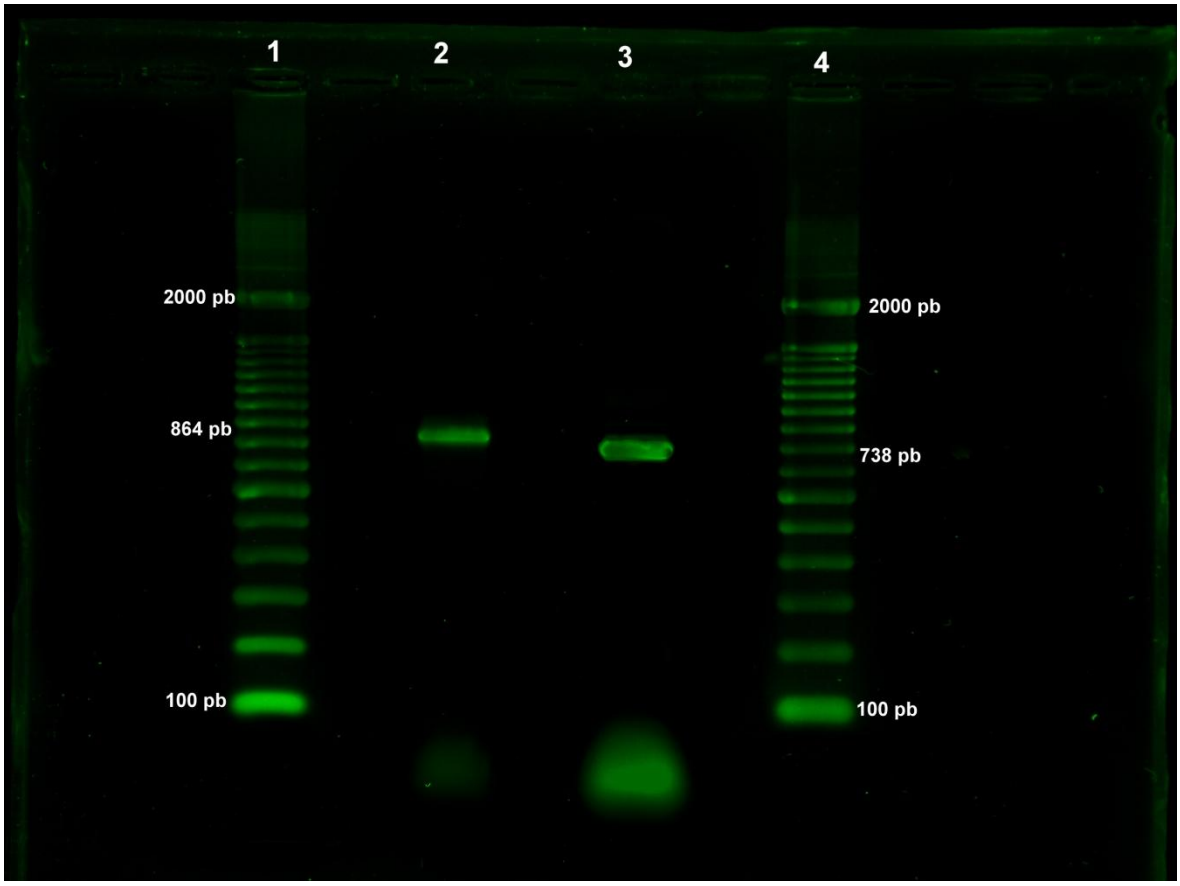


Figura 10. Gel representativo de la detección de los genes *bla*$_{GES}$ y *bla*$_{KPC}$ en los aislados clínicos. **1**, Marcador de peso molecular (100 pb); **2**, gen *bla*$_{GES}$ con un peso molecular de 864 pb; **3**, gen *bla*$_{KPC}$ con un peso molecular de 738 pb; **4**, Marcador de peso molecular (100 pb).

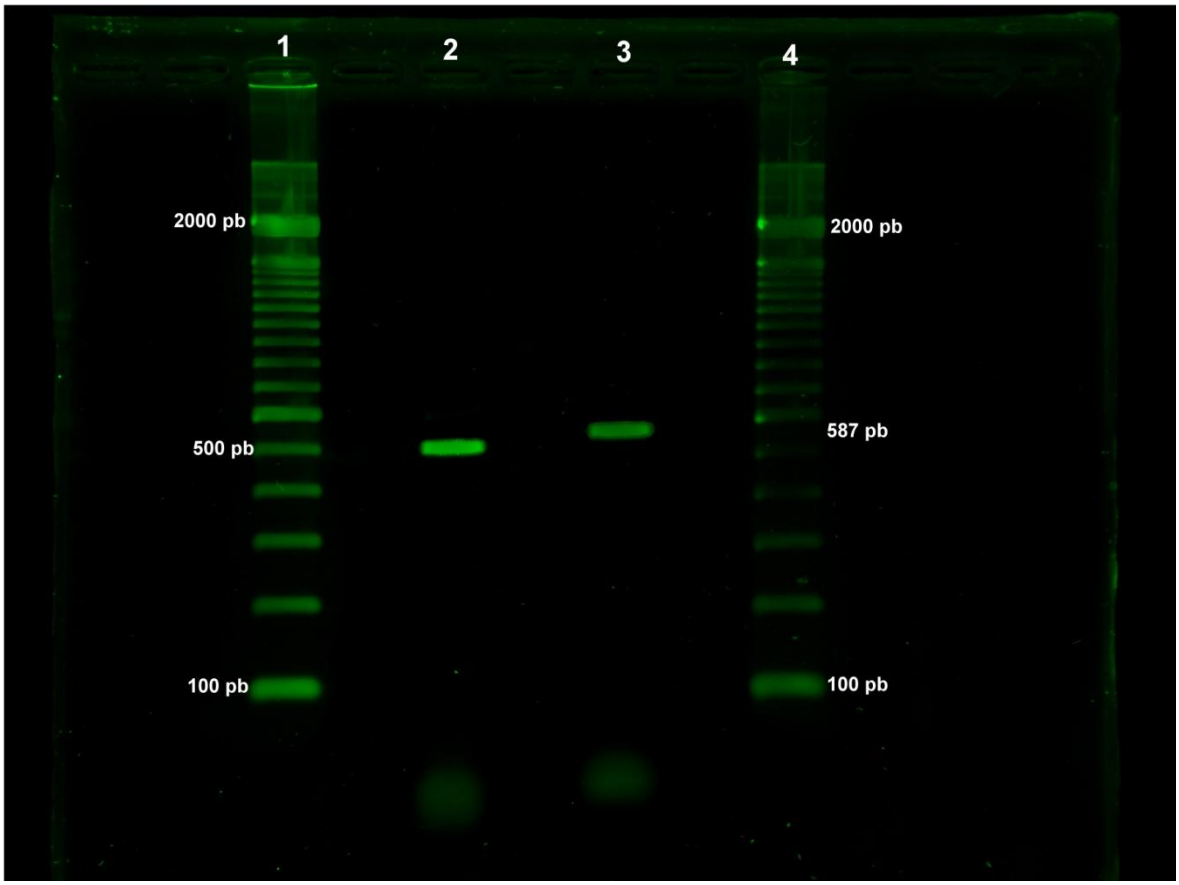


Figura 11. Gel representativo de la detección de los genes *bla*$_{VIM}$ y *bla*$_{IMP}$ en los aislados clínicos. 1, Marcador de peso molecular (100 pb); **2**, gen *bla*$_{VIM}$ con un peso molecular de 500 pb; **3**, gen *bla*$_{IMP}$ con un peso molecular de 587 pb; **4**, Marcador de peso molecular (100 pb).

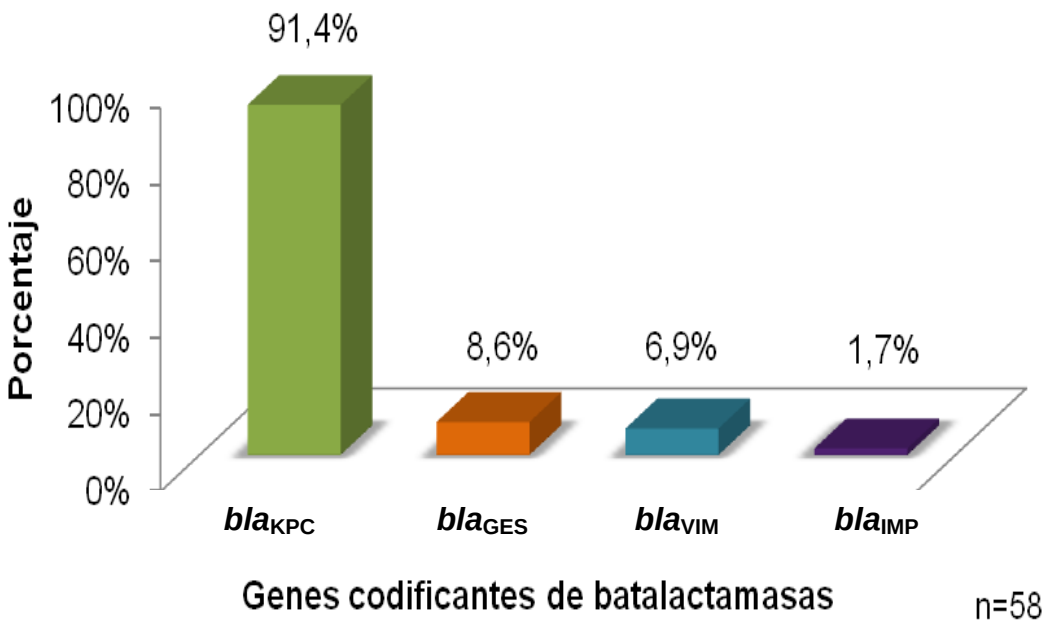


Figura 12 **Frecuencia en la presencia de genes codificantes para betalactamasas en los aislados hospitalarios analizados entre noviembre de 2009 a mayo de 2012** Esta población fue previamente seleccionada y solo se encuentran los aislados resistentes a carbapenemes durante el período de análisis.

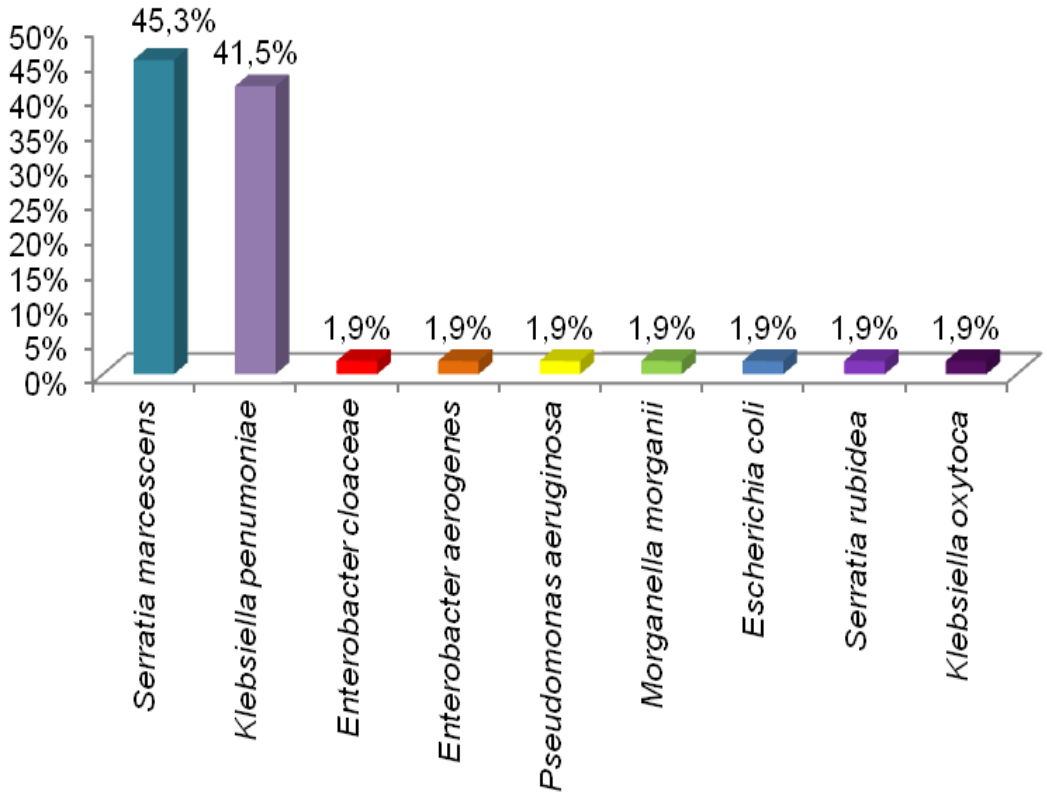


Figura 13. Porcentaje de aislados hospitalarios resistentes a carbapenemes por especie

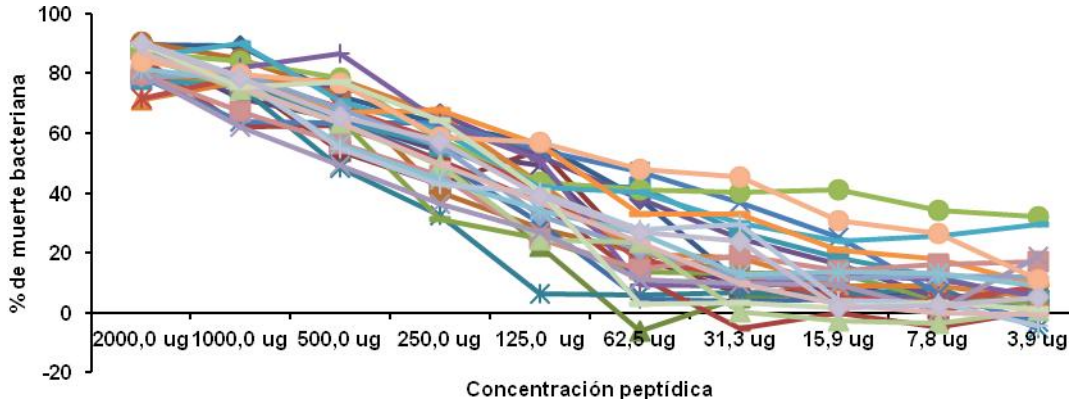


Figura 14. Porcentaje de muerte de bacterias de la especie *Serratia marcescens* frente al péptido antimicrobiano de *Atelopus elegans.* Cada color representa una cepa bacteriana independiente.

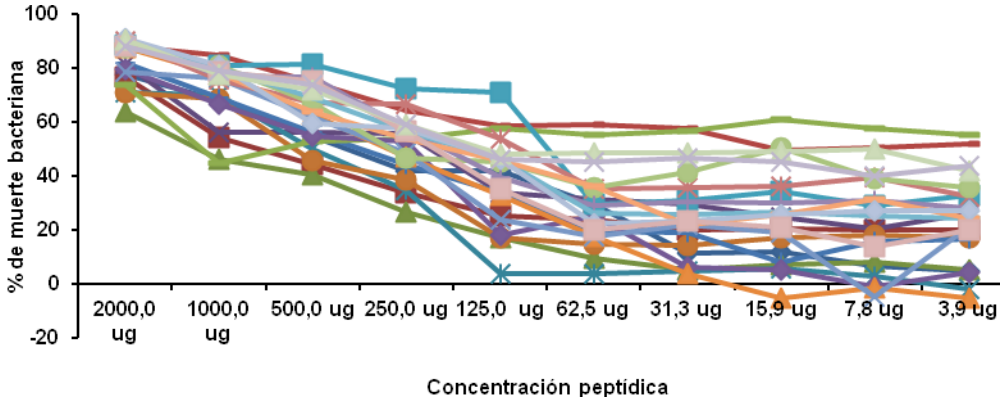


Figura 15. Porcentaje de muerte de bacterias de la especie *Klebsiella pneumoniae* frente al péptido antimicrobiano de *Atelopus elegans.* Cada color representa una cepa bacteriana independiente.

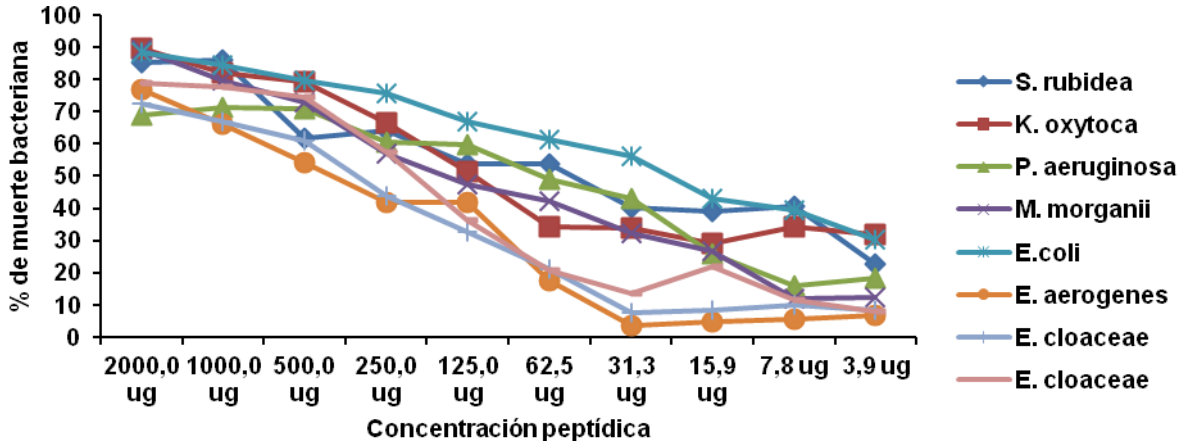


Figura 16. Porcentaje de muerte de bacterias frente al péptido antimicrobiano de *Atelopus elegans*

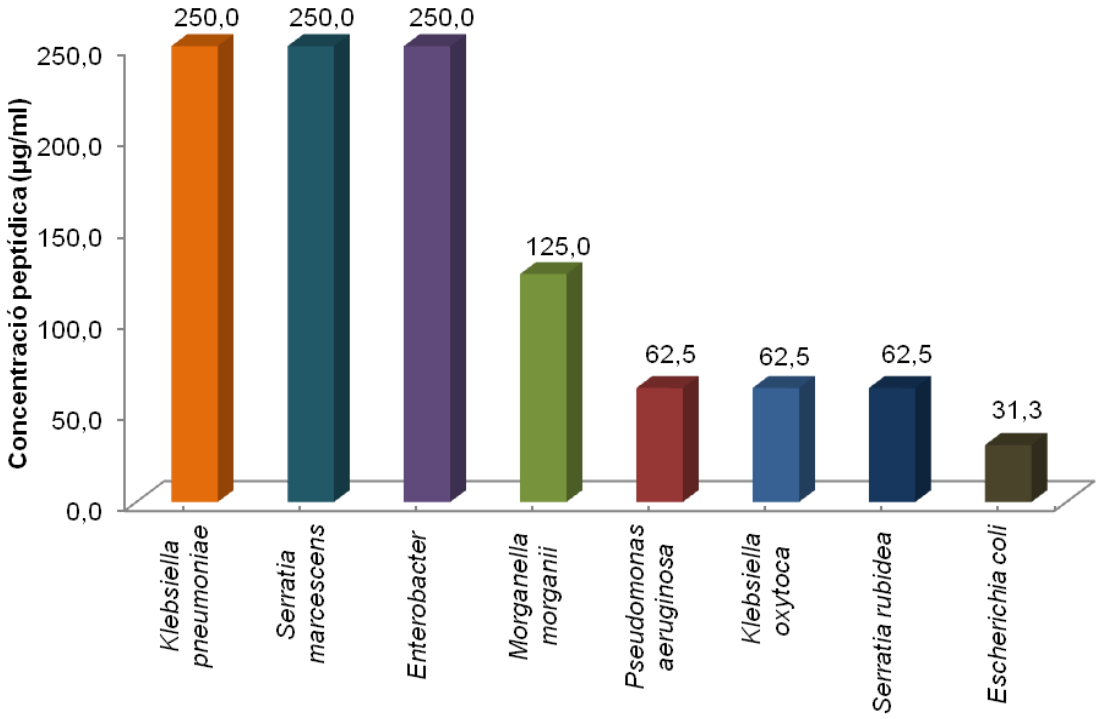


Figura 17. Figura representativa de la Concentración Inhibitoria Mínima 50 para las especies analizadas

10 TABLAS

Tabla 1. Datos de origen de los aislados clínicos analizados

CÓDIGO PUCE	SEXO DEL PACIENTE	EDAD	MUESTRA	IDENTIFICACIÓN
CB-QCA 3419	M	65 años	Esputo	*S. rubidea*
CB-QCA 3420	F	26 años	Sangre	*S. marcescens*
CB-QCA 3421	SD	4 días	Sangre	*S. marcescens*
CB-QCA 3422	F	50 años	Sec. Traqueal	*S. marcescens*
CB-QCA 3423	SD	19 años	Sangre	*S. marcescens*
CB-QCA 3424	M	27 años	Herida Pierna	*S. marcescens*
CB-QCA 3425	M	86 años	Esputo	*S. marcescens*
CB-QCA 3426	M	4 años	Orina	*S. marcescens*
CB-QCA 3427	SD	R.N.	Sangre	*S. marcescens*
CB-QCA 3428	M	35 años	Esputo	*S. marcescens*
CB-QCA 3429	M	42 años	Herida tórax	*S. marcescens*
CB-QCA 3430	M	48 años	Úlcera de muslo	*S. marcescens*
CB-QCA 3431	F	52 años	Sec. Traqueal	*S. marcescens*
CB-QCA 3432	M	20 años	Histopatología tibia	*S. marcescens*
CB-QCA 3433	M	32 años	Sec. Herida tibia	*S. marcescens*
CB-QCA 3435	M	24 años	Líquido subgaleal	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3436	M	SD	Sangre	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3437	M	SD	Orina	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3438	M	29 años	Biopsia de tobillo	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3439	F	51 años	Sec. Traqueal	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3440	M	46 años	Sec. Traqueal	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3441	F	71 años	Absceso Peritoneal	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3442	M	44 años	Muslo	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3443	SD	Neonatos	Sangre	*S. marcescens*
CB-QCA 3444	SD	Neonatos	Sangre	*S. marcescens*
CB-QCA 3445	SD	Neonatos	Sangre	*S. marcescens*
CB-QCA 3446	SD	Neonatos	Sangre	*S. marcescens*
CB-QCA 3447	SD	Neonatos	Sangre	*S. marcescens*

SD, Sin datos.

CÓDIGO PUCE	SEXO DEL PACIENTE	EDAD	MUESTRA	IDENTIFICACIÓN
CB-QCA 3448	SD	Neonatos	SD	*S. marcescens*
CB-QCA 3449	SD	Neonatos	SD	*S. marcescens*
CB-QCA 3450	M	16 años	Muslo Derecho	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3451	SD	SD	SD	*P. aeruginosa*
CB-QCA 3459	M	2 meses	Orina	*S. marcescens*
CB-QCA 3460	M	SD	Hemocultivo	*S. marcescens*
CB-QCA 3461	M	SD	Orina	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3462	M	SD	SD	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3463	M	SD	Sangre	*K. oxytoca*
CB-QCA 3464	M	64 años	Aspirado traqueal	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3465	F	85 años	Orina	*E. aerogenes*
CB-QCA 3466	M	SD	Aspirado traqueal	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3467	F	62 años	Lavado broncoalveolar	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3468	F	70 años	Fístula Esternal	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3469	M	18 días	Sangre	*S. marcescens*
CB-QCA 3470	SD	21 días	SD	*E. cloaceae*
CB-QCA 3471	SD	4 días	Sangre	*S. marcescens*
CB-QCA 3472	SD	12 días	Sangre	*S. marcescens*
CB-QCA 3473	F	32 años	Lig. Peritoneal	*S. marcescens*
CB-QCA 3474	F	SD	Aspirado traqueal	*S. marcescens*
CB-QCA 3475	F	56 años	Aspirado traqueal	*M. morganii*
CB-QCA 3476	F	SD	Orina	*E. coli*
CB-QCA 3477	M	SD	Sec. Gastromo	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3478	F	69 años	Secreción fístula	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3479	M	38 años	Aspirado traqueal	*E. cloaceae*
CB-QCA 3480	M	21 años	Sangre	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3481	F	60 años	Secreción de herida quirúrgica	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3482	M	48 años	Aspirado traqueal	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3483	F	57 años	Líquido Pared abdominal	*K. pneumoniae*
CB-QCA 3484	F	51 años	Sangre	*K. pneumoniae*

Tabla 2. Primers utilizados para la detección de los genes

Primer	Secuencia	Blanco	Amplicón	Referencia
KPC forward	CGGAACCATTCGCTAAACTC	*bla*$_{KPC}$	738 pb	Iñiguez *et al*., 2010
KPC reverse	GGCCTCGCTGTRCTTGTCAT	*bla*$_{KPC}$	738 pb	Iñiguez *et al*., 2010
GES 1A forward	ATGCGCTTCATTCACGCAC	*bla*$_{GES}$	864 pb	Poirel *et al*., 2000
GES 1B reverse	CTATTTGTCCGTGCTCAGG	*bla*$_{GES}$	864 pb	Poirel *et al*., 2000
VIM forward	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	*bla*$_{VIM}$	500 pb	Pitout *et al*., 2005
VIM reverse	AATGCGAGCACCAGGATAG	*bla*$_{VIM}$	500 pb	Pitout *et al*., 2005
IMP forward	GAAGGYGTTTATGTTCATAC	*bla*$_{IMP}$	587 pb	Pitout *et al*., 2005
IMP reverse	GTAMGTTTCAAGAGTGATG	*bla*$_{IMP}$	587 pb	Pitout *et al*., 2005

Tabla 3. Programas de amplificación utilizados para la identificación genotípica de los genes analizados

Gen	Programa de amplificación
bla$_{KPC}$ y *bla*$_{GES}$	Denaturación inicial de 94 °C por 5 minutos 35 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 segundos Hibridización de 55 °C durante 30 segundos Extensión de 72 °C por 30 segundos Extensión final de 10 minutos a 72 °C
bla$_{VIM}$ y *bla*$_{IMP}$	Denaturación inicial de 95 °C por 5 minutos 30 ciclos de denaturación a 95 °C por 1 minuto Hibridización de 52 °C por 1 minuto Extensión de 72 °C por 2 minutos Extensión final de 10 minutos a 72 °C

Tabla 4. Número de individuos de *Atelopus elegans* utilizados para la extracción de secreciones. El código del terrario es el código en la Balsa de los Sapos.

Número	Código de terrario*
1	624
2	1663
3	1715
4	2173
5	2610
6	2611
7	2688
8	2728
9	2762
10	2762
11	2763
12	2764
13	2953
14	3013
15	3040
16	3215
17	3215
18	3218
19	3219
20	3221
21	3223
22	3224
23	3224
24	3225
25	3225
26	3232
27	3233
28	3248
29	3292
30	3295
31	3296
32	3316

Tabla 5. Porcentaje de aislados hospitalarios pertenecientes a las diferentes especies analizadas

Identificación	Porcentaje
Serratia marcescens	48,3
Kelbsiella pneumoniae	37,9
Enterobacter cloaceae	3,5
Enterobacter aerogenes	1,7
Pseudomonas aeruginosa	1,7
Morganella morganii	1,7
Escherichia coli	1,7
Klebsiella oxytoca	1,7
Serratia rubidea	1,7
TOTAL	**100,0**

Tabla 6. Resultados bioquímicos característicos de las diferentes especies bacterianas analizadas

CIT	K/A	H_2S	Gas	RM	MOT	IND	LYS	ÚREA	FA	ORN	Identificación
+	A/A	-	+	-	-	-	+	+	-	-	*Klebsiella pneumoniae*
+	A/A	-	+	-	-	+	+	+	-	-	*Klebsiella oxytoca*
+	K/A	-	+	+	+	-	+	-	-	-	*Serratia marcescens*
+	A/A	-	-	-	+	-	+	-	-	+	*Serratia rubidea*
+	A/A	-	+	-	+	-	+	-	-	+	*Enterobacter aerogenes*
+	A/A	-	+	-	+	-	-	-	-	+	*Enterobacter cloaceae*
-	K/A	-	+	+	+	-	+	-	+	+	*Morganella morganii*
-	A/A	-	+	+	+	+	+	+	-	+	*Escherichia coli*

CIT, citrato; K, alcalino, A, ácido, H2S, gas sulfídrico; RM, tipo de fermentación; MOT, motilidad; IND, tindol; LYS, lisina; Urea, úrea; FA, fenilalanina; ORN, ornitina +, prueba positiva; -, prueba negativo.

Tabla 7. **Presencia y ausencia de los genes *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{GES}$, *bla*$_{VIM}$ y *bla*$_{IMP}$.** El número “1” representa presencia y el número “0” representa ausencia.

CÓDIGO PUCE	IDENTIFICACIÓN	*bla*$_{KPC}$	*bla*$_{GES}$	*bla*$_{IMP}$	*bla*$_{VIM}$
CB-QCA 3419	*Serratia rubidea*	1	0	0	0
CB-QCA 3420	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3421	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3422	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3423	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3424	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3425	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3426	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3427	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3428	*S. marcescens*	0	0	0	0
CB-QCA 3429	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3430	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3431	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3432	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3433	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3435	*K. pneumoniae*	1	0	0	0
CB-QCA 3436	*K. pneumoniae*	1	0	0	0
CB-QCA 3437	*K. pneumoniae*	1	0	0	0
CB-QCA 3438	*K. pneumoniae*	1	0	0	0
CB-QCA 3439	*K. pneumoniae*	1	0	0	0
CB-QCA 3440	*K. pneumoniae*	1	0	0	0
CB-QCA 3441	*K. pneumoniae*	1	0	0	0
CB-QCA 3442	*K. pneumoniae*	1	1	0	0
CB-QCA 3443	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3444	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3445	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3446	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3447	*S. marcescens*	1	0	0	0

Tabla 7. Presencia y ausencia de los genes *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{GES}$, *bla*$_{VIM}$ y *bla*$_{IMP}$ (Continuación)

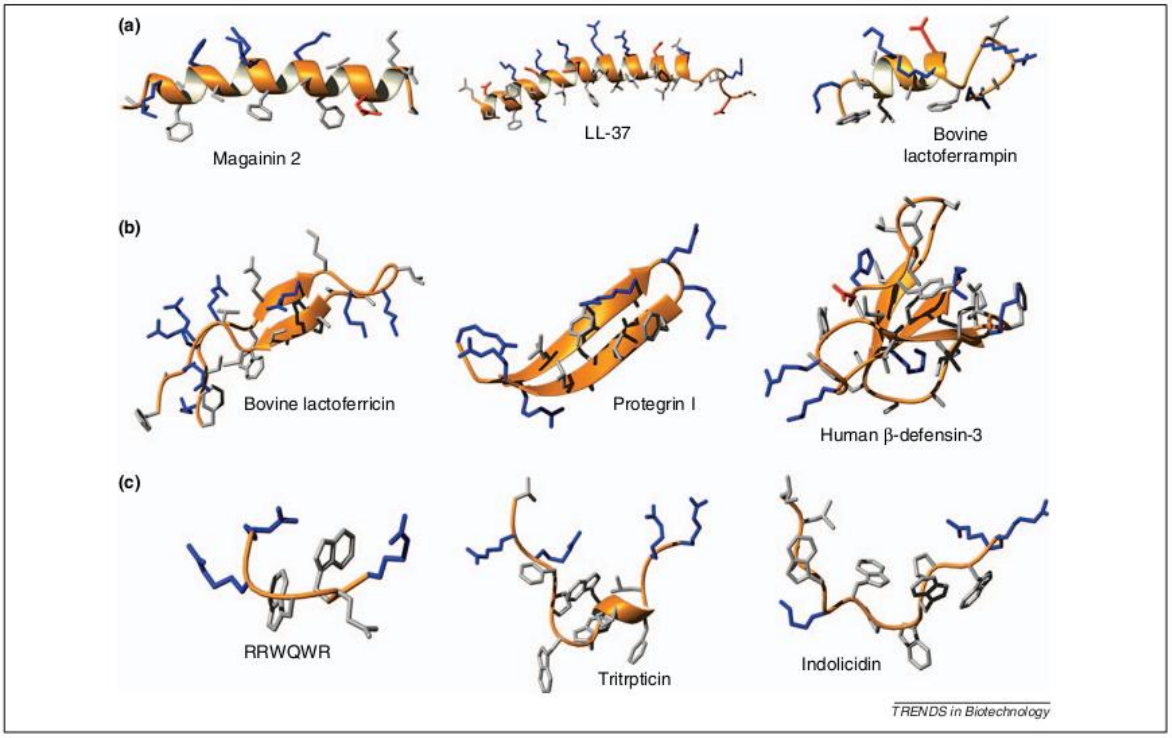
CÓDIGO PUCE	IDENTIFICACIÓN	*bla*$_{KPC}$	*bla*$_{GES}$	*bla*$_{IMP}$	*bla*$_{VIM}$
CB-QCA 3448	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3449	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3450	*K. pneumoniae*	1	0	0	0
CB-QCA 3451	*P. aeruginosa*	1	0	0	0
CB-QCA 3461	*K. pneumoniae*	1	0	0	0
CB-QCA 3462	*K. pneumoniae*	1	1	0	0
CB-QCA 3463	*K. oxytoca*	1	1	0	0
CB-QCA 3464	*K. pneumoniae*	1	0	0	0
CB-QCA 3465	*E. aerogenes*	1	0	0	0
CB-QCA 3466	*K. pneumoniae*	1	0	0	0
CB-QCA 3467	*K. pneumoniae*	1	1	0	0
CB-QCA 3468	*K. pneumoniae*	1	1	0	0
CB-QCA 3469	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3470	*E. cloaceae*	1	0	0	0
CB-QCA 3471	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3472	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3473	*S. marcescens*	1	0	0	0
CB-QCA 3474	*S. marcescens*	0	0	1	0
CB-QCA 3475	*M. morganii*	1	0	0	1
CB-QCA 3476	*E. coli*	1	0	0	0
CB-QCA 3477	*K. pneumoniae*	1	0	0	1
CB-QCA 3478	*K. pneumoniae*	1	0	0	1
CB-QCA 3479	*E. cloaceae*	0	0	0	0
CB-QCA 3480	*K. pneumoniae*	1	0	0	0
CB-QCA 3481	*K. pneumoniae*	1	0	0	1
CB-QCA 3482	*K. pneumoniae*	1	0	0	0
CB-QCA 3483	*K. pneumoniae*	1	0	0	0
CB-QCA 3484	*K. pneumoniae*	1	0	0	0

Tabla 8. **Valores promedio de mortalidad bacteriana de *Klebsiella pneumoniae* y de *Serratia marcescens* frente a las secreciones peptídicas de *Atelopus elegans***

Concentración peptídica	*Klebsiella pneumoniae* (22 aislados)	*Serratia marcescens* (28 aislados)
2000,0 µg	82,9	83,1
1000,0 µg	71,4	76,9
500,0 µg	61,8	66,1
250,0 µg	51,3	52,9
125,0 µg	38,2	39,0
62,5 µg	28,9	22,8
31,3 µg	26,3	16,4
15,8 µg	25,9	11,6
7,8 µg	23,5	8,1
3,9 µg	24,0	7,2

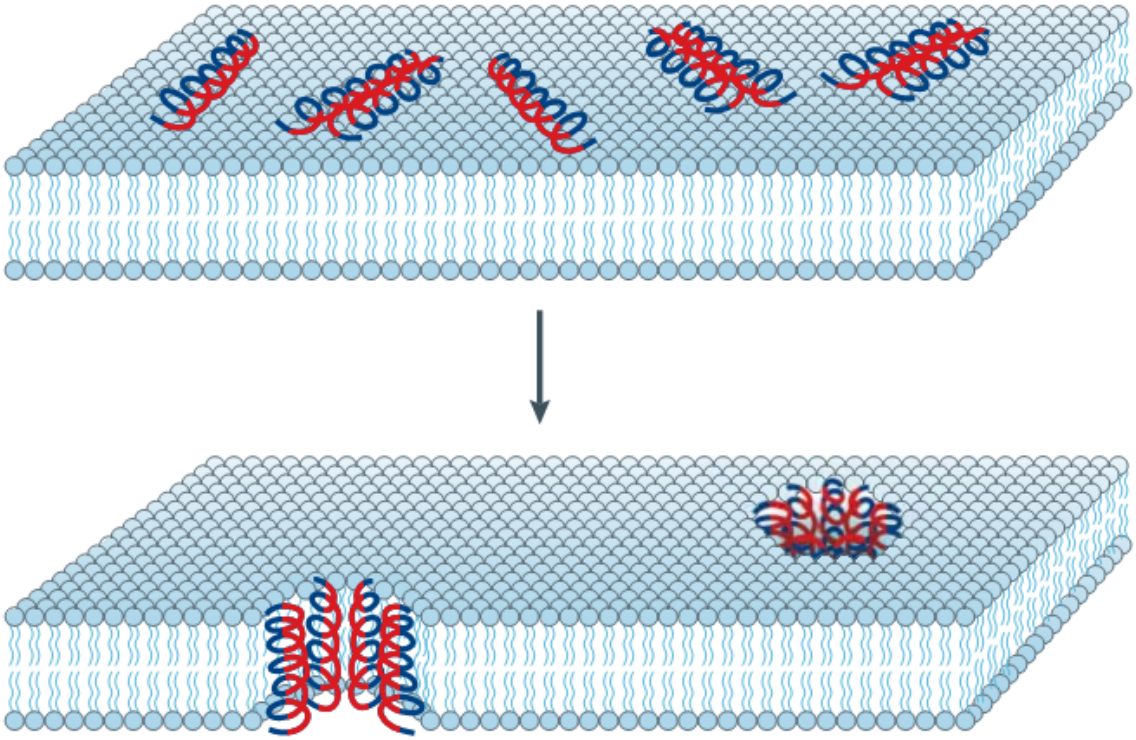
11 ANEXOS

Anexo 1. Estructuras principales de los péptidos antimicrobianos (AMPs). a, péptidos tipo α-hélice; **b**, péptidos tipo hoja plegada β, **c**, péptidos lineares.



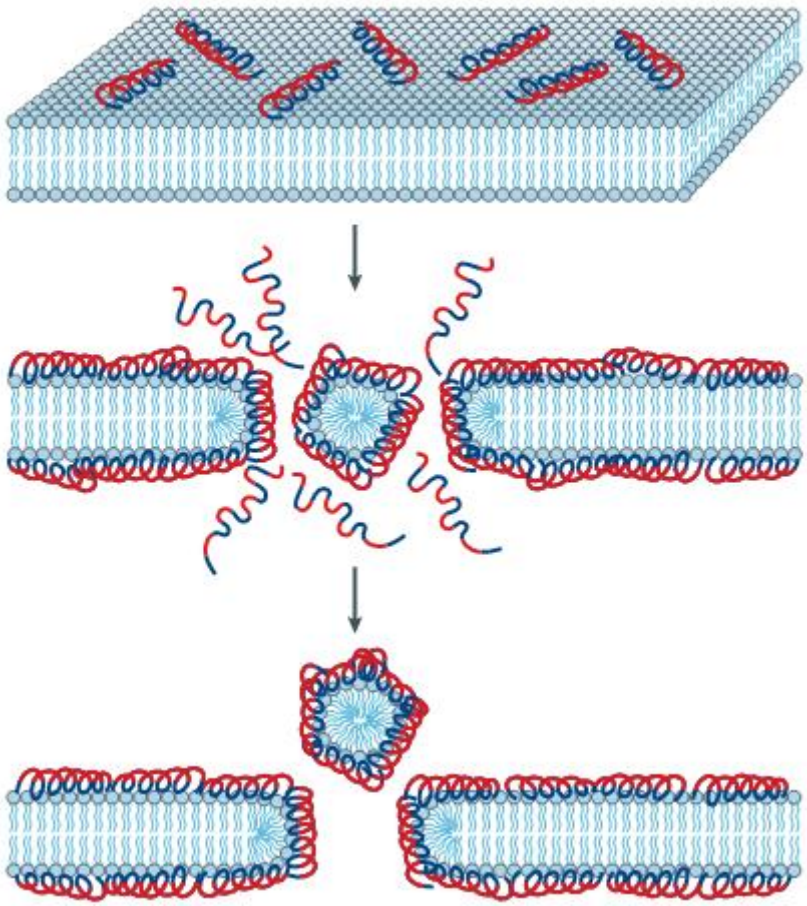
Tomado de (Nguyen *et al.*, 2011)

Anexo 2. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos con el modelo de barreno



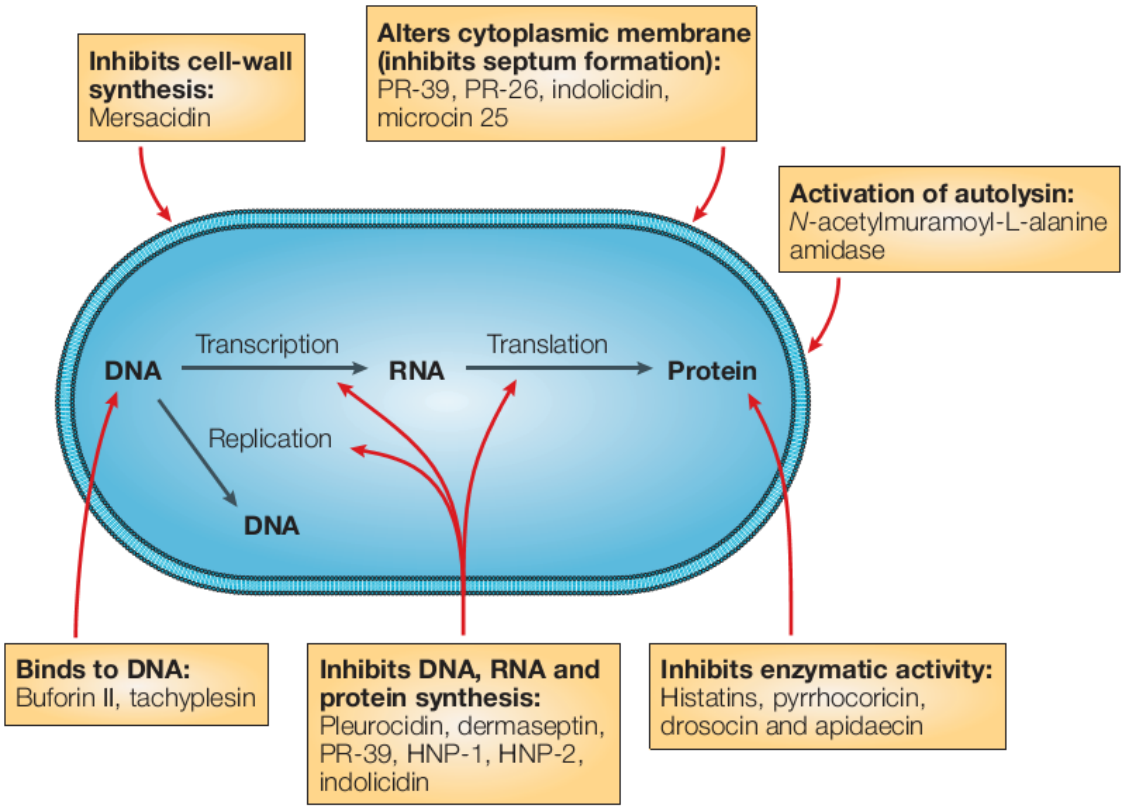
Tomado de (Brogden, 2005)

Anexo 3. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos con el modelo tipo alfombra



Tomado de (Brogden, 2005)

Anexo 4. Blancos intracelulares de los péptidos antimicrobianos



Tomado de (Brogden, 2005)

Anexo 5. ANOVA de un factor de los datos obtenidos. LogCIM50, datos transformados a $\log_{10}$; CIM50, datos obtenidos a partir de la lectura de absorbancia de los ensayos antimicrobianos.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
LogCMI50	Inter-grupos	,487	2	,243	1,948	,154
	Intra-grupos	5,875	47	,125		
	Total	6,361	49			
CMI50	Inter-grupos	8810,257	2	4405,129	,187	,830
	Intra-grupos	1106269,364	47	23537,646		
	Total	1115079,622	49			

Anexo 6. Análisis descriptivo del ANOVA de un factor de los datos obtenidos. LogCIM50, datos transformados a $\log_{10}$; CIM50, datos obtenidos a partir de la lectura de absorbancia de los ensayos antimicrobianos.

Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
LogCMI50	SM	28	2,3317	,22279	,04210	2,2453	2,4181	1,76	2,71
	KPN	20	2,1424	,48652	,10879	1,9147	2,3701	1,05	2,81
	EC	2	2,4418	,19223	,13593	,7147	4,1690	2,31	2,58
	Total	50	2,2604	,36031	,05096	2,1580	2,3628	1,05	2,81
CMI50	SM	28	239,00	107,326	20,283	197,38	280,62	57	511
	KPN	20	223,87	202,585	45,299	129,06	318,68	10	647
	EC	2	289,24	124,433	87,987	-828,75	1407,23	201	377
	Total	50	234,96	150,853	21,334	192,09	277,83	10	647

Anexo 7. **Promedio +/-1 desviación estándar de la sensibilidad de tres especies de bacterias ante el péptido de *Atelopus elegans*.** El eje “Y” representa la absorbancia medida de las muestras y en el eje “X” se encuentran las tres especies analizadas. SM, *Serratia marcescens*; KPN, *Klebsiella pneumoniae* y EC, *Enterobacter cloaceae*.

