

Inhibición de enterobacterias portadoras de carbapenemasas con secreciones peptídicas de anfibios nativos ecuatorianos

Camila Cilveti¹, Miryan Rivera², Mercedes Rodríguez Riglos¹ e Iliana Alcocer¹

¹ Laboratorio de Microbiología, Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador
camcilveti@gmail.com

² Laboratorio de Citogenética de Anfibios, Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador

Recibido: 28, 06, 2013; aceptado: 16, 09, 2013

RESUMEN.- La resistencia bacteriana representa un problema para la salud pública, especialmente la producida por enzimas llamadas betalactamasas, que bloquean a un grupo importante de antibióticos, los betalactámicos, utilizados ampliamente para el tratamiento de infecciones en seres humanos. Las enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) son las más preocupantes, pues son un grupo importante dentro de la etiología de las infecciones tanto severas como no severas. Los carbapenemes son antibióticos betalactámicos para el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias BLEE, que están resultando ineficientes por el apareamiento de cepas resistentes a estos antibióticos. Ante la escasez de otras opciones terapéuticas, el presente estudio tuvo como objetivo caracterizar molecularmente carbapenemasas en enterobacterias y analizar su posible inhibición con secreciones peptídicas de un bufónido nativo ecuatoriano. Se caracterizaron 57 enterobacterias resistentes a carbapenemes de pacientes hospitalizados. Esta población fue caracterizada molecularmente, encontrándose los genes bla_{KPC} , bla_{GES} , bla_{VIM} y bla_{IMP} . Los genes con mayor prevalencia fueron bla_{KPC} y bla_{GES} , seguidos por bla_{VIM} y bla_{IMP} . Todos los aislados fueron inhibidos por el péptido. La concentración inhibitoria mínima fue 250 $\mu\text{g/ml}$ para *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes* y *E. cloacae*, 125 $\mu\text{g/ml}$ para *Morganella morganii*, 62.5 $\mu\text{g/ml}$ para *Klebsiella oxytoca* y *Serratia rubidaea* y 31.3 $\mu\text{g/ml}$ para *Escherichia coli*. La presencia de genes para betalactamasas en elementos móviles facilita su propagación. Por esta razón la importancia de analizar nuevos compuestos antimicrobianos.

PALABRAS CLAVES: betalactamasas, carbapenemes, concentración inhibitoria mínima, resistencia bacteriana, secreciones peptídicas

ABSTRACT.- Bacterial resistance to antibiotics represents a major public health problem, especially resist the one produced by betalactamases enzymes, which block an important antibiotic group, the betalactamic antibiotics. These antibiotics are widely used for the treatment of human infections. Extended spectrum betalactamase producing bacteria (ESBL) are of the greatest concern, since they are an important group in the etiology of both severe and non-severe infections. Carbapenems are betalactamic antibiotics for the treatment of ESBL bacterial infections and have become inefficient due to emerging carbapenem resistant strains. Given the lack of therapeutic options, the aims of this study were the molecular characterization of carbapenemase producing bacteria and possible inhibition of this enzyme with peptid secretions of a native Ecuadorian bufonid frog (Anura: Bufonidae). Fifty-seven carbapenem resistant enteric bacteria from hospitalized patients were characterized. The *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP} genes were molecularly identified from bacteria. The most prevalent genes were *bla*_{KPC} y *bla*_{GES}, followed by *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP}. Carbapenemase activity from every isolate was inhibited by the bufonid peptide. The minimal inhibitory concentration was 250 µg/ml for *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia cloacae*, 125 µg/ml for *Morganella morganii*, 62.5 µg/ml for *Klebsiella oxytoca* and *Serratia rubidaea* and 31.3 µg/ml for *Escherichia coli*. The betalactamase genes present in motile genetic elements facilitate the spread of these genes in bacterial populations. It is important to analyze new antimicrobial compounds to combat the spread of antibiotic-resistant bacterial pathogens.

KEYWORDS: betalactamase, carbapenem, minimal inhibitory concentration, bacterial resistance, peptidic secretions

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la resistencia antimicrobiana ha aumentado rápidamente, particularmente en el ambiente hospitalario. Los microorganismos resistentes 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).

Las infecciones causadas por bacterias gram negativas resistentes traen como consecuencia alta morbilidad y mortalidad

en pacientes críticamente enfermos. Los agentes más comúnmente utilizados para tratar infecciones de bacterias gram negativas resistentes son los betalactámicos, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, polimixinas y tigeciclina (Fraimow y Tsigrelis, 2011).

Dentro de los betalactámicos están los carbapenemes que son tradicionalmente considerados antibióticos de la última línea de defensa contra bacterias gram

negativas resistentes, especialmente para aquellos patógenos que producen betalactamasas de espectro extendido, BLEE. Sin embargo, el uso excesivo de estos antimicrobianos generó la aparición de resistencia a este grupo de antibióticos (Findlay *et al.*, 2012). Este tipo de resistencia se da por la producción de betalactamasas, que 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 ejercida por el uso de antibióticos, lo cual lleva al desarrollo de nuevas betalactamasas. Desde su descripción inicial, se han identificado alrededor de 900 betalactamasas y de estas, más de 300 son de tipo BLEE (Zurita, 2012).

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. Debido a las pocas opciones terapéuticas, se ha iniciado una búsqueda de compuestos que puedan inhibir el crecimiento de bacterias resistentes. Las glándulas granulares presentes en la piel de los anuros, sintetizan y almacenan polipéptidos de amplio espectro de actividad antimicrobiana. En la piel de los anuros estos péptidos se movilizan rápidamente después de una infección microbiana y actúan de una manera ágil para neutralizar un amplio rango de microbios. Los anfibios generan péptidos antimicrobianos (AMPs) que por síntesis química podrían convertirse en nuevos agentes antimicrobianos con

características superadoras respecto de los actualmente disponibles (Torcato *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2010).

Los péptidos antimicrobianos son armas evolutivamente antiguas y su amplia distribución en los reinos Animalia y Plantae sugiere que estos han cumplido un papel fundamental en el éxito evolutivo de organismos complejos (Rudi *et al.*, 2010; Rollins-Smith *et al.*, 2005; Papo y Shai, 2003).

Para poder interactuar con la célula 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 (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).

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 (Tennesen 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. Además, 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. Es por esto que el objetivo de este estudio fue comprobar la inhibición de enterobacterias portadoras de carbapenemasas con secreciones peptídicas de anfibios nativos ecuatorianos, identificación molecular de dichas enzimas y determinar su prevalencia relativa en aislados clínicos obtenidos en un centro de Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio.- Se analizaron 57 aislados: 28 aislados de *Serratia marcescens*, 22 aislados de *Klebsiella pneumoniae*, 2 aislados de *Enterobacter cloacae*, y 1 aislado de *Klebsiella oxytoca*,

Enterobacter aerogenes, *Escherichia coli*, *Serratia rubidaea* y *Morganella morganii*. Los aislados provienen de pacientes con diversas patologías atendidos en la red de salud pública y privada y donados por Zurita&Zurita Laboratorios.

Los aislados clínicos bacterianos 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.

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

Detección molecular de la presencia de los genes.- Para la extracción de DNA se utilizó el equipo comercial de extracción Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, con sujeción a las recomendaciones del fabricante.

Para la amplificación de cada gen se utilizaron *primers* específicos según la Tabla 1.

Tabla 1
 Set de Primers utilizados para la detección de los genes

Primer	Secuencia	Blanco	Amplicón	Referencia
KPC forward	CGGAACCATTCGCTAAACTC	<i>bla_{KPC}</i>	738 pb	Iñiguez <i>et al.</i> , 2010
KPC reverse	GGCCTCGCTGTRCTTGTCAT	<i>bla_{KPC}</i>	738 pb	Iñiguez <i>et al.</i> , 2010
GES 1A forward	ATGCGCTTCATTCACGCAC	<i>bla_{GES}</i>	864 pb	Poirel <i>et al.</i> , 2000
GES 1B reverse	CTATTGTCCGTGCTCAGG	<i>bla_{GES}</i>	864 pb	Poirel <i>et al.</i> , 2000
VIM forward	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	<i>bla_{VIM}</i>	500 pb	Pitout <i>et al.</i> , 2005
VIM reverse	AATGCGAGCACCAGGATAG	<i>bla_{VIM}</i>	500 pb	Pitout <i>et al.</i> , 2005
IMP forward	GAAGGYGTTTATGTTTCATAC	<i>bla_{IMP}</i>	587 pb	Pitout <i>et al.</i> , 2005
IMP reverse	GTAMGTTTCAAGAGTGATG	<i>bla_{IMP}</i>	587 pb	Pitout <i>et al.</i> , 2005

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. El programa para los genes *bla_{KPC}* y *bla_{GES}* consistió en una denaturación inicial a 94° C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de denaturación a 94° C por 30 segundos, hibridación 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.

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, hibridación 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.

Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis (125 V, 50 minutos) en geles de agarosa al 1 %

diluidos en tampón TBE (1X), en tampón de corrida TBE (0.5X). Se empleó como marcador de peso molecular ADN de 100 pb (Invitrogen). La tinción del gel se realizó con SYBR® Gold (Invitrogen™) y la visualización de las bandas se realizó en el sistema de captura de imagen Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ (BIO-RAD).

Extracción de la secreción peptídica de una especie de bufónido.- La extracción de la secreción peptídica se realizó en 32 individuos pertenecientes a la familia Bufonidae preservados en la Balsa de los Sapos de la PUCE. 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 estimuló a la rana mediante 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. Los péptidos diluidos fueron colectados en una caja Petri y congelados a -80°C para su posterior liofilización, para poder realizar los ensayos de sensibilidad antibiótica. Esto se realizó en la Balsa de los Sapos de la PUCE.

La liofilización se ejecutó 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.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de la secreción cutánea del bufónido.- Se utilizó la técnica de microdilución en caldo. Se realizaron 10 diluciones seriadas ($2000\ \mu\text{g/ml}$, $1000\ \mu\text{g/ml}$, $500\ \mu\text{g/ml}$, $250\ \mu\text{g/ml}$, $125\ \mu\text{g/ml}$, $62.5\ \mu\text{g/ml}$, $31.3\ \mu\text{g/ml}$, $15.6\ \mu\text{g/ml}$, $7.8\ \mu\text{g/ml}$ y $3.9\ \mu\text{g/ml}$) de los péptidos diluidos en $0.01\ \%$ de ácido acético y $0.2\ \%$ de Albúmina Sérica Bovina (BSA por sus siglas en inglés "Bovine Serum Albumin",

Invitrogen) (Wiegand *et al.*, 2008).

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 $620\ \text{nm}$.

Análisis estadístico.- Se realizó un ANOVA de un factor, una regresión Probit y una transformación de datos en el programa estadístico PASW Statistics versión 18 (Sánchez-Otero, 2010).

RESULTADOS

Detección molecular de la presencia de los genes.- La visualización de la PCR permitió identificar las diferentes bandas de los cuatro genes analizados. Al compararlas con la escalera de peso molecular se pudo evidenciar una banda de $738\ \text{pb}$ que corresponde al gen bla_{KPC} , una banda de $864\ \text{pb}$ perteneciente al gen bla_{GES} , una de $500\ \text{pb}$ del gen bla_{VIM} y una de $587\ \text{pb}$ que corresponde al gen bla_{IMP} (Figura 1).

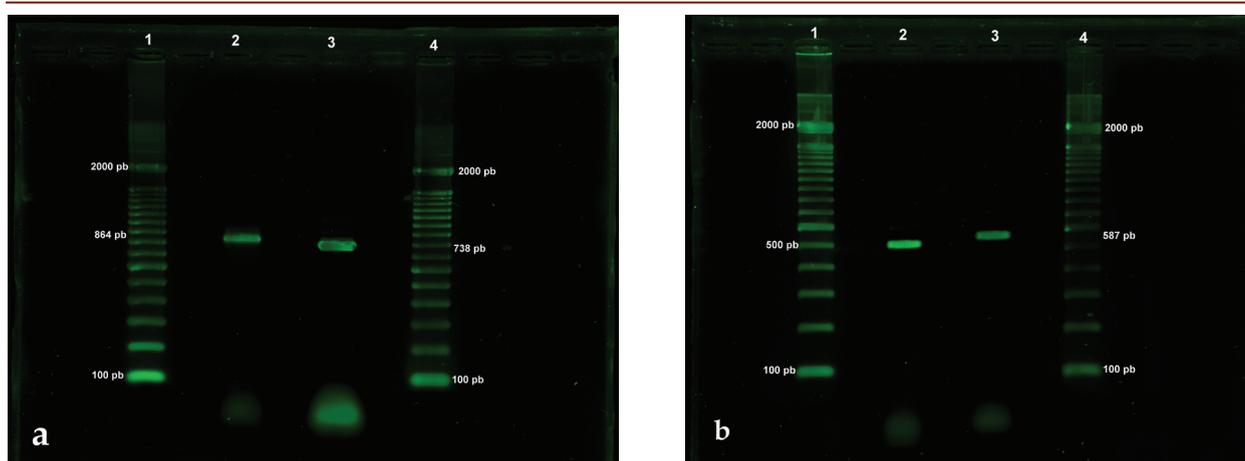


Figura 1. Geles representativos de la amplificación de los genes correspondientes a la resistencia a los carbapenemes. **1a.** Genes bla_{GES} y bla_{KPC} en los aislados clínicos. **1 y 4,** marcador de peso molecular ($100-2000\ \text{pb}$); **2,** gen bla_{GES} con un peso molecular de $864\ \text{pb}$; **3,** bla_{KPC} con un peso molecular de $738\ \text{pb}$. **1b.** Genes

*bla*_{VIM} y *bla*_{IMP} en los aislados clínicos. 1 y 4, marcador de peso molecular (100-2000 pb); 2, gen *bla*_{VIM} con un peso molecular de 500 pb; 3, gen *bla*_{IMP} con un peso molecular de 587 pb.

De los 57 aislados analizados, 52 (91.2 %) presentaron el gen *bla*_{KPC}, 5 (8.7 %) el gen *bla*_{GES}, 4 (7.0 %) el gen *bla*_{VIM} y únicamente 1 aislado (1.8 %) presentó el gen *bla*_{IMP} (Figura 2), con inclusión de los primeros registros de resistencia a carbapenemes para

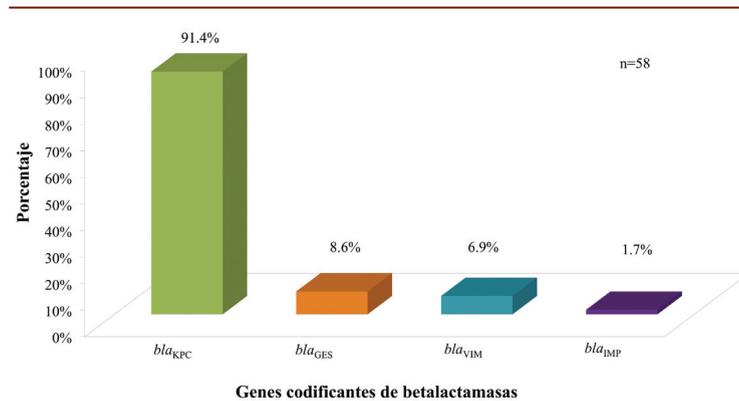


Figura 2. Frecuencia en la presencia de genes codificantes para betalactamasas en los aislados hospitalarios analizados entre noviembre de 2009 a mayo de 2012. Esta población fue previamente seleccionada y solo se encuentran los aislados resistentes a carbapenemes durante el período de análisis.

Serratia marcescens, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae*. En 9 ocasiones se encontró más de un gen en la misma cepa bacteriana.

pertencen a *Serratia marcescens*, 22 (42.3 %) son *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Escherichia coli*, *Serratia rubidaea* y *Klebsiella oxytoca* presentan únicamente un aislado (1.9 %) cada uno (Figura 3).

De los 52 aislados que presentaron resistencia a los carbapenemes, 24 (46.1 %)

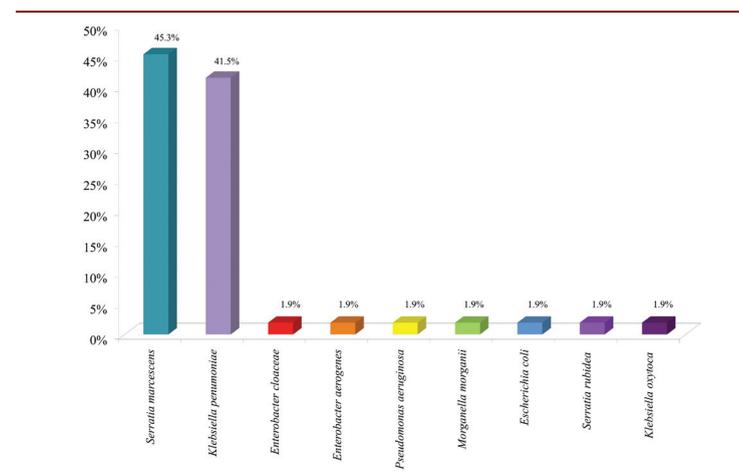


Figura 3. Porcentaje de aislados hospitalarios resistentes a carbapenemes por especie.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima 50 (CIM-50) de la secreción cutánea del bufónido.- Se analizaron 57 bacterias de aislados clínicos con secreciones peptídicas provenientes de 32 individuos pertenecientes a la familia Bufonidae.

Los resultados de los valores del péptido que eliminan a por lo menos el 50 % de las bacterias, mostraron que para *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, y *Enterobacter*, tanto *E. aerogenes* como *E. cloacae*, el valor es de 250 µg/ml, para *Morganella morganii* el valor de la CIM-50 es de 125 µg/ml, para *Klebsiella oxytoca* y *Serratia rubidaea* es de 62.5 µg/ml y para *Escherichia coli* es de 31.3 µg/ml como se puede ver en la Figura 4.

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. El análisis se realizó en tres especies: *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* y *Enterobacter cloacae*, debido a que las especies *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Klebsiella oxytoca* y *Serratia rubidaea* presentaron únicamente un aislado clínico y las pruebas estadísticas requieren, para estas especies, de más datos.

DISCUSIÓN

A pesar 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

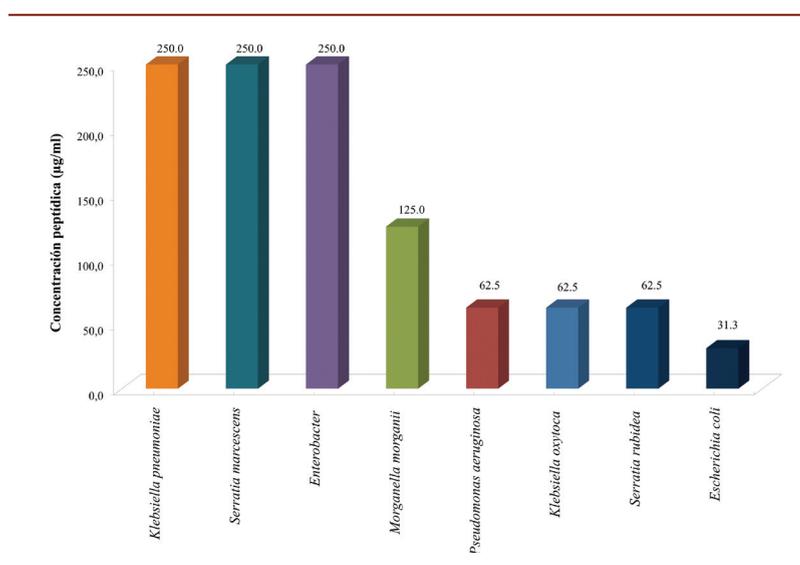


Figura 4. Figura representativa de la Concentración Inhibitoria Mínima 50 de la secreción peptídica de un bufónido para las especies analizadas.

relacionada con los betalactámicos. Esta resistencia se ha convertido en la principal preocupación tanto dentro como fuera del ambiente hospitalario (Bush, 2010).

Se ha demostrado que las enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y otras bacterias gram negativas, productoras de betalactamasas, son responsables de hasta un 60 % 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 mortalidades 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 carbapenemasas, hay una frecuencia de 91.2 % de bacterias con el gen *bla*_{KPC}. A pesar que en el año 2007 Walther-Rasmussen *et al.*, determinaron que la presencia de enzimas tipo serin-betalactamasas predomina 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 (8.7 %) 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 (8.7 %) 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 7.0 % y 1.8 %; respectivamente. Estos resultados concuerdan con estudios en donde plantean que las enzimas metalo-betalactamasas se han 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, con inclusión de Latinoamérica. Además, a pesar 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 menor que la de VIM (Zurita, 2012; Colón *et al.*, 2009).

Debido al aumento de la resistencia a antimicrobianos, especialmente a carbapenemes en enterobacterias, en este estudio se analizó la actividad antimicrobiana de las secreciones peptídicas de una especie perteneciente a la familia Bufonidae, en contra de las bacterias previamente identificadas como productoras de carbape-

nemasas. 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).

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 *E. cloacae* como *E. aerogenes*, el valor es de 250 $\mu\text{g/ml}$, el más alto del estudio.

En el caso de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter*, tanto *E. aerogenes* como *E. cloacae*, estas cuentan con una cápsula de polisacáridos (más gruesa en *Klebsiella*) que las hace más impermeables hacia diferentes proteínas. Además, al ser esta cápsula mucosa, dificulta el movimiento del péptido hacia la membrana externa con explicación del alto valor de CIM-50 necesario (250 $\mu\text{g/ml}$).

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.

Morganella morganii, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia rubidaea* y *Escherichia coli* presentan un valor de CIM que se encuentra entre 31.5 $\mu\text{g/ml}$ y 125.0 $\mu\text{g/ml}$; 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 esta especie y fue basado en la investigación realizada por Caicedo (2007) en el cual se utilizó la secreción cutánea de una especie de la familia Hylidae y demostró su alta actividad antimicrobiana a concentraciones desde 2000 $\mu\text{g/ml}$.

Sin embargo, Caicedo (2007) estableció que aquellas bacterias con CIM-50 peptídica igual o menor a 250 $\mu\text{g/ml}$ 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 son inhibidas por las secreciones peptídicas del bufónido con una CIM igual o menor a 250 $\mu\text{g/ml}$. Estudios previos de Chuang 2012, demuestran que los péptidos extraídos de individuos de la familia Hylidae no solo eliminan bacterias sino que también destruyen células cancerígenas a las mismas concentraciones (250 $\mu\text{g/ml}$).

Estos resultados pueden dar paso a estudios posteriores que puedan purificar la secreción total de la piel de los anfibios pertenecientes a la familia Bufonidae y así identificar las moléculas presentes en la secreción cutánea. Una vez identificados los componentes de la secreción, se pueden sintetizar moléculas análogas con mayor actividad antimicrobiana. Dentro de esta familia existe la producción de un péptido antimicrobiano llamado Buforin II, que destruye a la célula e impide la producción

de proteínas y la síntesis de DNA (Wang, 2010). Las moléculas sintetizadas de Buforin II muestran una actividad antimicrobiana, con CIM menor a 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Cho *et al.*, 2009). Además, las dermaseptinas son una familia de péptidos aislados de varias ranas del género *Phyllomedusa* spp. Los derivados sintéticos de la dermaseptina, como la dermaseptina S4 tienen actividad antimicrobiana con CIM menores a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Zairi *et al.*, 2007). Estos ejemplos demuestran la necesidad de continuar con estudios que permitan, a futuro, sintetizar nuevos compuestos derivados de moléculas secretadas de bufónidos que tengan el potencial de eliminar bacterias a menores concentraciones inhibitorias mínimas.

En vista de la gravedad a la cual 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 búsqueda de compuestos con potencial actividad antimicrobiana, que sean esperanzadores para ayudar a controlar este problema. 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, puede ayudar a crear una conciencia de conservación en

la gente y a prevenir la destrucción de sus hábitats.

CONCLUSIONES

- Los resultados del presente estudio representan el primer reporte de actividad antimicrobiana de las secreciones peptídicas de una especie de bufónido con enterobacterias resistentes a los carbapenemes. Todos los aislados estudiados fueron inhibidos por la secreción cutánea del bufónido.

- Los genes que codifican para serin-carbapenemasas bla_{KPC} y bla_{GES} fueron identificados con más frecuencia (91.2 % y 8.7 %) que aquellos que codifican para metalo-betalactamasas (7.0 % bla_{VIM} y 1.8 % bla_{IMP}).

- Este estudio demuestra por primera vez en el Ecuador, genes que codifican KPC en especies como *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae*.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras desean agradecer a Zurita&Zurita Laboratorios por la donación de cepas para el estudio. Al grupo de trabajo del laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas de la PUCE, al laboratorio de Citogenética de Anfibios, a la Balsa de los Sapos, al Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas y a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el apoyo económico que hizo posible este estudio a través del proyecto "Genotipaje de la resistencia a

antimicrobianos en bacterias entéricas productoras de carbapenemasas y su posible inhibición con secreciones peptídicas de anfibios con potencial de uso biomédico”.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. *Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas*, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Cho J, Sung B y Kim S. 2009. Buforins: Histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1788**(8): 1564–1569.
- Chuang PH. 2012. Evaluación de la actividad anticancerígena del extracto peptídico crudo de una especie perteneciente a la familia Hylidae en leucemias. *Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas*, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Colón EF, García ZB, Balderrama JZ, Zabalaga S, Dávalos JP, 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 GG 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 HS 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 REW y Chapple DS. 1999. *Peptide Antibiotics*, **43**(6): 1317–1323.
- Jared C, Antoniazzi MM, Jordão A, Silva J, Greven H y Rodrigues M. 2009. Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): their structure and functioning in passive defense. *Toxicon: Official Journal of the International*

- Society on Toxicology*, **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.
- Servicio de Antimicrobianos del INEI “Dr Carlos G. Malbrán” 2010. Diseminación de KPC en la Argentina. Informe del Programa Nacional de Control de Calidad en Bacteriología. INEI “Dr Carlos G. Malbrán”, Buenos Aires, Argentina.
- 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 Diseases*, **67**(2): 180–184. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.02.001.
- 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.
- Rollins-Smith L, King JD, Nielsen PF, Sonnevend A y Conlon JM. 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. 2002. Mode of Action of Active Antimicrobial Peptides. *Biopolymers*, **66**: 236–248.
- Takahashi D, Shukla SK, 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 MS. 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.
- Torcato IM, Castanho M y Henriques ST. 2012. The Application of Biophysical Techniques to Study Antimicrobial Peptides. *Spectroscopy: An International Journal*, **27**(5–6): 541–549.

doi:10.1155/2012/460702.

Urbán E, Nagy E, Pál T, Sonnevend A y Conlon JM. 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.

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

Wang G. 2010. Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies. CAB International. Massachusetts. 230 pp.

Wiegand I, Hilpert K, y Hancock REW. 2008. Agar and Broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, **3**(2): 163–175.

Zairi A, Tangy F, Ducos-Galand M, Alonso JM y Hani K. 2007. Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial peptides from amphibian skin, dermaseptin, and derivatives. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **57**: 319–324.

Zurita J. 2012. Resistencia Bacteriana en el Ecuador. *Centro de Publicaciones PUCE*, Quito, Ecuador. 143 pp.