

**Evaluación del efecto de un péptido antimicrobiano en bacterias
multirresistentes que circulan en el municipio de Cali, años 2017 y 2018**

Ashley Dayan Lugo Guevara

Director

Iván Darío Ocampo Ibáñez, PhD

Codirector

José Fernando Oñate Garzón, PhD

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia**

**Evaluación del efecto de un péptido antimicrobiano en bacterias
multirresistentes que circulan en el municipio de Cali, años 2017 y 2018**

Ashley Dayan Lugo Guevara

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Microbiólogo.**

**Director (a)
Iván Darío Ocampo Ibáñez, PhD
Codirector
José Fernando Oñate Garzón, PhD**

**Línea de Investigación:
Salud Pública
Grupo de Investigación:
GIMIA**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2020**

IMPACTOS

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico		
Responsabilidad social		
Científico	<ol style="list-style-type: none"> 1) Presentación en el IV Simposio Colombiano de Vigilancia en Salud Pública y el III Encuentro de Universidades. 2) Presentación en el XVI Encuentro de Investigación Formativa de la Universidad Santiago de Cali. 3) Presentación en el Pacific Microbial Meeting - PAMM 201. 4) Presentación en el XVII Encuentro de Investigación Formativa de la Universidad Santiago de Cali . 5) Publicación del artículo científico en SAGE journals Evolutionary Bioinformatics titulado "A Novel Cecropin D-Derived Short Cationic Antimicrobial Peptide Exhibits Antibacterial Activity Against Wild-Type and Multidrug-Resistant Strains of <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>" 	<ul style="list-style-type: none"> • Ashley Dayan Lugo • Grupo de investigación en microbiología, industria y ambientes (GIMIA) • Universidad Santiago de Cali
Indicadores de Gestión		
Tecnológico		
Técnico		
Ambiental		
Social		
Cultural		

*Incluir los productos obtenidos derivados de la investigación como: apropiación social del conocimiento, generación de nuevo conocimiento entre otros.

Evaluación del efecto de un péptido antimicrobiano en bacterias multirresistentes que circulan en el municipio de Cali, años 2017 y 2018

Ashley Dayan Lugo-Guevara¹, José Fernando Oñate², Iván Darío Ocampo-Ibáñez¹

¹Grupo de Investigación en Microbiología Industria y Ambiente (GIMIA), Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Calle 5 # 62-00, Santiago de Cali, Colombia

²Grupo de Investigación en Química y Biotecnología (QUIBIO), Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Santiago de Cali, Calle 5 # 62-00, Santiago de Cali, Colombia

RESUMEN

La resistencia bacteriana (RB) es uno de los mayores problemas de la salud pública a nivel mundial. Particularmente, las infecciones causadas por cepas de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* multidrogasresistentes (MDR) generan una gran preocupación, debido a la ineficacia de la terapia antibiótica empírica actual. Por lo tanto, la investigación y el desarrollo de nuevas alternativas antibióticas para controlar estas bacterias es urgentemente necesario, y los péptidos antimicrobianos catiónicos (PAMC) se perfilan como una alternativa prometedora pues han mostrado actividad antibacteriana contra cepas MDR. En este sentido, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* de un PAMC corto derivado del análogo Δ M2 de la cecropina D (PAMC-CecD) contra aislados clínicos de *K. pneumoniae* (n = 30) y *P. aeruginosa* (n = 30), así como su actividad hemolítica. Para esto se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) y concentraciones bactericidas mínimas (CBM) de PAMC-CecD contra cepas de tipo salvaje y MDR. Los resultados revelaron un efecto bactericida de PAMC-CecD contra cepas tanto tipo salvaje como resistentes, sin embargo, las cepas de *P. aeruginosa* MDR mostraron una mayor susceptibilidad a este péptido con valores de CMI entre 32 y 512 μ g/ml. Adicionalmente, el péptido no mostró actividad hemolítica. Dada la actividad antibacteriana de PAMC-CecD contra aislados clínicos de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* de tipo salvaje y MDR y sus efectos no hemolíticos sobre los eritrocitos humanos, PAMC-CecD puede considerarse como una alternativa prometedora a los antibióticos convencionales.

Palabras clave: Resistencia bacteriana, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, Péptidos antimicrobianos catiónicos.

Evaluation of the effect of an antimicrobial peptide in multiresistant bacteria that circulate in the municipality of Cali, years 2017 and 2018

ABSTRACT

Bacterial resistance (RB) is one of the major public health problems worldwide. In particular, infections caused by multidrug-resistant (MDR) *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* clinical isolates are serious global health concerns because of the ineffectiveness of empirical antibiotic therapy. Therefore, research and development of new antibiotic alternatives to control these bacteria is urgently needed, and cationic antimicrobial peptides (CAMP) have emerged as a promising alternative because they are highly effective against MDR bacteria. In this study, we aimed to investigate the *in vitro* antibacterial effect of a short synthetic CAMP derived from the Δ M2 analog of cecropin D-like (CAMP-CecD) against clinical isolates of *K. pneumoniae* (n = 30) and *P. aeruginosa* (n = 30), as well as its hemolytic activity. Minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimal bactericidal concentrations (MBCs) of CAMP-CecD against wild-type and MDR strains were determined. The results revealed a bactericidal effect of PAMC-CecD against both wild-type and resistant strains, but *P. aeruginosa* MDR strains showed higher susceptibility to this peptide with MIC values between 32 and 512 μ g/ml. In addition, the peptide did not show hemolytic activity. Given the antibacterial activity of PAMC-CecD against wild-type and MDR clinical isolates of *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* and its non-hemolytic effects on human erythrocytes, PAMC-CecD may be a promising alternative to conventional antibiotics.

Keywords: Bacterial resistance¹, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, Cationic antimicrobial peptides.

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos es uno de los mayores problemas de la salud pública en la actualidad (1). Las bacterias resistentes pueden causar infecciones graves, y a menudo mortales, que están empezando a ser difíciles de tratar debido a las limitadas opciones terapéuticas (2,3). El grupo más crítico de todos incluye las bacterias resistentes a múltiples fármacos (3). Estas cepas bacterianas que se conocen como multidrogosresistentes (MDR), se definen como no susceptibles a al menos un agente en tres o más categorías antimicrobianas (4), y representan una grave amenaza, especialmente en ambientes hospitalarios donde pueden causar infecciones nosocomiales (3). Cepas de especies de bacterias no fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa* y Enterobacterias, como *Klebsiella pneumoniae*, pueden presentar resistencia a múltiples antibióticos y provocar, entre otras, infecciones del torrente sanguíneo o neumonía (3). Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluyó en una lista de patógenos con prioridad crítica para el desarrollo de nuevas alternativas para su control, a cepas resistentes de *P. aeruginosa* y bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, debido a que representan una gran amenaza para la salud humana global (3).

P. aeruginosa ha mostrado un aumento crítico en la resistencia a una amplia variedad de antibióticos, entre los que se incluyen aminoglucósidos, quinolonas, betalactámicos y polimixinas (5–7). Los principales mecanismos utilizados por esta bacteria para contrarrestar el ataque de estos antibióticos pueden ser intrínsecos, adquiridos y adaptativos (5). Entre otros, estos mecanismos pueden incluir una baja permeabilidad de la membrana externa, la producción de enzimas inactivadoras de antibióticos, la transferencia horizontal de genes de resistencia o mutaciones en su genoma (8,9). Varios factores, incluido el uso excesivo de antibióticos, los tratamientos incompletos y la automedicación pueden acelerar el desarrollo de cepas de *P. aeruginosa* multidrogosresistentes (PAMDR), lo que conduce a la ineficacia de la terapia antibiótica empírica contra este microorganismo (10). Por su parte, las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* también pueden presentar resistencia a múltiples antibióticos, lo que contribuye substancialmente con el problema creciente de salud pública mundial (11). En la actualidad, se pueden encontrar aislados de *K. pneumoniae* multidrogosresistentes (KPMDR), que pueden portar varios genes de resistencia y mostrar altos niveles de resistencia a una amplia variedad de antibióticos, tales como betalactámicos, aminoglucósidos, quinolonas y polimixinas (11–15). La incidencia de infecciones causadas por cepas multidrogosresistentes en hospitales, ha incrementado la morbilidad y la mortalidad en los entornos de atención médica en Colombia y el mundo, pues causan infecciones en individuos hospitalizados o inmunocomprometidos (7,16,17).

Las infecciones causadas por estos microorganismos multidrogosresistentes son difíciles de tratar debido a la susceptibilidad limitada a los agentes antimicrobianos, dando como resultado un problema mundial creciente con respecto a la elección de tratamientos antibióticos eficaces (5,13). Por esta razón, se requiere con urgencia el desarrollo de nuevos antibióticos o estrategias terapéuticas alternativas para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias multidrogosresistentes (5). En este sentido, los péptidos antimicrobianos (PAM) parecen ser candidatos prometedoros, pues tienen una acción rápida contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (18–25). Los PAM son un gran grupo de péptidos de bajo peso molecular que se producen naturalmente como defensa de los organismos (18,20,26–28). Estos péptidos han sido identificados en varias especies, desde las plantas hasta los humanos, desempeñando un papel fundamental en la inmunidad innata de estos organismos (19,20,26–28). Específicamente, los PAM catiónicos (PAMC) se perfilan como estrategias terapéuticas no antibióticas prometedoras para vencer la resistencia, pues han mostrado ser altamente efectivos para matar cepas bacterianas resistentes a los antibióticos convencionales (5,18,23,29,30). Adicionalmente, se ha demostrado que la eficacia de estos antibióticos podría ser impulsada aún más a través de la combinación con PAMC, debido a las relaciones sinérgicas entre antibióticos y PAMC (22,23). Los mecanismos de acción de estos péptidos varían ampliamente, y en comparación con los antibióticos convencionales causan la muerte bacteriana muy rápidamente pues pueden actuar sobre muchos objetivos moleculares bacterianos (22,23,31). Los PAMC pueden actuar directamente alterando la integridad de las membranas bacterianas o inhibiendo funciones intracelulares, como bloqueo de actividades enzimáticas o inhibición de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (22,32,33). En este sentido, diversos tipos de PAMCs han exhibido actividad contra bacterias y otros patógenos (28,29,34). En particular, las cecropinas (Cec) en especial las Cecropinas D las cuales se describieron solo en insectos lepidópteros, como por ejemplo, la polilla de la cera más grande *Galleria mellonella*. Son un grupo de PAMs

naturales de lepidópteros que han exhibido actividad *in vitro* contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y que poseen potenciales aplicaciones terapéuticas (35). En este estudio, se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de un PAMC sintético corto derivado del análogo Δ M2 de Cec tipo D (PAMC-CecD) de la polilla *Galleria mellonella* (25), contra aislados clínicos de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Previamente, la actividad antibacteriana de Δ M2 contra cepas ATCC de bacterias gram-positivas y gram-negativas fue reportada (25). Aquí, se exploraron los efectos de este péptido contra cepas de *K. pneumoniae* de tipo salvaje susceptibles (KPTS) y KPMDR, así como cepas de *P. aeruginosa* de tipo salvaje susceptibles (PATS) y PAMDR colectadas entre los años 2017 y 2018. Finalmente, se evaluó la actividad hemolítica de este péptido frente a eritrocitos humanos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis del péptido antimicrobiano

El péptido PAMC-CecD es un péptido catiónico corto derivado de la región amino (NH₂) terminal del péptido Δ M2, un análogo de Cec-D de *Galleria mellonella* reportado previamente (25). CAMP-CecD está exactamente compuesto de los primeros 18 residuos del péptido Δ M2 (RNFFKRIRIRAGKRIRKAI). La carga del péptido fue calculada utilizando el software Heliquest (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>). El péptido fue sintetizado por GenScript Corporation (Piscataway, NJ, EE. UU.) con un 98% de pureza. El péptido liofilizado se disolvió en solución salina tamponada con fosfato (PBS, NaCl 138 mM, KCl 3 mM, NaH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM y pH 7,4) a una concentración inicial de 5000 μ g/ml y luego se dividió en alícuotas para obtener la concentración requerida. Las soluciones diluidas se prepararon el día de uso.

Cepas bacterianas

Un total de 60 cepas bacterianas se evaluaron, 30 de *K. pneumoniae* y 30 de *P. aeruginosa*. Los aislados clínicos de cada especie bacteriana fueron suministrados por el Laboratorio de Salud Pública Departamental del Valle del Cauca (LSPD). Los laboratorios de microbiología de dos instituciones de salud de Nivel III de Cali, enviaron los aislados clínicos al LSPD en el contexto de la vigilancia por laboratorio del Departamento del Valle del Cauca entre los años 2017 y 2018. Las especies bacterianas se confirmaron con la tarjeta de identificación de bacilos Gram-negativos VITEK® 2 (VITEK® 2 GN ID), que se basa en métodos bioquímicos establecidos y sustratos que miden la utilización de fuentes de carbono, actividades enzimáticas y resistencia (Ref. 21341, Biomérieux). La tarjeta de identificación VITEK® 2 GN ID se utilizó con el sistema VITEK® 2 (Biomérieux) para la identificación automática de bacilos gram-negativos *Enterobacteriaceae* y no *Enterobacteriaceae*. Adicionalmente, como controles se utilizaron cepas de laboratorio obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC): *Escherichia coli* ATCC® 25922™, *K. pneumoniae* ATCC® 2146™ y *P. aeruginosa* ATCC® 27853™.

Caracterización de aislados clínicos

Para la caracterización de cada aislado clínico, inicialmente se evaluó su susceptibilidad y su resistencia a los antibióticos convencionales. Para esto, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) *in vitro* para cada antibiótico, utilizando la tarjeta VITEK® 2 Susceptibility Antimicrobial Testing (VITEK® 2 AST) en el sistema VITEK® 2 (Biomérieux), de acuerdo con los puntos de corte de la CMI definidos por el The Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) y el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (36,37). La susceptibilidad de todos los aislados clínicos de *K. pneumoniae* se determinó frente a agentes antimicrobianos, como penicilinas + inhibidores de β -lactamasa (ampicilina/sulbactam [SAM]) y penicilinas antipseudomonales + inhibidores de β -lactamasa (piperacilina/tazobactam [TZP]), cefamicinas (cefoxitina [FOX]), cefalosporinas de tercera y cuarta generación (cefepima [FEP], ceftazidima [CAZ] y ceftriaxona [CRO]), carbapenémicos (doripenem [DOR], ertapenem [ETP], imipenem [IPM] y meropenem [MEM]), aminoglucósidos (amikacina [AMK] y gentamicina [GEN]), fluoroquinolonas (ciprofloxacina [CIP]) y gliciliclinas (tigeciclina [TGC]). Por otro lado, todos los aislamientos de *P.*

aeruginosa fueron probados contra SAM, TZP, FOX, FEP, CAZ, CRO, DOR, ETP, IPM, MEM, AMK, GEN, CIP y polimixinas (colistina [CST]). Las cepas *E. coli* ATCC® 25922™ y *K. pneumoniae* ATCC® 2146™ fueron la referencia para KPTS y KPMDR, respectivamente, mientras que la cepa *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ fue la referencia para PATS. La susceptibilidad y resistencia de las cepas ATCC también se confirmaron con la tarjeta VITEK® 2 AST. Para confirmar la producción de enzimas carbapenemasas por parte de los aislados clínicos se utilizó el kit RAPIDEC® CARBA NP (Biomérieux) de acuerdo con las recomendaciones del CLSI (36), y para su clasificación, se realizaron pruebas de sinergia en agar Müller-Hinton con los inhibidores EDTA y ácido borónico, según los lineamientos del Instituto Nacional de Salud (INS) (38).

Ensayo de la actividad antibacteriana de PAMC-CecD

Para el ensayo de la actividad antibacteriana se realizaron tres procedimientos, donde el primero fue la validación de la técnica microdilución en caldo con cepas ATCC, la cual se realizó con el fin de adaptar el protocolo de microdilución en caldo establecido por el CLSI (36,39) a las condiciones de nuestro laboratorio, y teniendo en cuenta que el péptido PAMC-CecD se evaluó por primera vez contra estas especies bacterianas, se realizó una validación completa de dicho protocolo utilizando las cepas ATCC (41,42). Para esto se evaluaron dos parámetros que son fundamentales para una validación según la Food Drugs Administration (FDA): la concordancia y la reproducibilidad (41,42). La concordancia interobservador se evaluó con el índice kappa, para lo cual se realizó una comparación entre un observador y un referente experto en la técnica de microdilución en caldo (41,42). El segundo procedimiento realizado fue la determinación del punto de corte epidemiológico con cepas susceptibles, el cual se determina con el objetivo de encontrar el umbral diagnóstico del agente microbiano frente a una especie bacteriana, para así conocer el comportamiento de ese agente antimicrobiano y a que concentración inhibe esa especie bacteriana. Finalmente, se realizó el procedimiento donde se evalúa la actividad de PAMC-CecD frente a aislados clínicos MDR, los tres procedimientos anteriormente mencionados se realizaron con la técnica de la microdilución en caldo.

De esta forma los valores de CMI del PAMC-CecD en los tres procedimientos se determinaron a través de la técnica de microdilución en caldo, de acuerdo con el protocolo establecido por el CLSI (36,39). Para esto, inicialmente se obtuvo un cultivo puro de cada aislado clínico en agar BHI (Merck) que se incubó a 37 °C por 18 – 20 horas. Colonias de este cultivo se resuspendieron en solución salina al 0,5% hasta alcanzar una turbidez de 0.5 McFarland; esta suspensión contenía aproximadamente de 1 a 4 × 10⁸ UFC/ml. Esta suspensión se diluyó en caldo Müller-Hinton ajustado a cationes (BD BBL™) hasta obtener un inóculo con una concentración final de 2-7x10⁵ UFC/ml. Estos inóculos bacterianos se incubaron con diferentes concentraciones de PAMC-CecD y la concentración más alta evaluada fue 512 µg/ml, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas 1:2. La mezcla de péptido e inóculo a un volumen final de 100 µL se incubó en microplacas estériles de polipropileno de 96 pozos (Sigma-Aldrich) a 37 °C. Se realizó un control sin péptido para cada una de las cepas evaluadas. Adicionalmente, las cepas ATCC de referencia se usaron en cada ensayo como un control para asegurar la reproducibilidad. La CMI del PAMC-CecD para cada cepa, se definió como la concentración más baja que inhibió el crecimiento visible de las bacterias después de la incubación durante 18-20 horas (36,39). Finalmente, la concentración mínima bactericida (CMB) del péptido, definida como la concentración más baja de un agente antibacteriano requerido para matar el 99.9% de las bacterias, se determinó añadiendo el contenido de los pozos que no mostraron crecimiento bacteriano visible en placas de agar Müller-Hinton incubadas a 37 °C durante 18-20 horas (29,40).

Actividad hemolítica de PAMC-CecD

Eritrocitos humanos se utilizaron con el fin de evaluar la actividad hemolítica del péptido PAMC-CecD a diferentes concentraciones (256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 µg / ml). Los eritrocitos se aislaron de sangre periférica humana fresca. Inicialmente se lavaron tres veces con PBS a una concentración del 1X por centrifugación durante 5 minutos tres mil rpm y luego se resuspendieron en PBS. Las diferentes concentraciones de péptidos se añadieron a eritrocitos humanos al 4% en PBS, se incubaron a 37°C durante 1 h, y luego se centrifugaron a 4000 g durante 5 min. Se transfirieron alícuotas del sobrenadante a placas de 96 pozos, y se midió la hemólisis por absorbancia a 540 nm con un Multiskan Go (Thermo). Los eritrocitos en ausencia y presencia de Tritón X100 (1%) se emplearon como control negativo (blanco) y positivo, respectivamente. La ecuación: [(Abs en la solución de péptido-Abs en PBS) / (Abs en Triton X100-Abs en PBS)] × 100 se usó para calcular el porcentaje de hemólisis (25).

Análisis estadístico

Las CMI y las CMB se determinaron por duplicado para cada uno de los aislados. A fin de unificar la técnica y establecer su confiabilidad y consistencia, inicialmente se realizó una validación de la metodología de microdilución en caldo utilizando cepas ATCC® de referencia, determinando las variables reproducibilidad y concordancia interobservador, a través del índice kappa de Cohen (41,42). Adicionalmente, se estimaron los valores de los puntos de corte epidemiológicos para las cepas KPTS y PATS. Finalmente, los resultados se analizaron utilizando herramientas estadísticas descriptivas con la mediana. Las diferencias estadísticamente significativas de las CMI entre especies, y entre las cepas de tipo salvaje y MDR, se analizaron y compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, una alternativa no paramétrica a la prueba ANOVA, con el software R-Project versión 1.1.463. Los valores de $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características bioquímicas del péptido PAMC-CecD

PAMC-CecD está compuesto por 18 residuos de aminoácidos que exhibe una carga neta catiónica de +9 y un valor de índice de hidrofobicidad de -0.002 (Figura 1). La proyección de rueda helicoidal mostró una configuración anfipática fuerte ya que la cara hidrofílica (arriba) está claramente diferenciada de la hidrofóbica (abajo) (Figura 1). La cara hidrofílica está compuesta de 10 residuos: R1,6,8,9,13,15; K5,12,16 y N2, mientras que 8 residuos: A10,17; F3,4; I7, 14, 18 y G11, conforman el núcleo hidrofóbico del péptido (Figura 1). Estas características bioquímicas pueden contribuir con la naturaleza antibacteriana de PAMC-CecD. En este sentido, la carga catiónica de este péptido depende del gran contenido de residuos cargados positivamente, como arginina (R) y lisina (K) (Figura 1) (43). La presencia de las cargas positivas en PAMC-CecD probablemente favorecen su actividad antibacteriana, pues podría interactuar con las paredes celulares polianiónicas de las bacterias, por ejemplo, a través de atracciones electrostáticas entre el péptido y los lipopolisacáridos, que desestabilizan la estructura de las membranas de bacterias Gram-negativas (24,43,44). Por su parte, la hidrofobicidad de PAMC-CecD también puede contribuir con su actividad antibacteriana, pues facilita la inserción del péptido en la membrana de las bacterias Gram-negativas alterándola (Figura 1) (45,46). En este sentido, los aminoácidos que componen el núcleo hidrofóbico del péptido pueden permitir que este se una y se inserte en el centro hidrofóbico de las membranas bacterianas, favoreciéndose la interacción con la región apolar de la bicapa fosfolipídica, lo que puede provocar la alteración de la fluidez de la membrana (45). De esta manera, la interacción directa de los péptidos con la bicapa lipídica puede crear extensos dominios fluidos en las membranas bacterianas, provocando la deslocalización de las proteínas unidas a la membrana y la fuga de citosol, contribuyendo así a la destrucción de la célula (47).

Péptido	Secuencia	Carga	Hidrofobicidad
PAMC-CecD	NH ₂ -RNFFKRIRRAGKRIRKAI-COOH	+9	-0.002

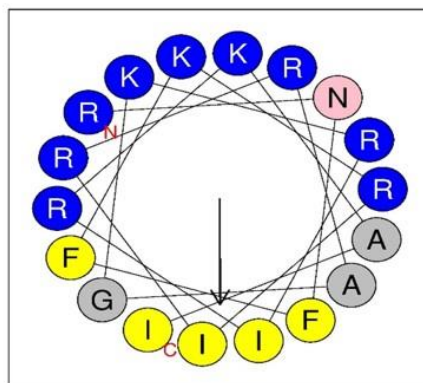


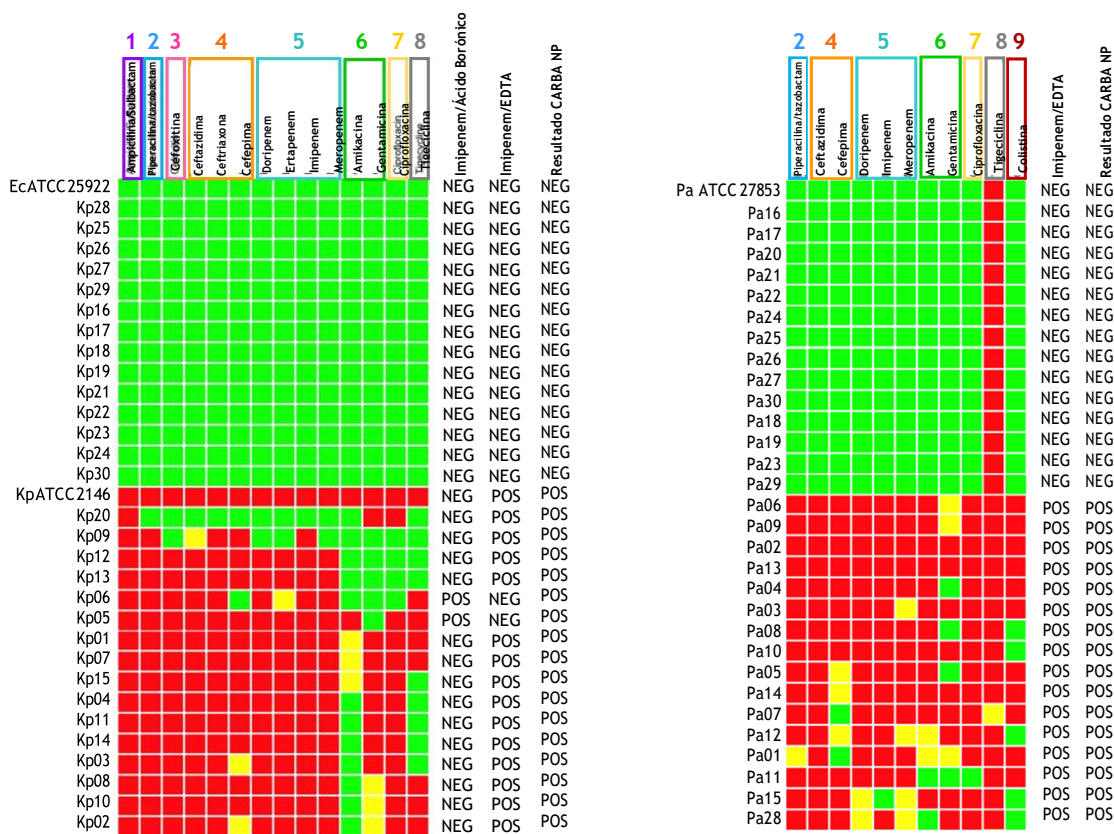
Figura 1. Proyección de rueda helicoidal de PAMC-CecD. Los residuos se colorean según la clasificación: polar cargado (azul), polar neutro (rosa). La hidrofobicidad de los residuos se muestra del color amarillo (los residuos más hidrofóbicos) al gris (los residuos menos hidrofóbicos). La flecha apunta a la cara hidrofóbica.

Perfiles de susceptibilidad y resistencia de los aislados clínicos

Los perfiles fenotípicos de susceptibilidad y resistencia a los antibióticos convencionales de los aislados clínicos de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y las cepas ATCC® se muestran en la Figura 2. Estos perfiles se construyeron utilizando siete y seis categorías antimicrobianas para *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, respectivamente (Figura 2). Las categorías de antibióticos utilizadas para evaluar la susceptibilidad y resistencia de los aislados clínicos de *K. pneumoniae* incluyeron penicilinas + inhibidores de β -lactamasa, penicilinas antipseudomonales + inhibidores de β -lactamasa, cefamicinas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, carbapenémicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y gliciliclinas (Figura 2A). En el caso de los aislados de *P. aeruginosa* se evaluaron estas mismas categorías, además de las polimixinas (Figura 2B). Un total de 14 aislamientos de *K. pneumoniae* se clasificaron como KPTS pues no mostraron resistencia a ningún antibiótico evaluado, mientras que los 16 aislamientos clínicos restantes se consideraron como KPMDR, debido a su resistencia a al menos tres categorías antimicrobianas diferentes, que incluyeron penicilinas + inhibidores de la β -lactamasa, cefamicinas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, carbapenems, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y gliciliclinas (Figura 2A) (4). Según las pruebas de sinergia y CARBA NP, 14 aislados clínicos KPMDR fueron productores de metalo-beta-lactamasa de la clase B, mientras que dos fueron productores de carbapenemasas de la clase A tipo serin-beta-lactamasa (Figura 2A). Por su parte, 14 cepas de *P. aeruginosa* se consideraron cepas de tipo salvaje, con resistencia intrínseca a la tigeciclina los aislados MDR también presentaron esta resistencia intrínseca (48), y 16 se clasificaron como PAMDR, debido a su resistencia a las categorías antimicrobianas, como penicilinas + inhibidores de la β -lactamasa, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, carbapenems, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y polimixinas (Figura 2B) (4). Todas las PAMDR se clasificaron como aislados clínicos productores de carbapenemasas de la clase B, específicamente metalo-beta-lactamasa (Figura 2B).

De acuerdo con los perfiles fenotípicos encontrados, las cepas bacterianas MDR aquí evaluadas pueden poseer diversos mecanismos de resistencia (Figura 2). A pesar de que muchos de estos mecanismos de resistencia están determinados genéticamente, esa caracterización no se realizó para los aislados clínicos evaluados en el presente estudio. Sin embargo, es posible hipotetizar que la resistencia a fluoroquinolonas en las cepas MDR evaluadas en el presente estudio esté relacionada con mutaciones en la región determinante de resistencia a la quinolona (QRDR) del gen *gyrA* que codifica para la ADN girasa (49–51), pues se ha calculado que entre el 50 y el 70% de los aislados clínicos de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* en Colombia presentan resistencia a las quinolonas por mutación en el gen *gyrA* (52). Estos valores son concordantes con los encontrados en este estudio, pues entre el 40 y el 50% del total de los aislados clínicos aquí evaluados presentaron resistencia a la ciprofloxacina (Figura 2). Por su parte, los mecanismos de resistencia a carbapenémicos, cefalosporinas y penicilinas incluyen cambios en proteínas de la membrana externa, bombas de eflujo inespecíficas, producción de enzimas tipo β -lactamasas y modificaciones del sitio blanco en bacterias Gram-negativas (53). Entre estos mecanismos, la hidrólisis enzimática por la acción de β -lactamasas es el principal y más común mecanismo de resistencia a los betalactámicos (54,55). En este sentido, todos los aislados clínicos de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* MDR caracterizados en este estudio presentaron resistencia a carbapenémicos a través de la producción de enzimas tipo β -lactamasas (Figura 2). La presencia de aislamientos KPMDR y PAMDR es consistente con la situación real de resistencia bacteriana en Cali y todo Colombia, donde se ha reportado una alta frecuencia de cepas MDR de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, así como su exitosa propagación durante los últimos años, lo que representa una amenaza para la salud pública actual en los hospitales colombianos (15,56–60). Teniendo en cuenta los perfiles fenotípicos, es probable que los aislados MDR evaluados en este estudio, posean genes *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}* y *bla_{KPC}* que codifican para metalo-beta-lactamasa y carbapenemasas clase A tipo serina, puesto que previamente se han reportado aislados clínicos de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* con estos genes circulando en ambientes clínicos de la ciudad de Cali (57–60). En cuanto a la resistencia a los aminoglucósidos, la presencia de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAG) es el mecanismo más común entre los diferentes aislados de bacilos Gram-negativos como *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* con resistencia a estos antibióticos en Colombia (61,62). De acuerdo con los perfiles fenotípicos encontrados en este estudio (Figura 2) y lo reportado en estudios previos en Colombia, es probable que los aislados MDR de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* aquí reportados produzcan EMAG como su mecanismo de resistencia a los antibióticos pertenecientes a esta categoría de

antimicrobianos, sin embargo, esto debe ser confirmado experimentalmente. Por su parte, el 69% de los aislados clínicos PAMDR presentaron resistencia a colistina (Figura 2B). Este resultado es ligeramente superior con lo reportado para el Departamento del Valle del Cauca, en donde en promedio el 30% de los aislados clínicos MDR muestran resistencia a colistina (63). A pesar de que la transferencia horizontal mediada por los genes *mcr* en plásmidos es el mecanismo de resistencia a colistina más común, la frecuencia de aislados clínicos que circulan en el Valle del Cauca y que presentan este mecanismo no se ha establecido con claridad en la actualidad (63). Finalmente, por esta razón, es necesario confirmar experimentalmente la presencia de genes *mcr* en estos aislados (Figura 2B).



Categorías antimicrobianas

- 1 Penicilinas + inhibidores de β -lactamasa - 2 Penicilinas antipseudomonales + inhibidores de β -lactamasa -
- 3 Cefamicinas - 4 Cefalosporinas de tercera y cuarta generación - 5 Carbapenems - 6 Aminoglucósidos -
- 7 Fluoroquinolonas - 8 Glicilclicinas - 9 Polimixinas.

Figura 2. Perfiles de susceptibilidad y resistencia de los aislados clínicos de *K. pneumoniae* (A) y *P. aeruginosa* (B) a los antibióticos convencionales. Las categorías interpretativas fueron: susceptibilidad (cuadrado verde), resistencia intermedia (cuadrado amarillo) y resistencia (cuadrado rojo), de acuerdo con los puntos de corte clínicos definidos por las pautas de CLSI, a excepción de Tigeciclina, que se interpretó de acuerdo con las pautas de EUCAST. Kp: *K. pneumoniae*; Pa: *P. aeruginosa*; Ec ATCC 25922: *Escherichia coli* ATCC® 25922™; Kp ATCC 2146: *K. pneumoniae* ATCC® 2146™; Pa ATCC 27853: *P. aeruginosa* ATCC® 27853™; NEG: Negativo; POS: Positivo para la presencia de enzimas carbapenemasas.

Validación de la técnica de microdilución en caldo

En cuanto a la validación de la técnica de microdilución en caldo, el valor de kappa calculado fue de 0,63, lo que significa una concordancia del 63% entre observadores, para los resultados de CMI del péptido frente a las cepas ATCC. De acuerdo con estos resultados, la fuerza de concordancia se puede clasificar como considerable o substancial, según la categorización de los valores kappa (41,64). Según esta categorización, los valores de concordancia kappa mayores a 0,60 indican una concordancia adecuada entre los observadores y una confiabilidad en los resultados obtenidos (41,64). El índice de concordancia encontrado aquí, puede estar explicado por valores de diferencia de una dilución de CMI entre observadores, que se pueden considerar como errores menores aceptables para la validación de la técnica (65). De acuerdo con estos resultados, la técnica de microdilución en caldo ajustada para calcular la CMI del CLSI (36,39), es un método estándar y confiable para determinar la CMI del péptido.

Adicionalmente, con el fin de determinar la consistencia y la confiabilidad del método, se calculó la reproducibilidad intraobservador como el porcentaje de concordancia entre los resultados obtenidos por cada observador. En este sentido, el valor de reproducibilidad promedio calculado para los resultados de la CMI frente a las cepas ATCC en tres ensayos desarrollados por cada observador fue del 0,81 (81%). La reproducibilidad se determinó aplicando el coeficiente de confiabilidad, que es la correlación entre las puntuaciones obtenidas por los sujetos, en dos formas paralelas de una prueba (66). Cuanto más cercana a uno sea la correlación, mayor es la confiabilidad, precisión o reproducibilidad del método (67). Teniendo en cuenta lo anterior, se puede determinar que la reproducibilidad de la técnica de microdilución en caldo fue adecuada para la consistencia de la técnica de la microdilución en caldo.

Puntos de corte epidemiológicos

Una vez que la técnica de microdilución en caldo se validó con las cepas ATCC, se procedió a evaluar la actividad del péptido frente a los aislados clínicos. Inicialmente, se determinó el punto de corte epidemiológico, definido como las distribuciones de la CMI de un agente antimicrobiano en una población, basada únicamente en la actividad *in vitro*. Debido a que la actividad del péptido PAMC-CecD no había sido evaluada previamente contra *K. pneumoniae* ni *P. aeruginosa*, fue necesario definir los puntos de corte epidemiológicos del péptido para ambas especies (68). Para esto, se determinó la actividad del péptido frente a todos los aislados de tipo salvaje susceptibles a los antibióticos convencionales de cada especie. En este sentido, el péptido PAMC-CecD mostró actividad antibacteriana contra las cepas KPTS (n=14) y PATS (n=14), pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas (Tabla 1). Se encontró que los puntos de corte epidemiológicos fueron similares para *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, con CMI de 512 µg/mL para ambas especies (Figuras 3 y 4). Sin embargo, los valores más bajos de CMI entre las especies fueron diferentes, 32 µg/mL para las cepas KPTS (Figura 3) y 64 µg/mL para PATS (Figura 4). A pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre las especies, el péptido mostró mayor actividad frente a PATS en comparación con KPTS (Tabla 1). Los puntos de corte epidemiológicos encontrados para PAMC-CecD son superiores cuando se comparan con los reportados para los antibióticos convencionales, como por ejemplo los carbapenémicos y la colistina, de acuerdo con el CLSI y el EUCAST (Tabla 1 y Tabla S1). Estas diferencias entre las CMI del péptido y los antibióticos convencionales pueden estar explicadas por el mayor número de moléculas de PAMC-CecD requerido para generar la disrupción de la membrana o la formación de poros, puesto que la membrana bacteriana representa un objetivo muy grande desde el punto de vista molecular para la acción de los PAMs (69). Por su parte, los antibióticos convencionales tienen objetivos moleculares

específicamente definidos, y con un número menor de moléculas pueden inducir un efecto bactericida (69,70).

Tabla 1 Actividad antibacteriana in vitro de CAMP-CecD contra cepas susceptibles de tipo salvaje y MDR de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*

<i>K. pneumoniae</i> (n)	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)	<i>P. aeruginosa</i> (n)	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)	p-valor ^a
KPTS (14)	32–512	32–512	PATS (14)	64–512	64–512	0.14
KPMDR (16)	256–512	256–512	PAMDR (16)	32–512	32–512	0.12
Cepas totales (30)	32–512	32–512	Cepas totales (30)	32–512	32–512	0.03
Ec ATCC 25922	128–256	128–256	Pa ATCC 27853	32–64	32–64	
Kp ATCC 2146	256–512					

^a Nivel de significancia entre las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)

KPTS: *K. pneumoniae* tipo salvaje; KPMDR: *K. pneumoniae* multidrogresistente; PATS: *P. aeruginosa* tipo salvaje; PAMDR: *P. aeruginosa* multidrogresistente; Ec ATCC 25922: *Escherichia coli* ATCC® 25922™; Kp ATCC 2146: *K. pneumoniae* ATCC® 2146™; Pa ATCC 27853: *P. aeruginosa* ATCC® 27853™; CMB: concentración mínima bactericida; CMI: concentración mínima inhibitoria

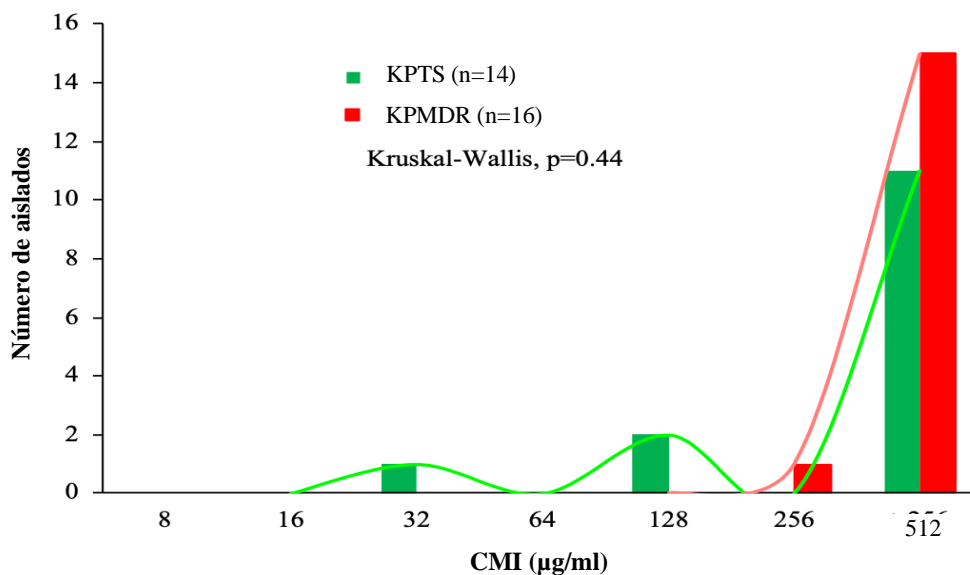


Figura 3. Distribución de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para los aislamientos tipo salvaje susceptibles (KPTS) y aislamientos multidrogresistentes de *K. pneumoniae* (KPMDR). No se encontraron diferencias significativas entre los aislamientos KPTS y KPMDR según la prueba de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

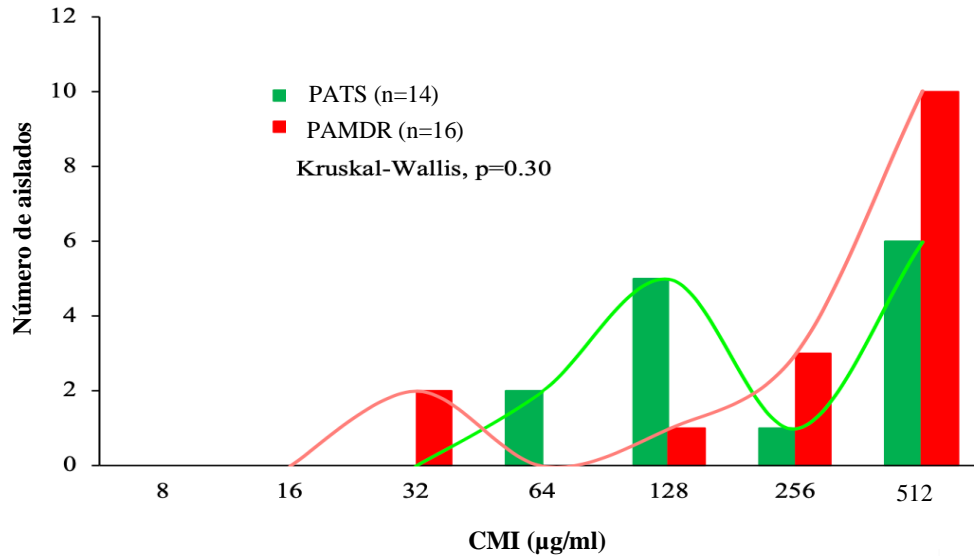


Figura 4. Distribución de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para los aislamientos tipo salvaje susceptibles (PATS) y aislamientos multidrogresistentes de *P. aeruginosa* (PAMDR). No se encontraron diferencias significativas entre los aislamientos PATS y PAMDR según la prueba de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

Actividad antibacteriana *in vitro* contra bacterias multidrogresistentes y actividad hemolítica.

Una vez determinados los puntos de corte epidemiológicos de PAMC-CecD para los aislados KPTS y PATS, se evaluó la actividad del péptido frente a bacterias MDR (Figuras 3 y 4). Los rangos de la actividad *in vitro* del PAMC-CecD contra *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* MDR se resumen en la Tabla 1. PAMC-CecD mostró actividad antibacteriana contra todos los aislados clínicos de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, tanto susceptibles como MDR, con valores de CMI entre 32 y 512 µg/ml, y contra cepas ATCC (Tabla 1). En general, esta actividad contra bacterias gram-negativas fue consistente con reportes previos en los que diferentes miembros naturales y análogos sintéticos de las cecropinas, mostraron efectividad contra cepas ATCC de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli* (25,29,35,71–74). Los valores de CMI encontrados en este estudio fueron comparables con los reportados para otros péptidos catiónicos, pero ligeramente superiores en comparación con los reportados para el péptido híbrido cecropin A-melittin (29). La actividad de PAMC-CecD frente a bacterias gram-negativas puede estar explicada por la naturaleza catiónica de este péptido como se mencionó anteriormente. Esta característica bioquímica de PAMC-CecD puede favorecer su selectividad por los fosfolípidos que componen la membrana de las bacterias gram-negativas (75). La carga positiva en la cara polar del péptido puede perturbar la membrana, produciendo una interacción electrostática entre los residuos catiónicos del péptido y la cabezas aniónicas de los fosfolípidos (76). Esto puede causar la disrupción de las membranas bacterianas o la formación de poros, lo que puede provocar la entrada de péptidos al citoplasma bacteriano y su interacción contra otros blancos moleculares bacterianos internos, alteración de la permeabilidad de la membrana o la fuga de citosol, causando la muerte bacteriana inmediata (47,75,77–79).

Cuando se compararon los valores de CMI para todas las cepas evaluadas en este estudio, se encontraron diferencias estadísticas entre *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (Tabla 1). A pesar de esto, no se hallaron diferencias significativas cuando se compararon específicamente las cepas de tipo salvaje de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, y tampoco entre los aislamientos MDR de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (Tabla 1). Sin embargo, el péptido mostró mayor eficiencia contra PAMDR comparado con KPMDR, siendo 32 µg/ml el valor más bajo de CMI para los aislados de *P.*

aeruginosa MDR (Tabla 1). Esto puede estar explicado por la presencia de factores de virulencia y mecanismos de resistencia en las especies evaluadas. Por ejemplo, las cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas han demostrado tener una cápsula que contribuye a su patogenicidad debido a sus polisacáridos capsulares que podrían protegerlos de la actividad antibacteriana de PAMC-CecD, en comparación con los aislados clínicos de *P. aeruginosa* (13,80–82). La eficacia de PAMC-CecD contra los aislamientos MDR encontrada aquí, fue comparable a la reportada previamente para los miembros de cecropinas naturales y péptidos tipo-cecropina, que actuaron contra cepas MDR de bacterias gram-negativas, incluyendo *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter baumannii*, *E. coli* y *P. aeruginosa* (83–86). Cuando se realizaron comparaciones intraespecíficas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los aislados de tipo salvaje y MDR de *K. pneumoniae* (Figura 3), pero las cepas WTKP fueron más susceptibles a PAMC-CecD con 32 µg/ml como el valor más bajo de CMI, mientras que el valor de CMI más bajo para KPMDR fue de 256 µg/ml (Figura 3). De manera similar, cuando se compararon cepas susceptibles y MDR de *P. aeruginosa*, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 4). Aunque no se encontraron diferencias, las cepas de MDRPA mostraron una mayor susceptibilidad a CAMP-CecD con valores de CMI entre 32 y 512 µg/ml, mientras que los valores de CMI del péptido para PATS oscilaron entre 64 y 512 µg/ml (Figura 4). De forma interesante, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la actividad antibacteriana del péptido PAMC-Cec frente a *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* es independiente de los mecanismos de resistencia que posean los aislados clínicos (Figuras 3 y 4). Adicionalmente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de la CMI y la CMB del péptido PAMC-CecD frente a todos los aislados clínicos evaluados, independientemente de sus perfiles de resistencia (Tabla 1). Debido a que los resultados de la CMB fueron iguales a los de la CMI en todos los casos, el péptido PAMC-CecD puede considerarse como un agente bactericida, tanto para aislados MDR como susceptibles a los antibióticos convencionales (Tabla 1). Estos hallazgos sugieren que los mecanismos de resistencia de los aislados de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* probados en este estudio (Figura 2) no alteran la eficacia de PAMC-CecD. Estudios previos también han informado sobre el efecto bactericida de otros PAMC, incluidos los péptidos híbridos de cecropina A, catelicidinas, magainina y nisina, contra cepas MDR (23,29,34,87). De manera similar a este estudio, no se detectaron diferencias entre los valores de CMI y CMB independientemente de los perfiles de resistencia a los antibióticos (23,29,34,87).

Finalmente, se evaluó la actividad hemolítica de PAMC-CecD frente a eritrocitos humanos. A diferencia del péptido patrón $\Delta M2$ que mostró una ligera actividad hemolítica (25), PAMC-CecD no mostró actividad hemolítica a la concentración más alta aquí evaluada (256 µg/ml). Tanto PAMC-CecD como $\Delta M2$ poseen una carga neta de +9, por lo tanto, la actividad hemolítica de PAMC-CecD no varió dependiendo de la carga catiónica (Figura 1). En contraste con estos resultados, un estudio previo informó una asociación positiva entre la carga y la actividad hemolítica del péptido V13K (88). Sin embargo, las variaciones en otras propiedades estructurales pudieron haber influido en la reducida actividad hemolítica del péptido PAMC-CecD. Por ejemplo, la hidrofobicidad informada del péptido $\Delta M2$ es sustancialmente mayor (0.178) (25) que la de PAMC-CecD (-0.002) (Figura 1). Según informes anteriores, el aumento de la hidrofobicidad puede aumentar la actividad hemolítica, y la baja hidrofobicidad de PAMC-CecD podría explicar la ausencia de actividad hemolítica (89,90). Además, la corta longitud del péptido pudo haber contribuido con su reducida actividad hemolítica, pues se ha demostrado que al aumentar la longitud en un péptido su actividad hemolítica incrementa (91). Teniendo en cuenta los resultados aquí obtenidos, PAMC-CecD puede ser seguro para su uso en formulaciones tópicas (92), siendo un candidato potencial para su uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias MDR.

4. CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados de este estudio demostraron que PAMC-CecD exhibe una actividad bactericida contra bacterias Gram-negativas como *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Este péptido exhibió actividad antibacteriana contra aislados clínicos tanto susceptibles como MDR a antibióticos convencionales. PAMC-CecD mostró un efecto bactericida contra bacterias que generan una gran preocupación en la salud pública actualmente, tales como aislados de *K. pneumoniae* productores

de enzimas metalo-beta-lactamasas y de carbapenemasas de la clase A del tipo serin-beta-lactamasa, y aislados clínicos de *P. aeruginosa* productores de metalo-beta-lactamasas y resistentes a colistina. Teniendo en cuenta esto y su mínimo efecto hemolítico, PAMC-CecD puede considerarse como una posible alternativa a los antibióticos convencionales seguro en formulaciones tópicas para controlar las bacterias MDR asociadas con enfermedades infecciosas graves.

5. AGRADECIMIENTOS

Una vez finalizada esta etapa de mi vida, me gustaría dar las gracias a Dios principalmente, y en segundo lugar a todas las personas que lo han hecho posible, aunque hacerlo con palabras deja atrás muchos sentimientos que no pueden expresarse...

En primer lugar, y no porque sea lo correcto, agradecer al Profesor Iván Darío Ocampo Ibáñez. director de esta Tesis, primero, por la oportunidad de incorporarme a su grupo de investigación, y después por la confianza que ha depositado en mí durante el tiempo de la investigación, por toda la ayuda que me ha ofrecido (que siempre ha sido toda de la que disponía, de eso estoy segura), no sólo en la elaboración de la Tesis, sino en hacer posible mi permanencia en su grupo. También quisiera agradecer a la Profesora Sandra Patricia Rivera, por la ayuda y el apoyo que me ha brindado para con la Tesis, porque esto no hubiese sido posible sin su capacidad para encontrar soluciones a los pequeños tropiezos que tuve.

Al profesor José Fernando Oñate Garzón por facilitar mi trabajo poniendo a mi disposición todos sus conocimientos y sus recursos posibles.

Al Laboratorio de Salud Pública Departamental del Valle del Cauca y a la universidad Santiago de Cali por contribuir a al desarrollo este proyecto de investigación con excelentes resultados, por brindarme los conocimientos suficientes y prestarme las instalaciones necesarias para llevar a cabo esta Tesis.

A mi compañera Helen Agudelo, con quien compartí el laboratorio y toda la experiencia de vivir y sufrir cada momento en la parte experimental de esta tesis, gracias por el apoyo, por la ayuda y la compañía.

Por último y no menos importante, gracias a mi familia y amigos por el apoyo incondicional durante mi carrera profesional, por siempre creer en mí y en mis capacidades, y a mis compañeros con quienes tuve la oportunidad de cumplir y compartir esta meta.

Gracias a todos los anteriormente mencionados por haber sido parte de una de las etapas más importantes de mi vida, gracias porque sin ustedes no hubiese sido posible esto.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Voulgaris GL, Voulgari ML, Falagas ME. Developments on antibiotics for multidrug resistant bacterial Gram-negative infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2019;17(6):387–401.
2. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7(39).
3. World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. [Internet]. 2017. Available from: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
4. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Bacteriology.* 2011;18:268–81.
5. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* 2019;37(1):177–92.
6. Döbelmann B, Willmann M, Steglich M, Bunk B, Nübel U, Peter S, et al. Rapid and consistent evolution of colistin resistance in extensively drug-resistant *pseudomonas aeruginosa* during

- morbidostat culture. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(9).
7. de Matos ECO, De Matos HJ, Conceição ML, Rodrigues YC, Carneiro IC do RS, Lima KVB. Clinical and microbiological features of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016;49(3):305–11.
 8. Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* 2011;19(8):419–26.
 9. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 2003;5(13):1213–9.
 10. Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoeconomics Outcomes Res.* 2010;10(4):441–51.
 11. Partridge SR. Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Pathology.* 2015;47(3):276–84.
 12. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem.* 2014 Jun;(6):25–64.
 13. Ferreira RL, Da Silva BCM, Rezende GS, Nakamura-Silva R, Pitondo-Silva A, Campanini EB, et al. High prevalence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and β -lactamase encoding genes in a Brazilian intensive care unit. *Front Microbiol.* 2019;10(JAN).
 14. Ocampo AM, Vargas CA, Sierra PM, Cienfuegos AV, Jiménez JN. Caracterización molecular de un brote de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos en un hospital de alto nivel de complejidad de Medellín, Colombia. *Biomédica.* 2015;35(4):496–504.
 15. Ocampo A, Chen L, Cienfuegos A, Roncancio G, Chavda K, Kreiswirth B, et al. A Two-Year Surveillance in Five Colombian Tertiary Care Hospitals Reveals High Frequency of Non-CG258 Clones of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Distinct Clinical Characteristics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(1):332–42.
 16. Prakash V, Mishra P, Premi H, Walia A, Dhawan S, Kumar A. Increasing incidence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in inpatients of a tertiary care hospital. *Int J Res Med Sci.* 2014;2(4):1302.
 17. WHO & PAHO. Epidemiological Alert: Enterobacteriaceae with plasmid-mediated transferable colistin resistance, public health implications in the Americas. World Health Organization and Pan American Health Organization. Washington, D.C.; 2016.
 18. Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol* [Internet]. 2010;135(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2009.12.004>
 19. Brown KL, Hancock REW. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(1):24–30.
 20. Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: Premises and promises. Vol. 24, *International Journal of Antimicrobial Agents.* Elsevier B.V.; 2004. p. 536–47.
 21. Mataraci E, Dosler S. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(12):6366–71.
 22. Zhang L, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *Curr Biol.* 2016 Jan;26(1):R14–9.
 23. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel).* 2013 Nov;6(12):1543–75.
 24. Oñate-Garzón JF, Manrique-Moreno M, Patiño Gonzalez E. Antimicrobial activity of cationic peptides designed from neutral peptide. *Acta Biol Colomb.* 2017;22(2):157–64.
 25. Oñate-Garzón J, Manrique-Moreno M, Trier S, Leidy C, Torres R, Patiño E. Antimicrobial activity and interactions of cationic peptides derived from *Galleria mellonella* cecropin D-like peptide with model membranes. *J Antibiot (Tokyo).* 2016;70(3):238–45.
 26. Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist.* 2018;11:1645–58.
 27. Wang S, Zeng X, Yang Q, Qiao S. Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. Vol. 17, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG; 2016.
 28. Fry DE. Antimicrobial peptides. *Surg Infect (Larchmt).* 2018;19(8):804–11.
 29. Geitani R, Ayoub Moubareck C, Touqui L, Karam Sarkis D. Cationic antimicrobial peptides: Alternatives and/or adjuvants to antibiotics active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* 2019;19(1):1–12.
 30. Mandal SM, Roy A, Ghosh AK, Hazra TK, Basak A, Franco OL. Challenges and future

- prospects of antibiotic therapy: From peptides to phages utilization. *Front Pharmacol.* 2014;5:1–12.
31. Brogden KA. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(3):238–50.
 32. Sharma S, Sahoo N, Bhunia A. Antimicrobial Peptides and their Pore/Ion Channel Properties in Neutralization of Pathogenic Microbes. *Curr Top Med Chem.* 2015;16(1):46–53.
 33. Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. Vol. 6, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* Frontiers Media S.A.; 2016.
 34. Lei J, Sun LC, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res.* 2019;11(7):3919–31.
 35. Brady D, Grapputo A, Romoli O, Sandrelli F. Insect cecropins, antimicrobial peptides with potential therapeutic applications. *Int J Mol Sci.* 2019;20(23).
 36. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.
 37. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0. 2020.
 38. Ovalle MV, Saavedra SY, González MN, Hidalgo AM, Duarte C, Beltrán M. Resultados de vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana. *Biomedica.* 2017;37:473–85.
 39. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
 40. Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Del Prete MS, Fortuna M, Caselli F, et al. In vitro susceptibility tests for cationic peptides: Comparison of broth microdilution methods for bacteria that grow aerobically. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(6):1694–6.
 41. Kwiecien R, Kopp-Schneider A, Blettner M. Concordance Analysis. *Dtsch Arztebl Int.* 2011;108(30):515–21.
 42. Liao JJZ, Capen RC, Schofield TL. Assessing the reproducibility of an analytical method. *J Chromatogr Sci.* 2006;44(3):119–22.
 43. Téllez GA, Castaño JC. Péptidos antimicrobianos. *Infectio.* 2010;14(1):55–67.
 44. Pérez María Catalina. Food habits of Breeding Peregrine Falcon (*Falco peregrinus*) in the Ojo de Liebre Lagoon, Baja California Sur, México. In: *Current Raptor Studies in México.* 2006. p. 71–82.
 45. Huang Y, Huang J, Chen Y. Protein & Cell R EVIEW Alpha-helical cationic antimicrobial peptides : relationships of structure and function. 2010;1(2):143–52.
 46. Æ BLÆSZ, Chen WDÆY, Cao ÆEP. Expression in *Escherichia coli* and purification of bioactive antibacterial peptide ABP-CM4 from the Chinese silk worm , *Bombyx mori*. 2007;1031–6.
 47. Omardien S, Drijfhout JW, Vaz FM, Wenzel M, Hamoen LW, Zaat SAJ, et al. Bactericidal activity of amphipathic cationic antimicrobial peptides involves altering the membrane fluidity when interacting with the phospholipid bilayer. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2018;1860(11):2404–15. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273618301767>
 48. Sanz-García F, Hernando-Amado S, Martínez JL. Mutational evolution of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to ribosome-targeting antibiotics. *Front Genet.* 2018;9(OCT):1–13.
 49. Willmotft CJR, Maxwell A. A Single Point Mutation in the DNA Gyrase A Protein Greatly Reduces Binding of Fluoroquinolones to the Gyrase-DNA Complex. 1993;37(1):126–7.
 50. Higgins PG, Fluit AC, Milatovic D, Verhoef J, Schmitz FJ. Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;21(5):409–13.
 51. Leyva S. Fluoroquinolonas . Mecanismos de acción y resistencia , estructura , síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. 2008;2(1):1–13.
 52. Martínez P, Máttar S. Mutación en el gen *gyrA* de aislamientos hospitalarios de *Acinetobacter baumannii* en Montería, Colombia. *Infectio.* 2010;14(2):97–104.
 53. Ummary S. TERAPÉUTICA MÉDICA CARBAPENÉMICOS : TIPOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA. 2013;(608):599–605.
 54. Vignoli R, Seija V. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. :649–62.

55. Estepa V, Rojo-bezares B, Azcona-gutiérrez JM, Olarte I, Torres C, Sáenz Y. Caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenémicos en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital espa nol. 2017;35(3):141–7.
56. Correa A, Del Campo R, Perenguez M, Blanco VM, Rodríguez-Baños M, Perez F, et al. Dissemination of high-risk clones of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(4):2421–5.
57. Villegas MV, Lolans K, Del Rosario Olivera M, Suarez CJ, Correa A, Queenan AM, et al. First detection of metallo- β -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(1):226–9.
58. Rojas LJ, Mojica MF, Blanco VM, Correa A, Montealegre MC, De La Cadena E, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coharboring KPC and VIM carbapenemases in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(2):1101–2.
59. Villegas MV, Correa A, Perez F, Miranda MC, Zuluaga T, Quinn JP. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;49(3):217–22.
60. Cuzon G, Naas T, Correa A, Quinn JP, Villegas MV, Nordmann P. Dissemination of the KPC-2 carbapenemase in non-*Klebsiella pneumoniae* enterobacterial isolates from Colombia. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2013;42(1):59–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.04.002>
61. Villa LM, Cortés JA, Leal AL, Meneses A, Meléndez MP, De Grebo N. Resistance to antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* in Colombian hospitals. *Rev Chil Infectol*. 2013;30(6):605–10.
62. Aguilar-londo C, Quiroga-echeverr A, Builes-monta CE, Villa-franco JP, Zuleta-tobon JJ, Montúfar-pantoja MC, et al. Experiencia clínica con infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa , en una institución de ense ~ nanza universitaria en Medellín , Colombia. *Infectio*. 2016;20(1):17–24.
63. Saavedra SY, Lorena D, Magdalena W, Correa A, Stefany A, Reyes J, et al. Genomic and Molecular Characterization of Clinical Isolates of Enterobacteriaceae Harboring *mcr-1* in Colombia, 2002 to 2016. 2017;61(12):1–13.
64. McHugh ML. Lessons in biostatistics interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Medica* [Internet]. 2012;22(3):276–82. Available from: <https://hrcak.srce.hr/89395>
65. CLSI. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters: fourth edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.; 2016.
66. COHEN J, University NY. A coefficient of agreement for nominal scales. In: *Educational and Psychological Measurement*. 1960. p. 37-46 ST-A coefficient of agreement for nominal.
67. Manterola C, Grande L, Otzen T, Salazar P. Confiabilidad, precisión o reproducibilidad de las mediciones. Métodos de valoración, utilidad y aplicaciones en la práctica clínica. 2018;1(6):680–8.
68. Kahlmeter G, Brown DFJ, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Österlund A, et al. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(2):145–8.
69. Mercer DK, Torres MDT, Duay SS, Lovie E, Simpson L, von Köckritz-Blickwede M, et al. Antimicrobial Susceptibility Testing of Antimicrobial Peptides to Better Predict Efficacy. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10(July):1–34.
70. Yu G, Baeder DY, Regoes RR, Rolff J. Combination effects of antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(3):1717–24.
71. Romoli O, Mukherjee S, Mohid SA, Dutta A, Montali A, Franzolin E, et al. Enhanced Silk Worm Cecropin B Antimicrobial Activity against *Pseudomonas aeruginosa* from Single Amino Acid Variation. *ACS Infect Dis*. 2019;5(7):1200–13.
72. Kaushal A, Gupta K, Shah R, van Hoek ML. Antimicrobial activity of mosquito cecropin peptides against *Francisella*. *Dev Comp Immunol* [Internet]. 2016;63:171–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2016.05.018>
73. Lockey TD, Ourth DD. Formation of pores in *Escherichia coli* cell membranes by a cecropin isolated from hemolymph of *Heliothis virescens* larvae. 1996;271:263–71.
74. Wang J, Ma K, Ruan M, Wang Y, Li Y, Fu Y V., et al. A novel cecropin B-derived peptide with antibacterial and potential anti-inflammatory properties. *PeerJ*. 2018;2018(7):1–21.

75. López CO. Diseño, síntesis, caracterización y evaluación in vitro de la actividad de los péptidos antimicrobianos contra bacterias patógenas resistentes a antibióticos. 2019;43(169):614–27.
76. Rivas-Santiago B, Sada E, Hernández-Pando R, Tsutsumi V. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Publica Mex.* 2006;48(1):62–71.
77. Antimicrobianos PC, Futura UNA, Terapéutica O. EDITORIAL CATIONIC ANTIMICROBIAL PEPTIDES — A FUTURE THERAPEUTIC OPTION ? 2007;467–8.
78. Cendry A. Resumen Introducción Características de los péptidos catiónicos. In 2005. p. 53–8.
79. McDERMOTT AM. PÉPTIDOS CATIÓNICOS ANTIMICROBIANOS . ¿ UNA FUTURA OPCIÓN TERAPÉUTICA? CATIONIC ANTIMICROBIAL PEPTIDES — A FUTURE THERAPEUTIC OPTION? 2007;469–70.
80. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):252–75.
81. Zhong C, Zhu N, Zhu Y, Liu T, Gou S, Xie J, et al. Antimicrobial peptides conjugated with fatty acids on the side chain of D-amino acid promises antimicrobial potency against multidrug-resistant bacteria. *Eur J Pharm Sci.* 2020;141(October 2019):105123.
82. Liu Y, Liu PP, Wang LH, Wei DD, Wan LG, Zhang W. Capsular Polysaccharide Types and Virulence-Related Traits of Epidemic KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a Chinese University Hospital. *Microb Drug Resist.* 2017;23(7):901–7.
83. Lee E, Kim JK, Jeon D, Jeong KW, Shin A, Kim Y. Functional roles of aromatic residues and helices of papiliocin in its antimicrobial and anti-inflammatory activities. *Sci Rep [Internet].* 2015;5(April):1–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep12048>
84. Lee E, Shin A, Kim Y. Anti-inflammatory activities of cecropin A and its mechanism of action. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2015;88(1):31–44.
85. Saugar JM, Rodríguez-Hernández MJ, De La Torre BG, Pachón-Ibañez ME, Fernández-Reyes M, Andreu D, et al. Activity of cecropin A-melittin hybrid peptides against colistin-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: Molecular basis for the differential mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(4):1251–6.
86. Jayamani E, Rajamuthiah R, Larkins-Ford J, Fuchs BB, Conery AL, Vilcinskis A, et al. Insect-derived cecropins display activity against *Acinetobacter baumannii* in a whole-animal high-throughput *Caenorhabditis elegans* model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(3):1728–37.
87. Brumfitt W. Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50(5):731–4.
88. Jiang Z, Vasil AI, Hale JD, Hancock REW, Vasil ML, Hodges RS. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic alpha-helical cationic antimicrobial pept. *Biopolymers [Internet].* 2008;90(3):369–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18098173><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2761230>
89. Chen Y, Guarnieri MT, Vasil AI, Vasil ML, Mant CT, Hodges RS. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α -helical antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1398–406.
90. Chou HT, Kuo TY, Chiang JC, Pei MJ, Yang W Ter, Yu HC, et al. Design and synthesis of cationic antimicrobial peptides with improved activity and selectivity against *Vibrio* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;32(2):130–8.
91. Liu Z, Brady A, Young A, Rasimick B, Chen K, Zhou C, et al. Length effects in antimicrobial peptides of the (RW)_n series. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(2):597–603.
92. Hancock RE. Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs.* 2000 Aug;9(8):1723–9.

ANEXO 1:

Material suplementario

Tabla Suplementaria 1. Puntos de corte epidemiológicos de antibióticos convencionales para *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* según el CLSI.

Categoría	Agente antimicrobiano (AB)	<i>P. aeruginosa</i> CMI (µg/mL)	<i>K. pneumoniae</i> CMI (µg/mL)
1. Penicilinas + inhibidores de β-lactamasa	1. Ampicilina/Sulbactam	32 - 64	0.5 - 16
2. Penicilinas antipseudomonales + inhibidores de β-lactamasa	2. Piperacilina/Tazobactam	0.5 - 16	0.5 - 8
3. Cefamicinas	3. Cefoxitina	-	1 - 8
4. Cefalosporinas de tercera y cuarta generación	4. Ceftazidima	0.5 - 8	0.03 - 0.5
	4. Ceftriaxona	-	0.008 - 0.12
	4. Cefepima	0.5 - 8	0.015 - 0.12
	5. Doripenem	0.25 - 0.5	0.03
5. Carbapenems	5. Ertapenem	-	0.008 - 0.25
	5. Imipenem	0.25 - 4	0.12
	5. Meropenem	0.06 - 2	0.008 - 0.12
6. Aminoglucósidos	6. Amikacina	0.5 - 16	0.5 - 8
	6. Gentamicina	0.25 - 8	0.12 - 2
7. Fluoroquinolonas	7. Ciprofloxacino	0.03 - 0.5	0.008 - 0.12
8. Glicilciclinas	8. Tigeciclina ¹	Resistencia intrínseca	0.12 - 2
9. Polimixinas	9. Colistina	0.5 - 4	0.5

¹ Punto de corte definido por el The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST 2019. MIC and zone diameter distributions and ECOFFs [Internet]. 2019.