

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**Caracterización molecular de los genes asociados a la
resistencia antimicrobiana en *Bartonella bacilliformis***

TESIS

Para optar al Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo

AUTOR

Ruth Liliám Quispe Gaspar

ASESORES

Ruth García de la Guarda

Joaquin Ruiz Blázquez

Lima-Perú

2009

La gente normal va al colegio y estudia mucho para algún día poder trabajar en una gran empresa que les pague un buen sueldo. Los que quieren ser ricos van a la escuela estudian mucho para saber algún día como comprar una gran empresa y contratar a gente más inteligente que ellos para que trabajen.

La riqueza es el número de días que podrías vivir a partir de hoy con el dinero que tienes si dejaras de trabajar. La libertad financiera se consigue cuando la riqueza alcanza toda tu vida, cuando el dinero que tienes es suficiente para mantener todos los gastos de tu vida aunque no trabajes.

La gente normal trabaja por dinero. Los que quieren ser ricos prefieren que su dinero trabaje por ellos. ¡Yo no trabajo para ganar dinero!. El dinero trabaja para mí. Si aprendes las lecciones de la vida, te irá bien. Si no, la vida simplemente continuará empujándote de aquí para allá. Las oportunidades están delante de nuestras narices. Lo mejor era que nuestro negocio generaba dinero para nosotros, incluso sin que nosotros estuviéramos físicamente allí. Nuestro dinero trabajaba para nosotros.

“Padre rico padre pobre” de Robert Kiyosaki

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible la realización de mi tesis y en particular a las siguientes personas:

A mis padres y a mis hermanos por su paciencia y apoyo incondicional en mi formación profesional. A mi amigo y compañero Michael por su confianza, buenos consejos y amor, que en conjunto han hecho ver en mí, que todo puede lograrse si emprendemos la marcha.

De igual modo quiero expresar mis agradecimientos a mi asesor externo al Dr. Joaquim Ruiz, del Hospital Clínico de Barcelona-España, por las sugerencias y valiosas críticas brindadas en el desarrollo de la tesis, y por su amistad.

A mi amiga Mag. Lidia Flores, por haberme introducido en este mundo de la investigación, por enseñarme y darme algunos consejos sobre el cultivo de *Bartonella bacilliformis*.

A mi asesora de tesis M Sc. Ruth García de la Guarda por su generosidad y aprender de su amplia experiencia en el campo de la investigación, por los consejos brindados para la realización de esta tesis.

Al Dr. Pablo Ramírez por sus sugerencias durante mi permanencia en el Laboratorio de Microbiología Molecular.

A mis amigos y colegas del Laboratorio de Microbiología Molecular, por su cálida compañía, solidaridad y gratos momentos compartidos.

Al Dr. Jorge Cortez y a Teófanos Peredes por su apoyo en la toma de muestras en Calipuy, por guiarnos y llevarnos hasta los pacientes a pesar de las condiciones del camino.

Al Dr. Manuel Montoya por haber respondido mis numerosos e-mail, y por ayudarnos a conseguir los contactos necesarios en el Centro de Salud de Urubamba-Cusco. Asimismo, al Biólogo Paúl Pacheco Roman un colega y amigo, con quien se coordinó y se logró realizar los muestreos en Cusco. A la Tecnóloga Flor Céspedes por su apoyo en la toma de muestras en Uchumayo, que gracias al interés por sus pacientes pudimos llegar hasta las casas de ellos sin ningún inconveniente.

Esta tesis ha sido financiada por el Fondo de Promoción de Trabajo de Tesis de Pregrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Facultad de Ciencias Biológicas y Consejo Superior de Investigación – Vicerrectorado de Investigación), mediante R.R. N° 02532-R-08.

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Especies de <i>Bartonella</i> spp.....	8
Tabla 2. Esquemas de tratamiento antimicrobiano de la Bartonelosis aguda no grave.....	22
Tabla 3. Esquemas de tratamiento antimicrobiano de la Bartonelosis aguda grave.....	23
Tabla 4. Iniciadores para amplificar los genes asociados a la resistencia a antibióticos utilizados en esta tesis.....	35
Tabla 5. Número de muestras de sangre de pacientes con Enfermedad de Carrion por zona de muestreo.....	37
Tabla 6. Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de <i>B. bacilliformis</i> a antibióticos.....	40
Tabla 7. Genes asociados a la resistencia a antibióticos en <i>B. bacilliformis</i> y la determinación del tamaño del amplificado.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mapa de Incidencia de la Enfermedad de Carrión en el Perú	13
Figura 2. <i>Lutzomyia verrucarum</i> : vector de <i>Bartonella bacilliformis</i>	14
Figura 3. Sitio de acción de los agentes antimicrobianos.....	24
Figure 4. Estructura del ácido nalidíxico y ciprofloxacina.....	27
Figura 5. Diagrama de los sitios de inhibición de la biosíntesis de proteínas por varios antibióticos.....	28
Figura 6. Estructura del cloranfenicol y de la eritromicina (prototipo o macrólido).....	30
Figura 7. Diagrama de la transferencia o reducción de la transferencia de aminoglicósidos a través de la pared celular bacteriana.....	31
Figura 8. Mapa de incidencia de Bartonelosis (2009) y zonas de muestreo.....	38
Figura 9. Hemocultivo positivo del cuál se aisló la cepa USM-LMM-002 de <i>B. bacilliformis</i> de un paciente de Uchumayo – Cusco	39
Figura 10. Coloración Giemsa de una muestra de sangre de un paciente de Calipuy – La Libertad del cual se aisló la cepa de <i>B. bacilliformis</i> USM-LMM-001	39
Figura 11. Crecimiento de <i>B. bacilliformis</i> CIP 57.18 en placa.....	40
Figura 12. Resistencia al ácido nalidíxico en presencia y ausencia de 20 mg/L de inhibidor de bombas de expulsión.....	41
Figura 13. Susceptibilidad antimicrobiana de la cepa <i>Bartonella bacilliformis</i> CIP57.18.....	42
Figura 14. Susceptibilidad antimicrobiana a la cepa <i>B. bacilliformis</i> USM-LMM-001	42
Figura 15. Susceptibilidad antimicrobiana de la cepa <i>B. bacilliformis</i> USM-LMM-002	43
Figura 16. Extracción de DNA genómico de las cepas de <i>B. bacilliformis</i> . Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	44

Figura 17. Amplificados del gen <i>ialB</i> para la identificación de la especie <i>B. bacilliformis</i>	44
Figura 18. Posibles genes asociados a la resistencia a antibióticos de la cepa <i>B. bacilliformis</i> CIP57.18.....	45
Figura 19. Amplificados de los genes probablemente asociados a la resistencia a ciprofloxacina, ácido nalidíxico, rifampicina en <i>B. bacilliformis</i>	46
Figura 20. Posibles genes asociados a la resistencia a antibióticos en <i>B. bacilliformis</i> . Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	46
Figura 21. Posibles genes asociados a la resistencia a gentamicina y eritromicina en <i>B. bacilliformis</i> . Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	46
Figura 22. Alineamiento múltiple de la proteína GyrA de las cepas de <i>B. bacilliformis</i>	47
Figura 23. Alineamiento múltiple de la proteína ParC de las cepas de <i>B. bacilliformis</i>	48
Figura 24. Alineamiento múltiple de la subunidad β de la RNA polimerasa de las cepas de <i>B. bacilliformis</i>	48
Figura 25. Alineamiento múltiple de la proteína ribosomal L4 de las cepas de <i>B. bacilliformis</i>	49
Figura 26. Alineamiento múltiple de la proteína IalB de las cepas de <i>B. bacilliformis</i>	50
Figura 27. Análisis bioinformático de la GyrA de <i>B. bacilliformis</i> KC583. Predicción de la estructura de la proteína GyrA de <i>B. bacilliformis</i>	56

ABREVIATURAS

AN	Ácido nalidíxico
ATCC	American Type Culture Collection
CIP	Ciprofloxacina
C	Cloranfenicol
E	Eritromicina
CN	Gentamicina
DO	Doxiciclina
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DHFA	Ácido dihidrofólico
dNTP	Desoxiribonucleósido trifosfato
GRC	Glóbulos rojos de carnero
G+C	Guanina más citosina
IFI	Ensayo de inmunofluorescencia indirecta
INS	Instituto Nacional de Salud
QRDR	Región determinante de resistencia a quinolonas
<i>g</i>	<i>Gravedades</i>
<i>gyrA</i>	Gen de la subunidad A de la girasa.
<i>GyrA</i>	Proteína topoisomera II
kDa	KiloDalton
Km²	Kilómetro cuadrado.
L	Litro
L4	Gen de la proteína ribosomal L4
LVX	Levofloxacina
MIC	Mínima concentración inhibitoria
min	Minutos
mg/kg/día	Miligramos/ kilogramo/día
mM	Milimolar
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
ng	Nanogramos
nm	Nanometros
PABA	Ácido paraminobenzoico
<i>parC</i>	Gen de la subunidad C de la topoisomerasa IV

ParC	Proteína ParC
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pmol	Picomoles
RD	Rifampicina
<i>rpoB</i>	Gen de la subunidad β de la RNA polimerasa
rRNA	Ácido ribonucleíco ribosomal
TAE	Tris-acetato-EDTA
THFA	Ácido tetrahidrofólico
UFC	Unidades formadores de colonia
μg	Microgramos
μl	Microlitro
μm	micras
V	Voltios
%	Porcentaje

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
LISTA DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	7
2.1 Bartonella	7
2.1.1 Bartonella bacilliformis	8
2.1.2 Bartonella henselae	9
2.1.2 Bartonella quintana	10
2.2 Enfermedad de Carrión	10
2.2.1 Aspectos históricos	10
2.2.2 Epidemiología	11
2.2.2.1 Vectores artrópodos y transmisión	14
2.2.3 Manifestaciones clínicas	15
2.2.4 Diagnóstico	18
2.2.5 Tratamiento	21
2.2.6 Prevención y Control	23
2.3 Resistencia a antibióticos en Bartonella spp.	23
2.3.1 Bioquímica de la acción antimicrobiana	23
2.3.2 Mecanismos de resistencia a antibióticos	24
III. MATERIAL Y MÉTODOS	33
IV. RESULTADOS	37
V. DISCUSIÓN	51
VI. CONCLUSIONES	58
VII. RECOMENDACIONES	59
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
IX. ANEXOS	65

RESUMEN

Bartonella bacilliformis es el agente causal de la enfermedad de Carrión. Actualmente, en el Perú los casos se siguen presentando y se ha reportado fallas en el tratamiento. Hay muy pocas investigaciones acerca de la susceptibilidad a antimicrobianos, y no se tiene estandarizada una prueba de antibiograma para esta bacteria. Asimismo, aún no se conocen los mecanismos de resistencia ni las secuencias de los genes asociados a ellas en cepas nativas circulantes de *Bartonella bacilliformis*. Por ello, el objetivo fue caracterizar molecularmente los genes asociados a la resistencia antimicrobiana en cepas circulantes en zonas endémicas para evaluar si presentan o no mutaciones en estos genes. Se estandarizó una prueba de antibiograma utilizando la cepa *B. bacilliformis* CIP 57.18 colocándose los discos de antibióticos comerciales: ciprofloxacina (CIP, 5 µg), rifampicina (RD, 30 µg), eritromicina (E, 15 µg), gentamicina (CN, 15 µg), doxiciclina (DO, 30 µg), cloranfenicol (30 µg), ácido nalidíxico (AN, 5 µg) y levofloxacina (LVX, 5 µg). Todas las cepas ensayadas mostraron resistencia al ácido nalidíxico pero sensibilidad a ciprofloxacina, a excepción de la cepa USM-LMM-002 que presentó susceptibilidad disminuida a ciprofloxacina. El análisis de las proteínas que codifican los genes *gyrA* y *parC* implicados en la resistencia a estos antibióticos, determinó que ambos presentan una diferencia aminoacídica (Ser83 por Ala) en la región del QRDR en relación a la GyrA y ParC de *E. coli*. Interesantemente, esta Ala83 en GyrA y ParC sólo proporciona resistencia a ácido nalidíxico y no a ciprofloxacina, siendo necesaria la acumulación de mutaciones en *gyrA* para la resistencia a ciprofloxacina. Para los demás antibióticos, las cepas fueron sensibles y en el secuenciamiento de los genes (*rpoB*, L4 y 16S ribosomal) asociado a dichas resistencias no se encontró ninguna mutación. La resistencia constitutiva al ácido nalidíxico es una propiedad de *B. bacilliformis*, y sería un buen indicador de la susceptibilidad a las fluoroquinolonas pero su resistencia no está relacionada a la resistencia de otras fluoroquinolonas. Además, la sensibilidad a otros antibióticos como doxiciclina, rifampicina, cloranfenicol y gentamicina podría indicar alternativas en el tratamiento de esta enfermedad aunque ensayos clínicos serían necesarios.

Palabras clave: *Bartonella bacilliformis*, antibiograma, antibiótico, resistencia microbiana, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, fluoroquinolona.

ABSTRACT

Bartonella bacilliformis is the causative agent of Carrion's disease. Currently in Peru are still present cases and are reported failures in treatment. There is very little research on antimicrobial susceptibility, nor has been standardized a test of sensitivity to the bacteria. Also, are not yet known resistance mechanisms and the sequences of genes associated with them in circulating native strains of *Bartonella bacilliformis*. Therefore, the objective was molecularly characterize the genes associated with antimicrobial resistance in isolates circulating in endemic areas to assess whether present or not mutations in these genes. Susceptibility testing was standardized using the strain of *B. bacilliformis* CIP 57.18 placing commercial antibiotic discs: ciprofloxacin (CIP, 5 µg), rifampin (RD, 30 µg), erythromycin (E, 15 µg), gentamicin (CN, 15 µg), doxycycline (DO, 30 µg), chloramphenicol (30 µg), nalidixic acid (NA, 5 µg) and levofloxacin (LVX, 5 µg). All strains tested showed resistance to nalidixic acid but sensitive to ciprofloxacin, except for strain USM-LMM-002 that presented reduced susceptibility to ciprofloxacin. The analysis of the proteins encoded by *gyrA* and *parC* genes involved in resistance to these antibiotics, determined that both have an aminoacid difference (Ser83 by Ala) in the QRDR region in relation to the GyrA and ParC of *E. coli*. Interestingly, the Ala83 in GyrA and ParC only provides resistance to nalidixic acid and not to ciprofloxacin, being necessary the accumulation of mutations in *gyrA* for ciprofloxacin resistance. For other antibiotics, the strains were sensitive and sequencing of genes (*rpoB*, and 16S ribosomal L4) associated with such resistance, there was no mutation. Constitutive resistance to nalidixic acid is a property of *B. bacilliformis*, and would be a good indicator of susceptibility to fluoroquinolones but this resistance is not related to resistance to other fluoroquinolones. In addition, sensitivity to other antibiotics such as doxycycline, rifampicin, chloramphenicol and gentamicin might suggest alternatives in the treatment of this disease, although clinical trials are needed.

Keywords: *Bartonella bacilliformis*, antibiogram, antibiotic, microbial resistance, nalidixic acid, ciprofloxacin, fluoroquinolone.

I. INTRODUCCIÓN

La bartonelosis humana o Enfermedad de Carrión comprende dos fases: la primera, llamada también Fiebre de La Oroya o fase hemática, se caracteriza por un síndrome agudo de fiebre, malestar general y anemia hemolítica severa como consecuencia de la invasión del microorganismo a los eritrocitos; la segunda fase, llamada también Verruga Peruana o fase tisular, se desarrolla varias semanas después de la primera fase y se caracteriza por la aparición de erupciones cutáneas angiomatosas luego de la invasión de las células endoteliales vasculares y de la estimulación de la formación de nuevos vasos sanguíneos por parte de la bacteria.

En el Perú, las tasas de incidencia de la enfermedad reportadas han variado a lo largo de varias décadas, siendo el Departamento de La Libertad el que tuvo las más altas en el 2007, presentándose 133 casos en la semana epidemiológica N°33 (DGE, 2007). A pesar del tratamiento los reportes de letalidad de la enfermedad oscilan entre 7.7 y 15%, incrementándose hasta 30 – 60% cuando hay compromiso neurológico y en las poblaciones no tratadas, ha alcanzado un 88% (Maguiña, 1998).

Esta enfermedad es favorecida por los cambios climatológicos, como el fenómeno “El Niño” de los años de 1992-93 y 1997-98 donde se reportaron brotes en los departamentos de Ancash, Amazonas, Cajamarca, Huánuco y Cuzco. Otros brotes se han reportado entre los años 2001-2005 en los departamentos de Huánuco, La Libertad, Lima, Piura, Lambayeque, Ancash y Cajamarca. Durante el 2006 se reportaron brotes en nuevas áreas dentro de La Libertad y en este mismo departamento el 2007 según la Dirección General de Epidemiología (DGE, 2007) se presentó el último brote en las provincias de Santiago de Chuco y Otuzco.

El tratamiento de la enfermedad ha mejorado; en el pasado, el único tratamiento para la fiebre de la Oroya era la transfusión sanguínea, siendo ineficiente y el rango de mortalidad alto. Luego, con la llegada de la era de los antibióticos se empezó a utilizar como parte del tratamiento: la penicilina G, cloranfenicol, tetraciclina y eritromicina. (Rolain *et al.*, 2004). Estas drogas producen una rápida disminución del estado febril con la desaparición de la bacteria en la sangre usualmente en 24 horas; sin embargo, el

descuido terapéutico y la persistencia de la bacteremia, han sido reportados después de retirar estos antibióticos (Bass *et al.*, 1997; Rolain *et al.*, 2004).

En los últimos 5 años, compuestos como las fluoroquinolonas (ciprofloxacina) han sido usados exitosamente en adultos y niños mayores de 6 años y representa una alternativa al cloranfenicol para el tratamiento de la fiebre de la Oroya, ya que el tratamiento exitoso con cloranfenicol en la fase aguda no garantiza eliminar el riesgo del paciente para desarrollar la fase eruptiva, siendo ineficaces para esta fase. Por esta razón, es recomendable el uso simultáneo de otros antibióticos (Rolain *et al.*, 2004). Sin embargo, también se ha determinado que las fluoroquinolonas usadas en monoterapias pueden ser ineficaces, porque se ha logrado aislar fácilmente bacterias resistentes a ciprofloxacina *in vitro* (Biswas *et al.*, 2007), sugiriendo que esta resistencia podría ocurrir en forma natural y resultaría necesario realizar a futuro nuevas pruebas de E-test en cepas de origen clínico. Para un tratamiento eficaz es muy importante hacer estudios de la susceptibilidad bacteriana *in vitro* contra antimicrobianos; sin embargo, hay muy pocas investigaciones acerca de la susceptibilidad de los aislados clínicos de *B. bacilliformis* y no existe una metodología estandarizada y reproducible para su determinación. Hasta el momento, sólo se han realizado estudios de resistencia a antibióticos mediante la inducción *in vitro* y aún no se conoce si existen mutaciones en cepas nativas circulantes de *B. bacilliformis*.

Por esta razón, en el presente trabajo se ha planteado realizar la caracterización molecular de los genes asociados a la resistencia antimicrobiana en cepas de *Bartonella bacilliformis* de origen clínico (aisladas de los departamentos del Cusco y de La Libertad, Perú) y en cepas proporcionadas por el Instituto Pasteur (Francia). Primeramente, se determinó la susceptibilidad antimicrobiana mediante métodos microbiológicos convencionales (Prueba de Difusión en Disco) (Biswas *et al.*, 2007) sobre placas, con la finalidad de evaluar si las cepas circulantes actualmente presentan resistencia a determinados antibióticos estudiados por otros autores (Biswas *et al.*, 2007), luego se secuenciaron los genes asociados al desarrollo de la resistencia. El análisis de ambos resultados permitirá: (a) conocer la resistencia a drogas de las cepas circulantes en la zona endémica en estudio y (b) determinar si los genes presentan mutaciones asociadas a dichas resistencias.

El presente estudio de caracterización molecular de los genes relacionados con la resistencia a los antimicrobianos de cepas circulantes de *Bartonella bacilliformis*, será de gran importancia para mejorar el tratamiento de la misma.

En la actualidad, el INS (Instituto Nacional de Salud) tiene una dosificación de antibióticos para el tratamiento de la enfermedad, destacando la ciprofloxacina (Montoya y Cordova, 2001). Los esquemas de tratamiento de la Enfermedad de Carrión propuestos se han basado en la evaluación de la respuesta a un antibiótico en una serie de casos clínicos sin tener un grupo testigo, no se ha hecho un ensayo clínico, doble ciego y randomizado para evaluar la eficacia de un antibiótico frente a otro (Pachas, 2005). Asimismo, hay muy pocos estudios que demuestren la resistencia *in vitro* de *Bartonella bacilliformis* a los antibióticos y solamente sobre la base de la experiencia clínica se sabe que cada vez es más frecuente la falta de respuesta al cloranfenicol y a la rifampicina. Cuando esto ocurre, los médicos suelen indicar ciprofloxacina, pero existen casos en los que se vuelve a presentar la sintomatología de la fase aguda (bacteriemia) persistiendo por largo tiempo (Montoya y Cordova, 2001; Henriquez *et al.*, 2004).

Se ha demostrado *in vitro* que estos antibióticos pueden producir mutación fácilmente en los genes de *Bartonella bacilliformis*. Las cepas resistentes a ciprofloxacina contienen un cambio en la posición aminoacídica 87 (Asp→Asn), en la región determinante de la resistencia a quinolonas de la proteína DNA girasa; las cepas resistentes a rifampicina tienen un cambio en la posición aminoacídica 531 (Ser→Phe) en la región determinante de esta resistencia del gen *rpoB*. Además, las cepas resistentes a eritromicina poseen una mutación A2058G en el gen rRNA 23S. En comparación con la doxiciclina y gentamicina, que serían candidatos adecuados para disminuir el porcentaje de adquisición de resistencia (Biswas *et al.*, 2007). Sugiriendo que esta resistencia podría ocurrir en forma natural y resultaría necesario realizar nuevos estudios en cepas de origen clínico en el futuro.

Asimismo, esta investigación será el inicio para el desarrollo de un método para determinar la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de *Bartonella bacilliformis* lo cual actualmente no se hace en los centros hospitalarios.

Además, el conocimiento de las mutaciones relacionadas con la resistencia a los antimicrobianos de *Bartonella bacilliformis*, facilitará el posterior desarrollo de métodos moleculares de determinación de dicha resistencia, los que a su vez serán invaluable para mejorar la vigilancia de la misma.

El presente estudio en las zonas endémicas proporcionaría un modelo para otras investigaciones similares en las diferentes zonas endémicas del Perú, contribuyendo así, a mediano plazo, a un buen manejo del tratamiento de la Enfermedad de Carrión.

La hipótesis que se plantea en el presente trabajo es que existen diferencias nucleotídicas en regiones específicas de los genes asociados a la resistencia a antibióticos, que determinan el desarrollo de la resistencia en cepas circulantes de *B. bacilliformis* aisladas de zonas endémicas.

El desarrollo de este estudio está orientado a los siguientes objetivos:

Objetivo General

Caracterizar molecularmente los genes asociados a la resistencia antimicrobiana en cepas de *Bartonella bacilliformis* aisladas de zonas endémicas.

Objetivos Específicos

- Estandarizar una prueba de antibiograma mediante ensayos de difusión en disco para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana en *Bartonella bacilliformis*.
- Analizar los genes asociados a la resistencia antimicrobiana mediante amplificación por la PCR y secuenciación.
- Comparar las secuencias nucleotídicas de dichos genes con las secuencias correspondientes de *B. bacilliformis* KC583 y *E. coli* K12 reportadas en la base de datos del Genbank, para determinar posibles mutaciones asociados a la resistencia.

II. ANTECEDENTES

2.1 *Bartonella*

Las especies de *Bartonella* son cocobacilos gram negativos que miden de 0.6 a 2 μm . Se comportan como microorganismos aerobios, no móviles, intracelulares facultativos y son difíciles de cultivar. Anteriormente, las bartonelas eran consideradas en el orden *Rickettsiales* pero los estudios taxonómicos basados en el gen RNA 16S ribosomal las incluyeron en el orden *Rhizobiales* del subgrupo 2 de las α -proteobacterias. Aunque, la identificación de las especies de *Bartonella* fue posterior, la primera descripción de su infección se asoció con la Fiebre de la Oroya (conocida después como Enfermedad de Carrión), a finales del siglo XIX. Hasta 1993 se asoció como microorganismo patógeno para el hombre a sólo una especie de *Bartonella*: *B. bacilliformis*, agente causal de la Enfermedad de Carrión, ya que hasta ese momento el resto de las especies se incluían en el género *Rochalimaea*. Con las nuevas técnicas de biología molecular se han identificado 22 especies de *Bartonella* distribuidas ampliamente en la naturaleza y una especie con tres subespecies. Once especies se han relacionado con enfermedades en los seres humanos (Burstein y Mayta, 2007; Vega y Ariza, 2008). En la Tabla 1, se menciona las especies de bartonelas incluyendo la última bartonella identificada (*Bartonella rochalimae*), la que fue identificada en una paciente proveniente de Estados Unidos de Norteamérica, que vino de turismo al Perú y visitó el valle sagrado en Urubamba en Cusco, así como Nazca, Lima e Iquitos con un cuadro caracterizado por fiebre, insomnio, mialgias, náuseas, dolor de cabeza y tos moderada, encontrándose en el examen físico esplenomegalia y un rash macular difuso (Burstein y Mayta, 2007; Maguiña *et al.*, 2008).

Los mecanismos de transmisión dependen del huésped y los vectores. El gato es el reservorio natural de *B. henselae* y *B. clarridgeae*, mientras que los ratones campestres (*Peromyscus leucopus*) hospedan a *B. vinsonii*, *B. grahamii*, *B. doshiae* y *B. taylorii*; así mismo, los humanos son el único reservorio conocido de *B. bacilliformis* y *B. quintana* descubierto hasta ahora. A excepción de *B. bacilliformis*, la cual se limita a ciertas regiones de los Andes, el resto de las especies se encuentran distribuidas ampliamente por todo el mundo. La distribución de *B. bacilliformis* se relaciona con su vector *Lutzomyia verrucarum*, cuyo hábitat es la región andina de Colombia, Perú y Ecuador. Otro vector potencial de *Bartonella* es la pulga de los gatos (*Ctenocephalides felis*), de las cuales se ha aislado *B. henselae*, *B. clarridgeae* y *B. quintana*. En la

actualidad, se han detectado especies de *Bartonella* en la garrapata *Ixodes ricinus*, pero aún se desconoce su papel en la transmisión de la infección a los seres humanos (Vega y Ariza, 2008).

Tabla 1. Especies identificadas de *Bartonella* spp., año de descripción, reservorios, vectores y enfermedades que provocan en humanos.

Especies de <i>Bartonella</i>	Primer cultivo	Reservorio	Vector	Enfermedad en humanos
<i>B. bacilliformis</i>	1919	humanos	<i>Lutzomyia verrucarum</i> , <i>Lutzomyia peruensis</i>	Enfermedad de Carrion, bacteriemia
<i>B. talpae</i>		topo		
<i>B. peromysci</i>	1942	roedores		
<i>B. vinsonii</i> subesp. <i>vinsonii</i>	1946			
<i>B. quintana</i>	1961	humanos	<i>Pediculus humanus</i> , <i>Ctenocephalides felis</i>	Fiebre de las trincheras, linfadenopatía crónica, angiomas bacilar, bacteriemia, endocarditis, pericarditis.
<i>B. henselae</i>	1990	gatos	<i>Ctenocephalides felis</i>	Enfermedad por arañazo de gato, angiomas bacilar, peliosis hepática, bacteriemia, endocarditis, neurorretinitis, encefalopatía.
<i>B. elizabethae</i>	1993	ratas		Endocarditis
<i>B. grahamii</i>	1995		<i>Ctenophthalmus nobilis</i>	Retinitis
<i>B. taylorii</i>	1995		<i>Ctenophthalmus nobilis</i>	
<i>B. doshiae</i>	1995			
<i>B. clarridgeiae</i>	1995	gatos	<i>Ctenocephalides felis</i>	
<i>B. vinsonii</i> subesp. <i>berkhoffii</i>	1995	perros		Endocarditis
<i>B. tribocorum</i>	1998	ratas		
<i>B. koehlerae</i>	1999	gatos	<i>Ctenocephalides felis</i>	Endocarditis
<i>B. alsatica</i>	1999	conejos		Endocarditis
<i>B. vinsonii</i> subesp. <i>arupensis</i>	1999	roedores		Bacteriemia, endocarditis
<i>B. bovis</i> (<i>weissii</i>)	1999	vacas		
<i>B. washoensis</i>	2000	roedores		Miocarditis
<i>B. birtlesii</i>	2000	ratas		
<i>B. schoenbuchensis</i>	2001	ruminantes		
<i>B. capreoli</i>	2002	ruminantes		
<i>B. chomelii</i>	2004	vacas		
<i>B. phoceensis</i>	2004	ratas		
<i>B. rattimassiliensis</i>	2004	ratas		
<i>B. rochalimae</i>	2007			Bacteriemia

Fuente: Burstein and Mayta, 2007

2.1.1 *Bartonella bacilliformis*

Es una bacteria aeróbica Gram negativa, pleomórfica, móvil, que mide 2-3 μm de largo y 0.2 - 0.5 μm de ancho. Posee forma bacilar, cocoide o cocobacilar. Dichas formas se colorean con tinción Wright, Giemsa y Leishman (Henríquez *et al.*, 2002). Se requiere de medios de cultivo especiales, siendo la temperatura óptima de desarrollo de 25°C a 30°C (González *et al.*, 2007). En estos cultivos se ha visto que la bacteria posee flagelos unipolares (entre 2 a 16); al microscopio electrónico, dichos flagelos poseen una longitud de onda de 800 nm; se sabe que los filamentos flagelares están compuestos de polipéptidos de 42 kDa, y esta disposición determina su movimiento como

“tirabuzón”, el cual le permite penetrar con facilidad a los glóbulos rojos (González *et al.*, 2007; Maguiña *et al.*, 2008).

B. bacilliformis es el agente etiológico de la Bartonelosis humana o Verruga Peruana o Fiebre de la Oroya o Enfermedad de Carrión. Ésta es una enfermedad infecciosa, oriunda del Perú, Colombia y Ecuador, que se presenta en los valles interandinos ubicados entre los 500 a 3200 m.s.n.m., valles occidentales entre los 800 a 3200 m.s.n.m. y valles orientales del norte, donde existen condiciones ecológicas favorables que permiten que vectores del género *Lutzomyia* transmitan la enfermedad (Henríquez *et al.*, 2002).

2.1.2 *Bartonella henselae*

Son bacilos Gram negativos, pequeños, ligeramente curvados, de 0.5 – 0.6 µm de ancho y 2 µm de largo. Los cultivos primarios se realizan sobre agar BHI, agar tripticosa soya y agar columbia suplementados con sangre de carnero al 5%, agar infusión de corazón conteniendo sangre de conejo al 5% y agar chocolate preparado con medio base GC. El crecimiento de los aislados sobre los medios de cultivo es de 5 a 15 días, con un promedio de 9 a 10 días de incubación. Las colonias de los cultivos primarios son heterogéneas, rugosas, en forma de coliflor, firmes, adherentes y embebidas en la superficie de agar. Luego de varios pasajes de las colonias en los medios de cultivo, el tiempo de incubación para su visualización disminuye a 3-4 días. La bacteria crece mejor entre 30-37°C en presencia de 5-10% de CO₂, pero no crece anaeróbicamente o a temperaturas de 25°C ó 42°C (Cornejo y Vizcarra, 1999). Es el agente de la enfermedad del “arañazo del gato” y es usualmente transmitida a los humanos por gatos infectados por medio del arañazo o un mordisco. La pulga del gato *Ctenocephalides felis* se reconoce como el mejor vector entre los gatos. El mecanismo exacto de transmisión a los humanos no está del todo claro (Schutze, 2000). Además, *B. henselae* esta asociado con un amplio espectro de manifestaciones de enfermedades crónicas en humanos como angiomatosis bacilar, endocarditis y fiebre prolongada y bacteremia. Investigaciones previas han demostrado que *B. henselae* induce respuesta inmune humoral y celular específica en hospederos infectados experimentalmente, incluyendo gatos, hombre y ratones. La generación de variantes genéticas es una posible estrategia para evadir la respuesta inmune específica del hospedero (Berghoff *et al.*, 2007). La cepa tipo es Houston 1 (= G5436 = ATCC 49882); cuyo contenido de G+C es

de 41 %, y su RNA ribosomal 16S ha sido depositada en el GenBank con el número de accesión M73229 (Brenner *et al.*, 1993).

2.1.2 *Bartonella quintana*

Es una bacteria oxidasa positiva (o debilmente oxidasa positiva). Es patogénica para humanos y causa la fiebre de las trincheras (Brenner *et al.*, 1993). Además, *B. quintana* esta involucrado en un amplio rango de manifestaciones clínicas similar a las infecciones de *B. henselae*. Las principales manifestaciones son endocarditis, angiomatosis bacilar y bacteremia crónica. El reservorio natural es el humano y el principal vector es el piojo corporal (*Pediculus humanus corporis*). El piojo de la cabeza en humanos (*Pediculus humanus capitis*) ha sido demostrado como un posible vector. La bacteria ha sido aislada de la pulga del gato y detectado en pulpa dental de gatos (Ehrenborg, 2007). La especie típica es *B. quintana* ATCC VR-358 (Brenner *et al.*, 1993).

2.2 Enfermedad de Carrión

Es considerada hoy como una de las principales enfermedades emergentes, apareciendo de manera importante en los últimos 10 años en muchos lugares de la sierra y la selva del Perú (Maguiña *et al.*, 2008).

2.2.1 Aspectos históricos

Esta enfermedad fue conocida por culturas precolombinas, tal como se ha podido determinar en algunos huacos y monolitos de la época. En la conquista de América las tropas españolas sufrieron las “fiebres y verrugas” en el valle ecuatoriano de Coaque, siendo diezmados muchos de ellos (González *et al.*, 2007).

En la época de la República (1870-1906) se registra una grave epidemia durante la construcción del ferrocarril Lima – La Oroya (el más alto del mundo), en ella participaron miles de trabajadores (chilenos, chinos, bolivianos, etc.) de los cuales fallecieron más de 7,000 siendo la enfermedad conocida como “Fiebre de la Oroya”; en algunos sobrevivientes aparecieron erupciones dérmicas rojizas, a las que se dio el nombre de verruga peruana. Esta epidemia motivó un gran interés de investigación en la comunidad médica internacional (González *et al.*, 2007).

En 1885, el estudiante de medicina peruano Daniel Alcides Carrión investigó y se inoculó sangre de un verrucoma y después de 21 días hizo un cuadro febril y mortal. Estableciendo la unidad clínica existente entre la fiebre de la Oroya y la verruga peruana, constituyéndose así en el mártir de la medicina peruana. Desde 1886 se le conoce por eso con el nombre de “Enfermedad de Carrión” (Tejada *et al.*, 2003; Gonzáles *et al.*, 2007). En 1905, el médico peruano Alberto Barton aisló y describió a *Bartonella bacilliformis* como agente etiológico responsable de la enfermedad de Carrión o verruga peruana. En 1913, Townsend identificó a *Lutzomyia verrucarum* como el vector responsable de la enfermedad (Gonzáles *et al.*, 2007). En 1940, Raúl Rebagliati, en su libro sobre Verruga Peruana o Enfermedad de Carrión, señala su presencia en Huánuco, en la confluencia de los ríos Monzón y Huallaga y en el distrito de Monzón. A inicios de 1996, en los caseríos de la zona alta del distrito de Monzón (Huamalíes, Huánuco) se informó de la presentación de un elevado número de pacientes con cuadros agudos de fiebre y anemia, algunos con evolución fatal. En abril de 1997 se presentó el primer caso de bartonelosis humana confirmado por laboratorio en el Hospital Regional de Huánuco (Tejada *et al.*, 2003). La enfermedad de Carrión siempre fue considerada una enfermedad histórica, anecdótica y enigmática, y ha sido estudiada no sólo por peruanos sino también por extranjeros, algunos de los cuales se han especializado en este microorganismo (Gonzáles *et al.*, 2007).

2.2.2 Epidemiología

La enfermedad de Carrión constituye una enfermedad endémica en Sudamérica y sólo se ha reportado en el Perú (en varios departamentos), Ecuador (Loja), Colombia (Nariño); en Tailandia y Sudán se han descrito cuadros similares. Esta enfermedad requiere condiciones especiales para su desarrollo y presentación; en el Perú, las áreas verrucógenas se dan en una extensa área entre los 2° de latitud norte y 13° de latitud sur de la vertiente occidental de los Andes. Clásicamente, los nichos verrucógenos se localizan entre los 500 – 3,200 m.s.n.m., pero debido a cambios ecológicos y otras variables epidemiológicas la enfermedad se ha encontrado en áreas de la costa y selva. Se estima una población de 1'686,236 habitantes que residen en estas áreas endémicas, las cuales abarcan un área de 144,496 Km² (Gonzáles *et al.*, 2007).

La Enfermedad de Carrión tiene como escenarios epidemiológicos de riesgo a 11 de 24 departamentos de nuestro país (Figura 1). Se presenta de manera endémica, como

problema de Salud Pública, en todo el Callejón de Huaylas y Callejón de Conchucos (Ancash), San Ignacio (Cajamarca), Utcubamba (Amazonas), Pataz (Trujillo), Huancabamba (Piura) habiendo reemergido en Yauyos y Huarochirí (Lima) y las provincias de Huamalíes y Huacaybamba (Huánuco). En 1998 las provincias de Urubamba, Calca y La Convención en el Departamento del Cusco, Yauyos en el Departamento de Lima; Pataz en La Libertad y toda la sierra de Ancash (tanto Callejón de Huaylas como Conchucos) han presentado un incremento general de casos (MINSA, 2005).

La enfermedad de Carrión en el departamento del Cusco es una enfermedad emergente de la que oficialmente se ha conocido su presencia en 1998. Sin embargo, retrospectivamente se conoce que en 1994, 1995 y 1997 se presentaron en total 3 casos procedentes de la provincia de La Convención-Cusco, los cuales fueron confirmados con el aislamiento de la *Bartonella bacilliformis* en hospitales de la ciudad de Lima (MINSA, 2005).

En 1998, se reportaron un total de 289 casos y un riesgo de enfermar por Bartonelosis de 25.55 x 100,000 habitantes. Confirmándose 70% de los casos y con 26 fallecidos, con una tasa de letalidad del 8.9% (MINSA, 2005).

En los últimos años se ha notificado la existencia de nuevas áreas endémicas de bartonelosis y nuevos vectores de esta enfermedad, en zonas con ecología de selva alta, como en algunas provincias de la Región Nororiental del Marañón y en el Cuzco. Esto nos estaría indicando un cambio en la epidemiología de la enfermedad, asociado al contacto del hombre con nuevas fuentes de infección y vectores en las regiones selváticas, así como las migraciones humanas (Tejada *et al.*, 2003).

Esta enfermedad ha cobrado importancia en todo el mundo por la gran accesibilidad a viajes y el flujo migratorio de la población sudamericana, principalmente de la región andina de Perú. La infección parece ser exclusiva de poblaciones que se encuentran entre uno y tres kilómetros de altitud sobre el nivel del mar (Vega y Ariza, 2008).

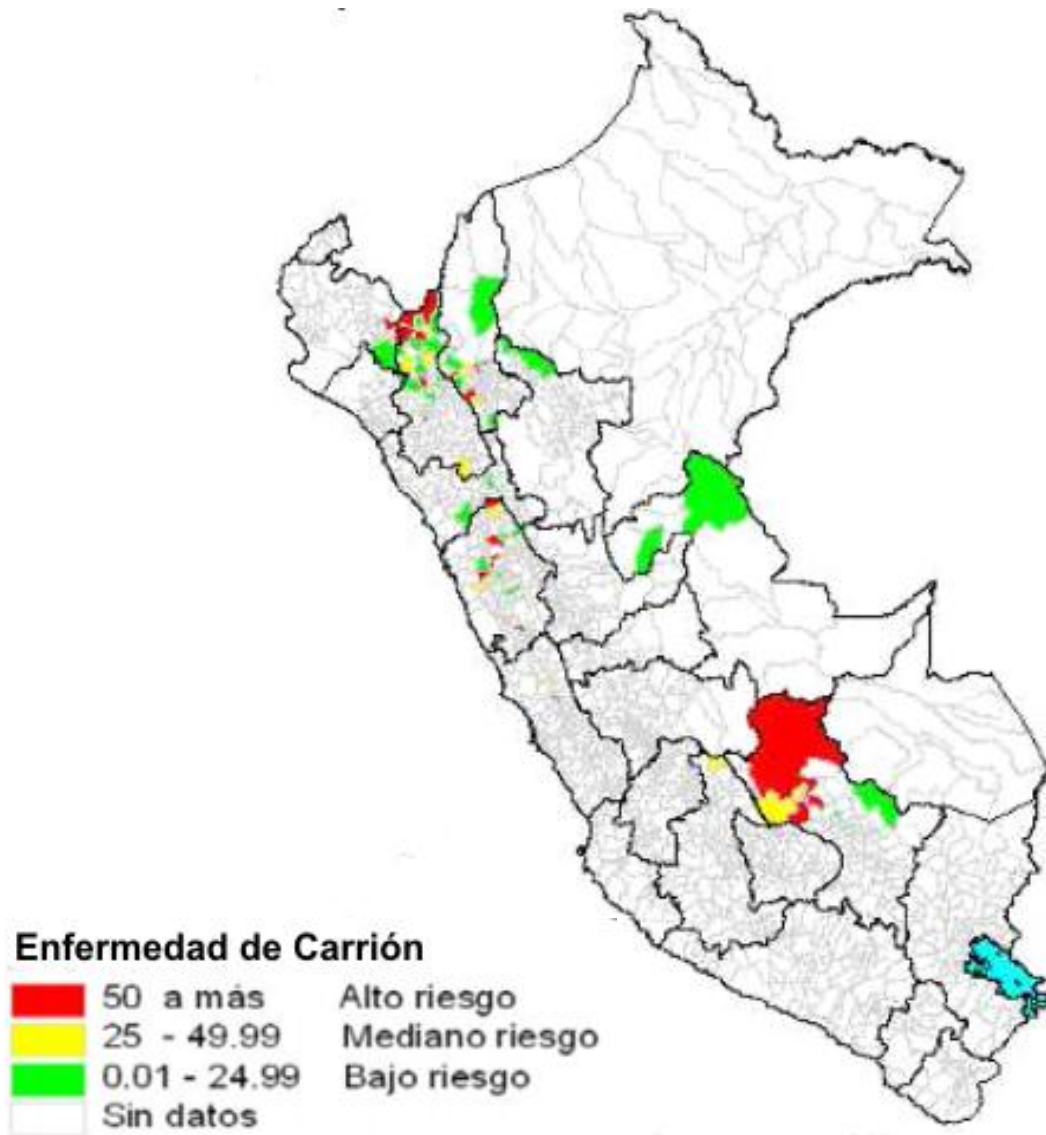


Figura 1. Mapa de Incidencia de la Enfermedad de Carrion en el Perú. Fuente: DGE, 2009.

Entre 2001 y 2004 se ha verificado que la enfermedad se ha ido expandiendo o reactivando en diversas regiones del Perú como Piura, Huánuco, La Libertad, Cajamarca, Amazonas, Ayacucho y Puno. Según la Dirección General de Epidemiología del Perú en el periodo 2004-2006, se han notificado 26,189 casos de Bartonelosis procedentes de 16 departamentos, encontrándose que el 85.8% de los casos fueron reportados por los departamentos de Ancash, Cajamarca y La Libertad. (Maguiña *et al.*, 2008).

En el 2007 se ha reportado 1,365 casos confirmados, en el 2008 se ha reportado 310 casos y en el 2009 se ha reportado 225 casos en la semana epidemiológica 30 (DGE, 2009).

2.2.2.1 Vectores artrópodos y transmisión

El vector implicado en la transmisión de *Bartonella bacilliformis* es la hembra del mosquito del género *Lutzomyia spp.*, siendo el principal vector en el Perú la especie *Lutzomyia verrucarum*, que habita entre los 5° y 13°13' de latitud sur. Las hembras son las únicas que pican a los vertebrados (principalmente son antropofílicas) para alimentarse de sangre, observándose que su actividad es principalmente crepuscular y nocturna; sin embargo, si se ingresa a la zona en donde reposan, puede presentar actividad en cualquier horario. Se ha encontrado que los casos ocurren en las viviendas agrupadas que se encuentran en zonas rurales y alejadas de los ríos, siendo la transmisión principalmente intradomiciliaria (Maguiña *et al.*, 2008). El vector tiene un patrón estacional, el cual obedece a las diferentes condiciones climáticas de las zonas; aumenta en número a partir del mes de marzo a junio, no se conoce el lugar de cría y presentan cuatro estadios larvales, la temperatura óptima fluctúa entre los 19°C – 23°C; el tiempo de vida del mosquito es en promedio de 50 a 60 días. Presumiblemente, el insecto *L. verrucarum* (Figura 2) conocido popularmente como “titira” o “manta blanca” se alimenta de sangre de un individuo infectado y disemina el patógeno por medio de su saliva durante la siguiente ingesta de sangre. No hay reportes del contagio de la bacteria entre humanos (González *et al.*, 2007).



Figura 2. *Lutzomyia verrucarum*: vector de *Bartonella bacilliformis*. Fuente: Zerpa *et al.*, 2006.

Lutzomyia verrucarum (especie propia del Perú) tiene una amplia distribución en los valles occidentales y algunos valles interandinos y orientales, entre los 1,100 y 3,200 msnm. En el valle de Monzón no se ha capturado *L. verrucarum*, siendo *Lutzomyia*

serrana la que representa el mayor porcentaje de las capturas en medios intraperidomiciliarios, por lo que esta especie se convierte en el probable vector de la enfermedad en la zona de estudio. A diferencia de los valles occidentales e interandinos endémicos de verruga peruana, donde la fauna flebotomina se reduce a unas pocas especies, el valle del Monzón presenta una alta diversidad de especies de *Lutzomyia*, similar a lo observado en otras áreas endémicas de selva alta (Tejada *et al.*, 2003). Se han identificado hasta 11 especies en las provincias de Jaén, San Ignacio y Utcubamba, Norte del Perú, de *Lutzomyia*, y establecen el posible rol de *Lutzomyia maranonensis* y *Lutzomyia robusta* como vectores de bartonelosis en estas zonas (Cáceres *et al.*, 1995; Cáceres *et al.*, 1997).

Lutzomyia peruensis, uno de los mosquitos implicados en la transmisión de la Leishmaniasis cutánea, fue el vector implicado en la epidemia ocurrida en el departamento del Cuzco en el año 1998 (Maguiña *et al.*, 2008). *L. peruensis* es un mosquito *Psychodidae* que ha sido incriminado en la transmisión de Leishmaniasis, siendo la única especie de *Lutzomyia* que se encuentra en el Valle Sagrado de los Incas (Valle del Río Urubamba-Cusco), en la misma área geográfica donde ocurren casos de Enfermedad de Carrión. Como se sabe, los únicos vectores de la Enfermedad de Carrión son los mosquitos del género *Lutzomyia* y la única especie de *Lutzomyia* encontrada en las localidades estudiadas del Valle del Urubamba es *L. peruensis* que es muy antropofílico. Hasta este momento, sólo se tenía referencia de Fairchild quien encontró al mosquito *Lutzomyia verrucarum* infectado con *B. bacilliformis* siendo los límites de la frecuencia de infección entre 0.4 – 3.0%, similar al valor de 0.96% encontrado para *L. peruensis* (Villaseca *et al.*, 1999).

B. bacilliformis se multiplica rápidamente en reservorios humanos durante la fase aguda de la enfermedad y permanece durante periodos prolongados en las personas convalecientes. No se ha demostrado la existencia de reservorios silvestres, siendo el hombre enfermo y no tratado el único reservorio conocido (González *et al.*, 2007).

2.2.3 Manifestaciones clínicas

El vector *L. verrucarum* introduce al huésped la bacteria *Bartonella bacilliformis*; estos microorganismos se localizan principalmente en los endotelios capilares y linfáticos (“células de Strong”) y luego penetran activamente a los glóbulos

rojos, residiendo dentro de ellos (endoglobulares); ello estimula el sistema retículo endotelial, haciendo que los linfocitos y macrófagos produzcan una intensa eritrofagocitosis del complejo hematíe-bartonella, lo cual puede llevar a una severa anemia de tipo hemolítico y extravascular (González *et al.*, 2007).

Estudios recientes han demostrado que los pacientes pediátricos y adultos jóvenes son los más afectados; en relación al sexo predomina el masculino en ambas fases; respecto al tiempo de enfermedad, la mayoría de los pacientes en fase aguda presentan un menor tiempo de enfermedad y un mayor tiempo los pacientes de fase eruptiva. El período de incubación clásicamente han sido considerados 21 días, pero tendría una media de 2 meses (González *et al.*, 2007). El espectro clínico de la infección por *Bartonella bacilliformis* varía desde una infección subclínica hasta una enfermedad aguda febril leve a una forma febril severa de gran palidez que puede ser fulminante (Maguiña *et al.*, 2008). Una vez que un paciente susceptible es picado por el insecto transmisor, este puede cursar sin síntomas o desarrollar diferentes y variados síndromes clínicos. Clásicamente se han descrito tres periodos: la fase aguda anemizante, le sigue el período denominado intercalar, usualmente asintomático y de duración variable, y luego de meses a años, la fase eruptiva o crónica más conocida como verruga peruana (González *et al.*, 2007). La enfermedad clásicamente tiene dos fases bien definidas:

A) FASE AGUDA

La fase aguda hemática o Fiebre de la Oroya es de inicio brusco o insidioso, dura aproximadamente cuatro semanas. Los síntomas de la fase aguda son diversos, destacando los de un proceso infeccioso general, tales como fiebre, malestar general, palidez, hiporexia; desarrollando anemia severa, hepatomegalia, ictericia, linfadenomegalia; en ocasiones. Además, pueden presentar derrame pericárdico, anasarca, convulsiones. La disminución transitoria de la inmunidad celular durante la fase aguda explica la presencia de algunas infecciones oportunistas, como son la reactivación de la toxoplasmosis. Las complicaciones mas frecuentes son las producidas por los microorganismos oportunistas (parasitarias, bacterianas y micóticas), tales como Salmonellas tíficas y no tíficas, *Plasmodium vivax*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carini*, *Toxoplasma*, *Histoplasma*, etc (González *et al.*, 2007).

La fase aguda hemática dura entre 2 a 4 semanas y la gran mayoría de los que reciben tratamiento se recuperan, algunos fallecen y menos del 5% desarrollan luego de varias semanas o meses lesiones eruptivas sangrantes que constituyen la fase eruptiva; sin embargo, últimamente se ha reportado recidivas de la fase aguda hemática. La fase aguda puede tener una letalidad que puede llegar al 90% cuando no es tratada, cuando el tratamiento es precoz y oportuno la mortalidad disminuye a 9%. Dentro de las complicaciones más importantes en la fase aguda encontramos las cardiovasculares con una alta morbilidad y mortalidad, destacando dentro de ellas la insuficiencia cardiaca en 51.9%, pericarditis efusiva en 38.9%, edema pulmonar agudo en 29.6%, shock cardiovascular en 11.1% y taponamiento cardiaco en 9.3%. Se ha encontrado que las complicaciones neurológicas, pueden ser marcadores de letalidad (Maguiña *et al.*, 2008).

B) FASE ERUPTIVA

La fase crónica eruptiva conocida como verruga peruana es muy frecuente a nivel pediátrico; muchos niños preescolares y escolares de las zonas endémicas presentan en cara, extremidades superiores e inferiores diversas formas de verrugas: miliar (pequeñas), mular (grandes) y nodular (subdérmicas); éstas muchas veces curan solas en 3 a 6 meses; ocasionalmente se ha detectado en algunos pacientes (13%) con verruga peruana, presencia de Bartonelas en sangre sin cuadro anémico severo. Los signos y síntomas que destacan son: sangrado de las verrugas, palidez leve, fiebre, malestar, prurito, dolor articular, linfadenomegalia. La letalidad es excepcional en esta fase. Las lesiones eruptivas se confunden con tumores cutáneos, tales como: granuloma piogénico, angiomas bacilar, varicela, molusco contagioso, sarcoma de Kaposi, hemangioma, tumor de Spitz, fibrosarcoma, entre otros (González *et al.*, 2007).

La fase eruptiva conocida clásicamente como Verruga Peruana se presenta generalmente en las zonas endémicas afectando principalmente a los niños y adolescentes, sin que estos hayan tenido un cuadro clínico típico de la fase aguda hemática; las lesiones eruptivas habitualmente se localizan en los miembros superiores, inferiores y en la cara, duran sin tratamiento entre 3 a 6 meses y no dejan cicatriz alguna.

La evolución se caracteriza por una fase de reblandecimiento y una etapa final de reabsorción, (las verrugas superficiales se esfacelan sin dejar cicatriz), siendo la mortalidad en esta fase, excepcional. También hemos descrito lesiones a nivel de la mucosa oral, conjuntival y nasal; sin embargo, no hemos observado presencia de lesiones de verruga eruptiva a nivel visceral.

El diagnóstico diferencial de la Verruga Peruana debe incluir, hemangioma, granuloma piogénico, varicela, molusco contagioso, angiomatosis bacilar, sarcoma de Kaposi, sarcoma maligno, melanoma juvenil o tumor de Spitz, fibrosarcoma, lepra (forma histiodes), linfoma maligno, urticaria, prurigo nodular, psoriasis, liquen, entre otros (Maguiña *et al.*, 2008).

2.2.4 Diagnóstico

Uno de los aspectos más importantes en el diagnóstico de la enfermedad es el antecedente epidemiológico; si bien desde hace varias décadas se sabe que la mayoría de los pacientes que desarrollan la fase aguda son foráneos, en los últimos años cada vez más personas nativas presentan esta fase; esto es de particular importancia en los rebrotes de la enfermedad (González *et al.*, 2007). Además, se tiene en consideración, el cuadro clínico y el examen del frotis de sangre. Sin embargo el diagnóstico definitivo depende del crecimiento de colonias en cultivo, cuya duración es de 2 a 4 semanas, todo lo cual resulta laborioso y prolongado (Henríquez *et al.*, 2002).

En la fase aguda de la Enfermedad de Carrión el diagnóstico es básicamente a través del frotis sanguíneo, en el cual se observa un 100% de parasitismo de los glóbulos rojos, que muestran formas bacilares (jóvenes), cocoides (viejas) o cocobacilares (González *et al.*, 2007). El frotis se colorea mejor con las pruebas a base de los reactivos Giemsa - Wright. Hasta hace unos años se pensaba que esta técnica era 100% diagnóstica en todos los casos, pero nuevos estudios han revelado algunas limitaciones para el diagnóstico. Ellis *et al.* encontraron en Cuzco que la sensibilidad del frotis de 36% y la especificidad entre 91 a 96%; en la fase eruptiva la sensibilidad del frotis es aún menor, siendo inferior al 10%. Se han observado falsos positivos para *B. bacilliformis* en muestras de pacientes que fueron coloreadas con colorantes viejos que precipitaron o eran granulaciones tóxicas por la infección concurrente (como hematíes con cuerpos de Howell-Jolly) (Maguiña *et al.*, 2008).

El hemograma muestra leucocitosis con desviación izquierda, la gran mayoría desarrollan anemia severa (hematocrito < 20%) de carácter hemolítico. Como respuesta a la mayor destrucción hemática se da una hiperplasia del tejido eritropoyético de la médula ósea y eventualmente de otros órganos, como el bazo. El hemocultivo y el mielocultivo en medios especiales son útiles para confirmar el diagnóstico. El análisis de las pruebas hepáticas revela un compromiso importante en los pacientes en fase aguda; 60% de estos pacientes tienen valores aumentados de las bilirrubinas, con predominio de la bilirrubina directa (González *et al.*, 2007).

Se demuestra que la prueba de ELISA cuando se analiza toda la fracción de la bacteria tuvo alta positividad (95.2%), al igual que el Western Blot: el 100% de las muestras fueron positivas. Recientemente se han utilizado la técnica de PCR para detectar la bacteria, en especial cuando hay poco parasitismo en sangre. Últimos estudios de Western Blot realizados por Kosek *et al.* demuestran que esta prueba tuvo mayor positividad en los pacientes eruptivos que los agudos (González *et al.*, 2007).

En cuanto a otros métodos diagnósticos, la búsqueda de anticuerpos contra la *Bartonella* usando técnicas de ELISA e IFI encuentra positividad en más del 60% en pobladores nativos asintomáticos (Henríquez *et al.*, 2002). Knoblock *et al.* detectaron 24 proteínas antigénicas, para *B. bacilliformis* encontrándose 6 proteínas específicas para pruebas de inmunoblot e inmunoprecipitación, que emplea una proteína de 45 kDa para Elisa. A pesar de su alta sensibilidad y especificidad, es una prueba muy costosa lo que limita su uso en la práctica. Cuando los antígenos seleccionados fueron situados en el 17 y 18 kDa y empleando un Inmunoblot sonicado, se encontró que esta prueba tiene sensibilidad de 70% en casos en fase aguda y sensibilidad de 94% en los casos crónicos de la enfermedad. La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se ha utilizado por muchos años y proporciona un método relativamente simple para detectar anticuerpos para una variedad amplia de patógenos, ya que solamente se requiere una cantidad pequeña de antígeno para cada prueba. La prueba de IFI es un análisis económico para la detección de anticuerpos contra *B. Bacilliformis*. Tiene buenos resultados en pacientes en fase convaleciente en 93% y en casos agudos 82% de los pacientes con lámina periférica o cultivo confirmados. El valor predictivo de esta prueba es de 89% en áreas endémicas y de 45% en áreas donde se presentan brotes. De los métodos serológicos, el Western Blot tiene alta sensibilidad y especificidad en la fase verrucosa,

demostrado en tres áreas diferentes, Lima, Amazonas y Ancash lo que ha demostrado se puede aplicar a nivel comunitario e incluso es muy útil en el seguimiento posterior (Maguiña *et al.*, 2008).

Otra ayuda diagnóstica parte de la biología molecular, cuyos avances han permitido la detección más rápida y más eficiente de muchos agentes infecciosos a través de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) amplificando un fragmento de DNA específico y así, mínimas cantidades de DNA pueden ser amplificadas e identificadas, constituyéndose en una prueba diagnóstica sensible y rápida (Henríquez *et al.*, 2002). La amplificación mediante PCR de los genes de la enzima citrato sintasa y la fracción RNA ribosomal 16S, constituye una herramienta útil para el diagnóstico de bartonelosis. Con esta técnica pueden aislarse diferentes especies de *Bartonella* de distintos tejidos. En los pacientes con endocarditis, la PCR en tiempo real es más sensible y específica, y es muy útil cuando sólo se dispone del suero como elemento diagnóstico (Vega y Ariza, 2008).

La biopsia cutánea de la lesión sigue siendo el mejor método para confirmar la sospecha clínica, en la Verruga Peruana. La reacción histológica inicial se caracteriza por la proliferación de las células endoteliales, de los monocitos y macrófagos, el número de mitosis es variable, en algunos casos son numerosas y están asociados a atipias celulares y dan una imagen histológica parecida a una neoformación maligna; también se observa neoformación de vasos capilares, pero los linfocitos, mastocitos y las células plasmáticas se encuentran en muy escasa cantidad. La evolución se caracteriza por una fase de reblandecimiento y una etapa final de reabsorción. Las coloraciones de Warthin-Starry revelan la presencia de las bacterias, se ven dispersas y generalmente no tienden a formar acúmulos como las otras especies de *Bartonella* que causan la angiomatosis bacilar. En la microscopía electrónica, se observa la *B. bacilliformis* localizada inicialmente en el intersticio fibrilar de las verrugas y posteriormente es fagocitada y destruida por las células del verrucoma. También se usa la técnica de inmunohistoquímica específica para *B. bacilliformis* (Maguiña *et al.*, 2008).

2.2.5 Tratamiento

En la era pre-antibiótica, la letalidad era mayor a 90%; actualmente ésta es de 8.8%, pero sigue siendo un problema de salud pública (González *et al.*, 2007). El tratamiento de la bartonelosis depende de la situación clínica. Estudios *in vitro* han demostrado que la penicilina, amoxicilina, cefalosporinas, tetraciclina, flouroquinolonas, macrólidos, rifampicina y cloranfenicol tienen buenos niveles de inhibición mediante estudios de MIC; en cambio, vancomicina, los aminoglucosidos, clindamicina, imipenem requieren dosis más altas para inhibirla y por ello no son buenos medicamentos contra *B. bacilliformis* (Maguiña *et al.*, 2008).

Los fármacos recomendados incluyen antibióticos de acción bacteriostática, pero debido al ciclo biológico intra y extracelular de *Bartonella*, el tratamiento consiste en dos o más antimicrobianos. El tratamiento en la fase aguda es muy efectivo con antibióticos como cloranfenicol sólo o combinado con β -lactámicos (penicilina) o quinolonas (Vega y Ariza, 2008); y el uso de ciprofloxacina es de gran utilidad. Debido a la complicación común por *Salmonella*, que no es cubierta por muchos de los antiguos tratamientos, muchos de los expertos en el Perú usaban el cloranfenicol (CAF) como droga de elección en la fase aguda. La dosis del CAF es 50 mg/kg/día hasta descender la fiebre y luego disminuir la dosis a 25 mg/kg por día hasta un total de 10 días; sin embargo, hay reportes de persistencia de la bacteremia por *B. bacilliformis* luego del tratamiento con CAF, incrementando el riesgo de transmisión en zonas endémicas. En los últimos años se ha usado con gran éxito ciprofloxacina (vía endovenosa u oral), con pocas complicaciones y baja letalidad. La dosis empleada en adultos (mayores de 50 kilos) ha sido de 500 mg cada 12 horas vía oral por 14 días; en niños mayores de 14 años (y más de 45 kg) de 250 mg vía oral cada 12 horas por 14 días. En el caso de gestantes y niños menores de 14 años (o que pesen menos de 45 kg) se recomienda amoxicilina con ácido clavulánico.

Clásicamente, en la fase eruptiva se usó para el tratamiento la estreptomina, pero se ha demostrado que la rifampicina logra en un menor tiempo disminución y desaparición de las verrugas; también se ha utilizado azitromicina siendo efectiva y en los últimos años la ciprofloxacina se ha usado con éxito (González *et al.*, 2007; Vega and Ariza, 2008). En la fase eruptiva, la penicilina y el CAF no sirven como terapia; antes se había usado estreptomina vía intramuscular a dosis de 15 mg/kg/día por 10

días, pero su empleo creaba dificultades de asimilación del antibiótico por el paciente. Por lo tanto, se cambió a rifampicina (RD) a la dosis de 10 mg/kg/día por 14-21 días, vía oral. En la última Norma Técnica del Ministerio de Salud N° 048-MINSA/DGSP-V.01 (2006) (Tabla 2 y Tabla 3) para el manejo de Bartonelosis aguda no grave el tratamiento de primera línea es ciprofloxacina como monoterapia en jóvenes y adultos, en otros casos se utiliza amoxicilina más ácido clavulánico. Para la Bartonelosis aguda grave se utiliza como primera línea ciprofloxacina más ceftriaxona o ceftriaxona más cloranfenicol. Para la Bartonelosis crónica eruptiva, el tratamiento de primera línea en todos los casos es azitromicina (10 mg por Kg/día por 7 días) (Tarazona *et al.*, 2006). La mayoría de estos tratamientos se han definido basándose en opinión de expertos o estudios pequeños controlados, haciéndose necesaria la ejecución de ensayos clínicos randomizados controlados para la búsqueda de un mejor tratamiento para ambas fases (Maguiña *et al.*, 2008).

Tabla 2. Esquemas de tratamiento antimicrobiano de la Bartonelosis aguda no grave

Grupo	Primera línea		Segunda línea	
	Droga	Dosis	Droga	Dosis
Niños y adolescentes <14 años (<45kg).	Amoxicilina/ ácido clavulánico	40 mg/kg/día dividido cada 12 horas por 14 días, por VO (en base a amoxicilina).	Ciprofloxacino	10 mg/kg/día cada 12 horas por 14 días, VO.
			Cloranfenicol	50 mg/kg/día los 3 primeros días y luego 30 mg/kg/día hasta completar 14 días, VO.
			Cotrimoxazol	10 mg/kg/día fraccionado cada 12 horas por 14 días (en base al trimetoprim), VO.
Adolescentes mayores de 14 años (>45kg) y adultos.	Ciprofloxacino	500 mg cada 12 horas por 14 días, por VO.	Amoxicilina/ ácido clavulánico	1 g cada 12 horas por 14 días (en base amoxicilina), VO.
			Cotrimoxazol	800/ 160 mg cada 12 horas por 14 días, VO.
			Cloranfenicol	50 mg/kg/día los 3 primeros días, y luego 30 mg/kg/día hasta completar 14 días, VO.
Gestante	Amoxicilina/ ácido clavulánico	1 g cada 12 horas por 14 días, por VO (en base a amoxicilina).	Cloranfenicol	50 mg/kg/día los 3 primeros días, y luego 30 mg/kg/día hasta completar 14 días, VO.
			Cotrimoxazol	800/160 mg cada 12 horas por 14 días, VO.
			Amoxicilina	1 g cada 8 horas por 14 días, VO.

Fuente: Norma Técnica del Ministerio de Salud N° 048-MINSA/DGSP-V.01 (2006)

Tabla 3. Esquemas de tratamiento antimicrobiano de la Bartonelosis aguda grave

Grupo	Primera línea		Segunda línea	
	Combinación de drogas	Dosis	Combinación de drogas	Dosis
Niños y adolescentes <14 años (<45kg)	Ciprofloxacino más ceftriaxona	<i>Ciprofloxacino</i> : 10 - 15 mg/kg ^c / 12 h IV, completar tratamiento hasta 14 días VO, misma dosis cada 12 horas.	Ciprofloxacino más ceftazidime	<i>Ciprofloxacino</i> : dosis indicada en primera línea. <i>Ceftazidime</i> : 50 a 100 mg/kg/día dividido ^c / 8 h IV; por 7 a 10 días**.
		<i>Ceftriaxona</i> : 70 mg/ kg/ día; por vía IV, por 7 a 10 días*.	Ciprofloxacino más amikacina	<i>Ciprofloxacino</i> : dosis indicada en primera línea. <i>Amikacina</i> : 15 mg/kg/día, dividido en dos dosis por 7 a 10 días, IV o IM.
Adolescentes mayores de 14 años (>45kg) y Adultos	Ciprofloxacino más ceftriaxona	<i>Ciprofloxacino</i> : 400 mg ^c /12 h por 3 días, luego se reduce a 200 mg ^c /12 h IV. Completar tratamiento hasta 14 días por VO 500mg ^c /12.†	Ciprofloxacino más ceftazidime	<i>Ciprofloxacino</i> : dosis indicada en primera línea. <i>Ceftazidime</i> : 1 g ^c / 8 h IV; por 7 a 10 días.
		<i>Ceftriaxona</i> : 2 g diarios una dosis por 7 a 10 días, IV. ‡	Ciprofloxacino más amikacina	<i>Ciprofloxacino</i> : dosis indicada en primera línea. <i>Amikacina</i> : 15 mg/kg/día, dividido en dos dosis por 7 a 10 días, IV o IM.§
Gestante	Ceftriaxona más cloranfenicol	<i>Ceftriaxona</i> : 1 g ^c /12 h por 10 días, IV.	Ceftriaxona más amikacina	<i>Ceftriaxona</i> : dosis indicada en primera línea. <i>Amikacina</i> : 500 c /12 h IV o IM, por 7 a 10 días.
		<i>Cloranfenicol</i> : 1 g ^c /8 h por 5 días, luego 500 mg ^c /6 h por VO hasta 14 días. †	Ceftazidime más amikacina	<i>Ceftazidime</i> : 1 g ^c / 8 h IV; por 10 días. <i>Amikacina</i> : 500 c /12 h IV o IM, por 7 a 10 días.

* En presencia de complicaciones neurológicas administrar 100mg/Kg/día. ** En niños menores de dos meses de 30 a 60 mg/Kg/día dividido cada 12 horas. † El cambio a VO será de acuerdo a tolerancia oral y evolución clínica. ‡ En presencia de complicaciones neurológicas administrar 2 g^c / 12 h. § En ningún caso sobrepasar de 1,5 g diarios de amikacina.

Fuente: Norma Técnica del Ministerio de Salud N° 048-MINSA/DGSP-V.01 (2006)

2.2.6 Prevención y Control

Clásicamente, la principal y única medida de control del vector ha sido la fumigación con DDT, la cual produjo una disminución importante de los casos, pero últimamente la enfermedad se ha mantenido e incluso han existido rebrotes en algunas zonas endémicas, probablemente por resistencia al DDT (González *et al.*, 2007).

Aún no existe vacuna contra la enfermedad de Carrión. Sin embargo, en áreas endémicas de Sudamérica existen recomendaciones específicas y la infección está bajo control epidemiológico (Vega y Ariza, 2008).

2.3 Resistencia a antibióticos en *Bartonella* spp.

2.3.1 Bioquímica de la acción antimicrobiana

Las células bacterianas crecen y se dividen, replicándose repetidamente hasta alcanzar un gran número presente durante una infección. Los agentes antimicrobianos interfieren con procesos específicos que son esenciales para el crecimiento y división de la bacteria (Figura 3) (Baron, 1995).

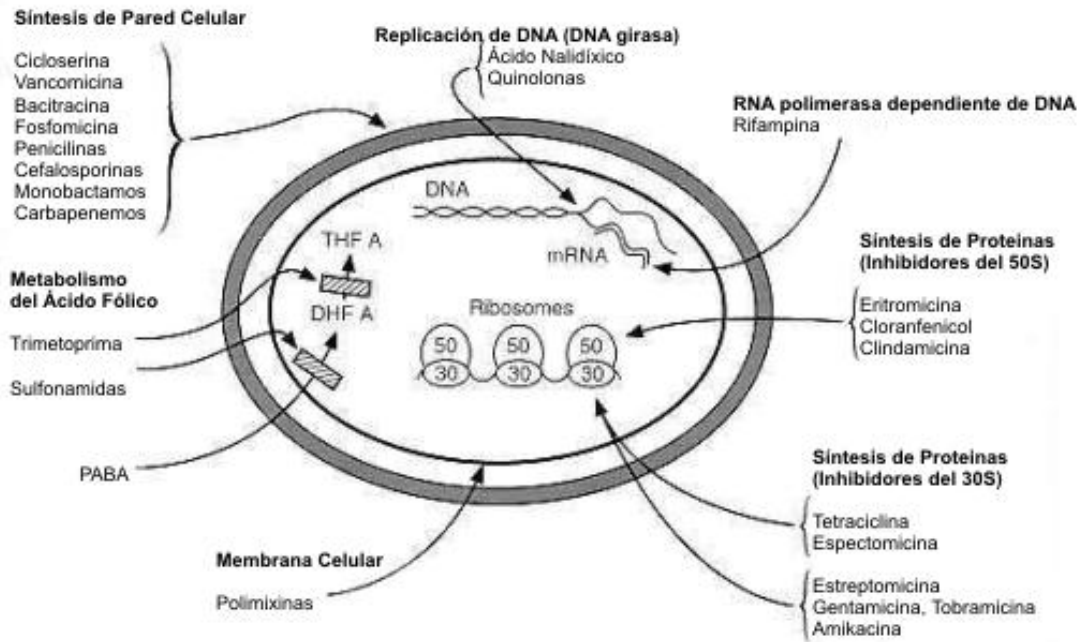


Figura 3. Sitio de acción de los agentes antimicrobianos. PABA, ácido paraminobenzoico; DHFA, ácido dihidrofólico; THFA, ácido tetrahidrofólico. Fuente: Baron, 1995.

Varios de los agentes antimicrobianos actúan interfiriendo: 1) la síntesis de la pared celular, 2) la integridad de membrana plasmática, 3) la síntesis de ácido nucleicos, 4) la función ribosomal y 5) la síntesis de folato. Las quinolonas se unen al complejo DNA y DNA girasa en las bacterias, bloqueando la replicación de DNA. La rifampicina bloquea la síntesis de RNA por unión a la RNA polimerasa. Los aminoglicósidos, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina y clindamicina interfieren la función del ribosoma. Sulfonamidas y trimetropin bloquean la síntesis del folato necesario para la replicación (Baron, 1995).

Los agentes antimicrobianos pueden ser bactericidas, que elimina al blanco, o bacteriostáticos, que inhiben el crecimiento. Los agentes bactericidas son más efectivos, pero los agentes bacteriostáticos pueden ser extremadamente beneficios porque ellos permiten la defensa normal del hospedero para la destrucción del microorganismo (Baron, 1995).

2.3.2 Mecanismos de resistencia a antibióticos

Antes de la era de los antibióticos, el único tratamiento disponible para la anemia aguda de la fiebre de la Oroya fue la transfusión sanguínea, pero la eficacia de este tratamiento fue pobre y la tasa de mortalidad alta (alrededor del 80% de los casos)

(Rolain *et al.*, 2004). Con la aparición de los antibióticos, se determinó que las bacterias del género *Bartonella* son generalmente susceptibles a muchos antibióticos cuando son cultivados *in vitro*, incluyendo penicilina, ampicilina, cefalosporina, aminoglicósidos, cloranfenicol, macrólidos (telitromicina y rifampicina) y fluoroquinolonas (Sobraques *et al.*, 1999; Rolain *et al.*, 2004; Meghari *et al.*, 2006; Mogollon-Pasapera *et al.*, 2009). Sin embargo, algunos de estos antibióticos podrían ser ineficaces *in vivo* por la falta de un efecto bactericida del antibiótico o por la localización intracelular de la bacteria. La emergente resistencia a varios antibióticos han sido reportados incluyendo macrólidos y quinolonas principalmente encontrada en *B. bacilliformis* (Mogollon-Pasapera *et al.*, 2009).

Las situaciones clínicas son tan diferentes que un simple tratamiento para todas las infecciones relacionadas con *Bartonella* ssp. no ha sido identificado, y el enfoque para el tratamiento debe ser adaptado para cada especie y situación clínica (Rolain *et al.*, 2004). La monoterapia en el tratamiento de la Enfermedad de Carrión tiene una alta probabilidad de fracaso, incluso los esquemas que usan dos antibióticos tienen cierta tasa de fracaso entre el 10 al 30% de resistencia clínica (Rolain *et al.*, 2004; Biswas *et al.*, 2007).

La penicilina G, cloranfenicol, tetraciclinas y eritromicina han sido usados para el tratamiento de la fiebre de la Oroya (Rolain *et al.*, 2004). Aunque se ha demostrado que la penicilina no es efectivo *in vivo* contra *B. henselae* (Mogollon-Pasapera *et al.*, 2009) mostrando un bajo MICs *in vitro* (Rolain *et al.*, 2004). El tratamiento usado para verruga peruana ha sido tradicionalmente la estreptomina. Desde 1975, la rifampicina empezó a ser la droga de elección de la fase eruptiva de la enfermedad de Carrión, siendo más efectiva que la estreptomina, no obstante las fallas del tratamiento con rifampicina han sido reportadas. La rápida resistencia a la rifampicina puede desarrollarse cuando es usada como monoterapia. También, la ciprofloxacina ha sido usado con éxito para el tratamiento en adultos con múltiples lesiones eruptivas (Rolain *et al.*, 2004). Actualmente, solo la estreptomina es considerada efectivamente consistente para el tratamiento de la verruga peruana (Rolain *et al.*, 2004).

El cloranfenicol es efectivo en muchos pero no en todos los pacientes con fiebre de la Oroya, pero las fallas terapéuticas y la persistencia de la bacteremia han sido

reportadas sin eliminar el riesgo del paciente de desarrollar la fase verrugosa de esta infección. Tratamientos simultáneos con otros antibióticos (especialmente beta lactamasas) son recomendados. Fluoroquinolonas (norfloxacina y ciprofloxacina), trimetropin-sulfametoaxole, macrólidos (roxitromicina) han sido usados exitosamente en algunos pacientes (Rolain *et al.*, 2004).

Las fluoroquinolonas han sido usadas exitosamente en los últimos 5 años en adultos y niños mayores de 6 años y representa una alternativa al cloranfenicol para el tratamiento para la fiebre de la Oroya. Aunque, las fluoroquinolonas deberían ser usados con precaución en niños (Rolain *et al.*, 2004).

Los mecanismos básicos por los que un microorganismo puede resistir un agente antimicrobiano son: (1) alterar el receptor o blanco de la droga (la molécula en la que ejerce su efecto) mediante modificaciones del receptor, (2) disminuir la cantidad de droga que llega a los receptores, alterando la entrada o aumentar la eliminación de la droga, (3) inactivar la droga, mediante su destrucción o modificación, y (4) el desarrollo de vías metabólicas de resistencia. Las bacterias pueden poseer uno o todos de estos mecanismos de manera simultánea (Baron, 1995). La resistencia a los antibióticos utilizados para el tratamiento de las distintas enfermedades causadas por especies del género *Bartonella* como se ha mencionado anteriormente, podría deberse a la baja cantidad de antibiótico que ingresa a la célula, a su capacidad de multiplicarse intracelularmente, lo cual permite su protección, o a mecanismos de resistencia propios de la bacteria.

A. Resistencia a Quinolonas y Fluoroquinolonas

Los antibióticos fluoroquinolonas inhiben las enzimas topoisomerasas, llamada DNA girasa (GyrA, topoisomerasa II) y la topoisomerasa IV (ParC) impidiendo la replicación del DNA. Estas enzimas son esenciales en la bacteria cuya función es alterar la estructura de la doble cadena de DNA dentro de la célula (Fluit *et al.*, 2001; Biswas *et al.*, 2007) manteniendo un óptimo estado de superenrollamiento del ADN en la célula durante la replicación del cromosoma circular en la bacteria. Esta enzima es una proteína tetramérica compuesta por dos subunidades A y dos subunidades B (Baron, 1995). Tanto, el ácido nalidíxico (quinolona) y la ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxitocina (fluoroquinolonas) interactúan con la DNA girasa (Figura 4) (Baron, 1995).

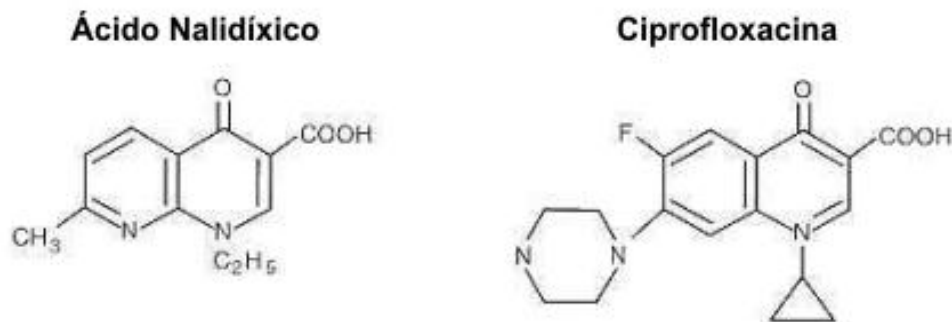


Figura 4. Estructura del ácido nalidíxico y ciprofloxacina. El ácido nalidíxico inhibe únicamente especies Gram negativas aeróbicas. En la ciprofloxacina, la fluorina provee actividad para Gram positivos, el grupo piperazina incrementa la actividad contra miembros de las enterobacteriaceae, y los grupos piperazina y cilopropil dan actividad contra especies de *Pseudomonas*. Fuente: Baron, 1995.

La resistencia a los antibióticos de fluoroquinolonas típicamente se relaciona con la mutación en los genes *gyrA* y *parC* que codifican la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) localizada cerca del N-terminal de la subunidad A de ambas enzimas (Biswas *et al.*, 2007; Angelakis *et al.*, 2009) lo cual favorece a que las fluoroquinolonas no interactúen con especificidad a estas enzimas. Aunque, la resistencia bacteriana a fluoroquinolonas puede ser esencialmente desarrollada a través de dos mecanismos: 1) disminución de la concentración de la droga intrabacterial (por ejemplo bombas de expulsión de droga) o 2) alteraciones en las enzimas blancos de la droga (Angelakis *et al.*, 2009).

La resistencia a las fluoroquinolonas está asociada con mutaciones en el gen *gyrA* y *parC*. Se ha reportado que las especies de *Bartonella* presentan una mutación natural en la posición 83 (numeración de *E. coli*). Sin embargo, factores adicionales como el decrecimiento de acumulación de la droga intracelularmente por bombas de expulsión o plásmidos resistentes a quinolonas pueden estar ocurriendo. Esta mutación natural en la posición 83 puede explicar la heretogenicidad de susceptibilidad a fluoroquinolonas reportados en otras bacterias intracelulares tales como *Tropheryma whipplei* y bacterias del género *Brucella* (Angelakis *et al.*, 2008). Se han reportado cepas de *Bartonella bacilliformis* resistentes a ciprofloxacina obtenidos *in vitro* después de 5 pasajes (el diámetro de inhibición disminuyó de 70 a menos de 6mm, MIC > 32 mg/L). Los aislados resistentes a ciprofloxacina contenían una transición en la posición 549 (numeración de *E. coli*) de C por T en el gen *gyrA*, prediciendo un cambio de aminoácido Asp87→Asn en la proteína GyrA. No se ha encontrado ningún cambio en

las secuencias nucleotídicas de los genes *gyrB* y *parC* en las cepas de *B. bacilliformis* resistentes a ciprofloxacina (Biswas *et al.*, 2007). En *E. coli*, una simple mutación en gen *gyrA* resulta en disminución de la susceptibilidad a fluoroquinolonas, y alto nivel de resistencia es asociado con una doble sustitución de aminoácidos en la proteína GyrA. Por otro lado factores adicionales, como mutaciones en el gen *parC* que codifica la subunidad C de la topoisomerasa IV y disminución de la acumulación de la droga intracelularmente por bombas de expulsión, juegan un rol complementario para incrementar los niveles de resistencia. Estudios *in vitro* en *E. coli* sugieren que un primer paso para seleccionar aislados con decrecimiento en la susceptibilidad para fluoroquinolonas es una alteración en Ser-83. Otras posiciones críticas en el QRDR han sido descritas en la posición 84 y 87 en *E. coli* (Biswas *et al.*, 2007; Angelakis *et al.*, 2009).

Los antibióticos fluoroquinolonas tienen una buena penetración de la membrana y concentración entre el citoplasma de la célula fagocítica, lo cual ha sido calculado usando diversos métodos indirectos contra *Rickettsia* ssp. y *Bartonella* ssp. Estos antibióticos también penetran las membranas eucarióticas y se concentra en el citoplasma fagocítico, tiene una alta concentración intracelular y entra a los macrófagos, leucocitos y neutrófilos (Ives *et al.*, 2001).

Aislados resistentes a fluoroquinolonas pueden ser fácilmente aisladas *in vitro* para *B. bacilliformis*, sin embargo fallas o rebrotes en el tratamiento sólo han sido observados al usar fluoroquinolonas en infecciones en *B. henselae* y *B. quintana*, sugiriéndose que estos antibióticos no deberían de usarse en tratamiento de infecciones como la enfermedad de Carrión (Angelakis *et al.*, 2009).

B. Resistencia a Rifampicina

La resistencia a la rifampicina está asociada exclusivamente con las mutaciones en el gen *rpoB* que codifica la subunidad β de la RNA polimerasa. En la gran mayoría de aislados resistentes a rifampicina, las mutaciones ocurren dentro de una región *hotspot* de 81 pb (región determinante de resistencia a rifampicina, RRDR) en el gen *rpoB* (3516 pb) (Biswas *et al.*, 2007).

Se han obtenido cepas de *B. bacilliformis* resistentes a rifampicina *in vitro* después de tres pasajes (el diámetro de inhibición disminuyó de 74 a 6 mm, MIC > 32 mg/L). Las secuencias analizadas de los aislados resistentes a rifampicina mostraron un cambio nucleotídico G → T en la posición 2868 (numeración de *E. coli*), lo cual originó una mutación en el codón 531 (Ser → Phe) en la región RRDR del gen *rpoB* (Biswas *et al.*, 2007).

C. Resistencia a Macrólidos

Los macrólidos tales como eritromicina inhiben la síntesis de proteínas por unión al dominio II y V del rRNA 23S. La acción inhibitoria de la eritromicina, y otros macrólidos, afecta el estado temprano de la síntesis de proteínas (Figura 5). La eritromicina inhibe el DNA y la síntesis proteica en células endoteliales bovinas. Interesantemente, la eritromicina juega claramente un efecto antiproliferativo, donde otros antibióticos no llegan (Meghari *et al.*, 2006). En ciertas especies bacterianas, la resistencia a macrólidos pueden deberse a mutaciones en regiones altamente conservadas de las proteínas ribosomales L4 y L22 (Biswas *et al.*, 2007).

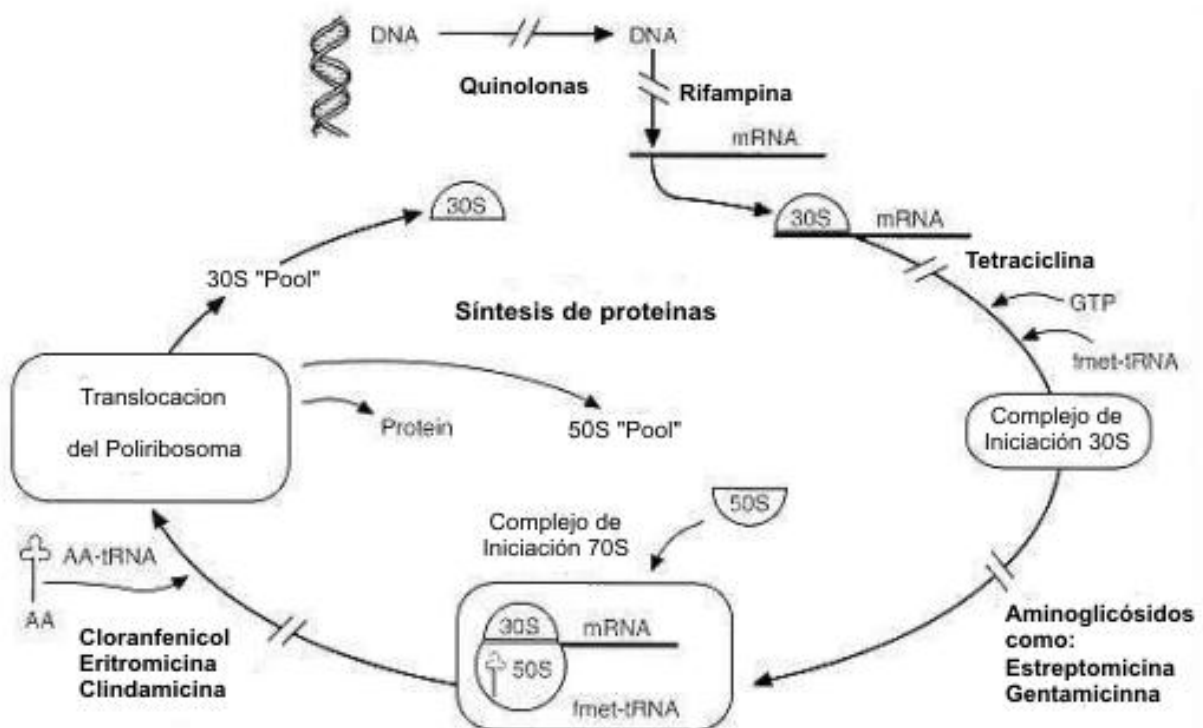


Figura 5. Diagrama de los sitios de inhibición de la biosíntesis de proteínas por varios antibióticos que se unen a la subunidad ribosomal 30S y 50S. Fuente: Baron, 1995.

Aislados resistente a eritromicina se obtuvieron *in vitro* después de 4 subcultivos (2 meses) de la cepa parental *B. bacilliformis*. El diámetro de inhibición decreció lentamente después de cada pasaje y después del cuarto pasaje la cepa fue completamente resistente a eritromicina (diámetro de inhibición bajo de 82 a < 6 mm, MIC >256 mg/L). Los aislados *B. bacilliformis* resistentes a eritromicina tienen una simple sustitución en la posición 2058 (A2058G, numeración de *E. coli*) en el gen rRNA 23S, no encontrándose sustitución, delección o inserción en los genes L4 y L22 donde se ha demostrado que la eritromicina también tiene su efecto. Esta mutación 2058 para ciertos macrólidos, confiere altos niveles de resistencia por afectar el modo de unión de la eritromicina. La transición de A2058G fue la primera mutación de rRNA que confiere resistencia a eritromicina y esta presente frecuentemente en aislados clínicos y también han sido reportada en otras bacterias como mutantes en *S. pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, varias *Mycobacterium spp.*, *Helicobacter pylori*, *Mycoplasma pneumoniae* y *B. henselae*. En *B. henselae* se encontró las mutaciones A2058G y A2059C en el dominio V del gen rRNA 23S (Biswas *et al.*, 2007). En *B. quintana*, la proteína L4 ribosomal también está asociada con la resistencia a macrólidos. Mutantes de *B. quintana* con resistencia a eritromicina obtenidas *in vitro* poseen una inserción de 27 pb en la región conservada de la proteína ribosomal L4 resultando en 9 aminoácidos repetidos (Meghari *et al.*, 2006).

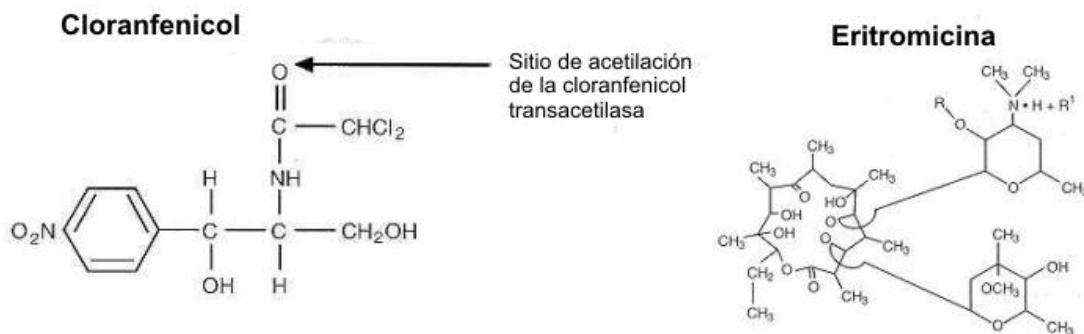


Figura 6. Estructura del cloranfenicol y de la eritromicina (prototipo o macrólido). Estos son inhibidores de la síntesis de proteínas mediante la unión a la subunidad ribosomal 50S. Fuente: Baron. 1995.

D. Resistencia a Cloranfenicol

La mayoría de bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo a algunas cepas de *H. influenzae* recientemente descubiertas, son resistentes a cloranfenicol porque ellos poseen la enzima cloranfenicol transacetilasa, la cual acetila grupos hidroxilo sobre la estructura del cloranfenicol. Esta enzima, similar a las enzimas

inactivantes de los aminoglicósidos y β -lactamasas, es intracelular y de más alto peso molecular y subunidad estructural (Figura 6 y 7). El cloranfenicol acetilado se une menos al ribosoma 50S (Baron, 1995). No se ha reportado resistencia en el género *Bartonella* para este antibiótico.

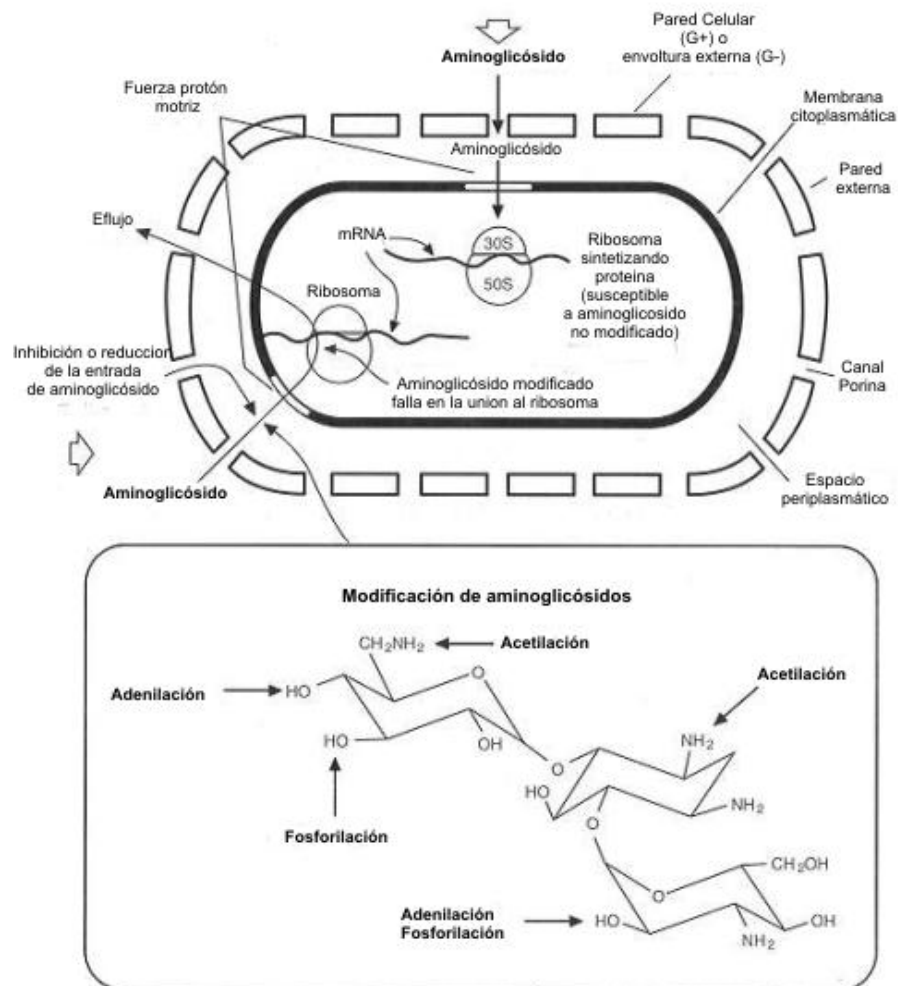


Figura 7. Diagrama de la transferencia o reducción de la transferencia de aminoglicósidos a través de la pared celular bacteriana. Si éste es modificado por acetilación o fosforilación, la droga no se unirá al ribosoma y permitirá la supervivencia de la bacteria. Fuente: Baron, 1995.

E. Resistencia a Tetraciclina

Básicamente, la resistencia a tetraciclina es debida a una disminución en los niveles de acumulación de la droga. En una fase inicial rápida independiente de energía, la tetraciclina se une a las capas de la superficie celular y pasa por difusión a través de capa externa de la célula. En la segunda fase, fase dependiente de energía, la tetraciclina cruza la membrana citoplasmática, probablemente por medio de una fuerza protón motriz (Baron, 1995).

Los compuestos de tetraciclina como la doxiciclina actúan por unión a la subunidad ribosomal 30S, resultando en la inhibición de la síntesis proteica. La resistencia a tetraciclina es causada frecuentemente por la adquisición de dos nuevos genes, los cuales codifican para una bomba de expulsión de tetraciclina dependiente de energía o una proteína que protege a los ribosomas bacterianos de las tetraciclinas (genes *tet* o *otr*). No se han encontrado aislados resistentes a la doxiciclina en *B. bacilliformis*, *B. henselae* y *B. quintana* (Biswas *et al.*, 2007).

F. Resistencia a Aminoglicósidos

Los aminoglicósidos tales como la gentamicina y estreptomycinina se unen a los ribosomas interfiriendo con la síntesis proteica. La forma más importante de resistencia a aminoglicósidos es la modificación del compuesto fuera de la célula y la resistencia es debida parcialmente a una pobre absorción del compuesto alterado. Además, todos los aminoglicósidos tienen grupos amino e hidroxilo libres que son esenciales para la unión a las proteínas ribosomales (Baron, 1995). La resistencia a estos antimicrobianos es ampliamente distribuida, varias enzimas que modifican aminoglicósidos y mutaciones en el gen rRNA 16S o el gen *rpsL* que codifica la proteína ribosomal S12 han sido reportadas. No existe reportes de aislados *in vitro* de *B. bacilliformis* resistentes a gentamicina después de 16 pasajes (Biswas *et al.*, 2007).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Toma de muestra y cepas usadas

Se realizaron dos muestreos para la recolección de cepas clínicas de *B. bacilliformis*, el primero en el Centro Poblado Menor de Calipuy del Departamento de La Libertad. (Mayo, 2008) y el segundo realizado en Uchumayo - Quillabamba y Urubamba del Departamento de Cusco en pacientes confirmados previamente por el INS durante los meses de agosto 2008 a marzo 2009 y con tratamiento en proceso y/o finalizado. En ambas zonas de muestreo se tomaron muestras sanguíneas de los pacientes (Puesto de Salud de Calipuy – Trujillo y Puesto de Salud Uchumayo-Cusco) en tubos con anticoagulante, y fueron transportados inmediatamente al laboratorio para su cultivo. Para el presente estudio se utilizaron las cepas de *B. bacilliformis* proporcionadas por el Instituto Pasteur (Francia) y mantenidas en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM (CIP57.17, CIP57.18 y CIP77.27) y las cepas obtenidas en los muestreos realizados (USM-LMM-001, USM-LMM-002, USM-LMM-003).

3.2 Estandarización del cultivo y condiciones de crecimiento de *Bartonella bacilliformis*

Se realizó la estandarización del crecimiento en placa utilizando las cepas CIP 57.18. Brevemente, el crecimiento de *B. bacilliformis* se realizó sobre placas con agar Columbia (Disco, Detroit Hich) suplementado al 4% de glóbulos rojos de carnero (GRC) y 2% de suero bovino fetal (FBS, “*fetal bovine serum*”) (Anexo A) e incubadas a 30°C (Minnick *et al.*, 2003), 5% de CO₂ a una humedad saturada de 95% por seis a ocho días. Luego, se resuspendió el cultivo bacteriano en solución salina fisiológica (pH=7), hasta alcanzar una concentración de 0.5 de la escala de Mac Farland (10⁸ UFC/ml). Posteriormente, se inoculó 200 µl de la suspensión realizada a cada placa y se diseminó completamente en el medio con un hisopo, incubándose en la condición indicada. Los materiales utilizados para la siembra son mostrados en el Anexo C.

3.3 Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de *B. bacilliformis*

La determinación de la susceptibilidad de las cepas de *B. bacilliformis* se realizó mediante ensayos de difusión en disco (Biswas *et al.*, 2007) con un inóculo de 200 µl de suspensión bacteriana para los siguientes antibióticos: ciprofloxacina (5 µg), rifampicina (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (15 µg), doxiciclina (30 µg), ácido nalidíxico

(30 µg), levofloxacin (5 µg) y cloranfenicol (30 µg). Solamente, se realizó la prueba de E-test para ciprofloxacina (Pendle *et al.*, 2006). Posteriormente, se utilizó un inhibidor de bombas de expulsión MC 207,110 (Phe-Arg-b-naftylamide) a una concentración de 20 mg/L para evaluar la participación de las bombas en la resistencia a fluoroquinolonas. El crecimiento bacteriano se evaluó diariamente hasta el sexto u octavo día, siendo el período determinado para el crecimiento óptimo de la bacteria en estas condiciones.

3.4 Extracción de DNA

Se utilizó el Miniprep de *Wizard Genomic Purification Kit*, (Promega) siguiendo las indicaciones del proveedor. Brevemente, se cosecharon las colonias de las cepas de *B. bacilliformis* a partir de las placas y se lavaron 3 veces con solución salina al 0.85% y centrifugaciones por 13000 x g por 1 min. Luego, se adicionó 600 µl de la solución de lisis y se incubó a 80°C por 5 min. Seguidamente, se adicionó 3 µl de RNasa (10 mg/ml) y se incubó a 37°C por 1 hora. Luego, se agregó solución de precipitación de proteínas incubándose por 5 min sobre hielo. Se centrifugó y al sobrenadante se le agregó 600 µl de isopropanol centrifugándose a 13000 x g por 2 min. Al sedimento obtenido se le adicionó 600 µl de etanol 70% y se centrifugó a 1300 x g por 2 min. Seguidamente, se secó el vial y se le adicionó 50 µl de la solución de rehidratación de DNA y se incubó por toda la noche. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para evidenciar la extracción de DNA (Anexo B).

3.5 Amplificación por PCR de los genes asociados a la resistencia

Los iniciadores se diseñaron según Biswas *et al.*, 2007 y Flores, 2008 (Tabla 4). Previamente, el tamaño de los amplificados se determinó mediante el programa bioinformático fastPCR (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcre.htm>). Brevemente, las secuencias de los genes asociados a la resistencia a antibióticos fueron obtenidos a partir del genoma secuenciado de *Bartonella bacilliformis* KC583 y se realizó un PCR *in silico* (Tabla 7). Para la estandarización de la PCR se escogió la cepa de *B. bacilliformis* CIP57.17. La amplificación se realizó utilizando DNA extraído de las cepas. Seguidamente, se procedió a amplificar por PCR el gen *ialB* de *B. bacilliformis* y los genes asociados a la resistencia. Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación por PCR de los genes en estudio en las cepas clínicas. Para la amplificación se utilizó el siguiente programa: 3 min a 95°C seguido por 30 ciclos por 30 s, 55°C y 42°C

(dependiendo del gen) por 30 s y 72°C por 2.5 min y finalmente a 72°C por 15 min. El protocolo de PCR para un volumen de 50 µl fue el siguiente: 1 µl de DNA molde o extracto celular, 1 µl de cada iniciador, 5 µl de Buffer 10X, 1 µl de dNTP (10 mM), 1,5 µl de MgCl₂, 0.25 µl de *Taq* DNA polimerasa (5 U/1 µl) y 39.25 µl de agua ultrapura. Se utilizó como marcador de peso molecular Mass Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas). La amplificación de los genes se evidenció mediante una electroforesis en agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X (40 mM de Tris-acetato, pH 8.0, 1 mM de EDTA) y tinción en bromuro de etidio por 4 min (0.5 µg/ml). Los amplificados para enviar a secuenciar se obtuvieron con la enzima Platinum *Taq*[®] polimerasa (Invitrogen).

Tabla 4. Iniciadores usados para amplificar los genes asociados a la resistencia a antibióticos utilizados en esta tesis

Iniciadores	Secuencia	Referencia	Gen	Resistencia
<i>gyrF</i>	AGTATTATTGATGAAATGCAAC	<i>Biswas et al., 2007</i>	<i>gyrA</i>	Ciprofloxacina
<i>gyrR</i>	AAAATCAGGACCAGGAATGATT	<i>Biswas et al., 2007</i>	<i>gyrA</i>	Ciprofloxacina
<i>BarpoBF</i>	GATGATATTGATAATCTTGCA	<i>Biswas et al., 2007</i>	<i>rpoB</i>	Rifampicina
<i>BarpoBR</i>	AACCATATTTATTAACACGCGC	<i>Biswas et al., 2007</i>	<i>rpoB</i>	Rifampicina
<i>FparC</i>	TCTTATGCTAAGTGTGCACGGA	<i>Flores, 2008</i>	<i>parC</i>	Ácido nalidíxico
<i>RparC</i>	TACCAACAGCAATCCCTGAAGAA	<i>Flores, 2008</i>	<i>parC</i>	Ácido nalidíxico
<i>Ba16SF1</i>	TTCAATATGAGAGTTTGA	<i>Biswas et al., 2007</i>	<i>rRNA 16S</i>	Gentamicina
<i>Ba16SR1</i>	ACGGCTAACATTCATCGT	<i>Biswas et al., 2007</i>	<i>rRNA 16S</i>	Gentamicina
<i>Ba16SF2</i>	GAATCCGAGGTGTAGAGG	<i>Biswas et al., 2007</i>	<i>rRNA 16S</i>	Gentamicina
<i>Ba16SR2</i>	AGAAAGGAGGTGATCCAG	<i>Biswas et al., 2007</i>	<i>rRNA 16S</i>	Gentamicina
<i>BQL4F</i>	ATGGATCTTGTAATTAGAAC	<i>Meghari et al., 2006</i>	<i>L4 ribosomal</i>	Eritromicina
<i>BQL4R</i>	TCATTTAAAACGTCCTCAA	<i>Meghari et al., 2006</i>	<i>L4 ribosomal</i>	Eritromicina

3.6 Secuenciamiento de los genes relacionados a la resistencia a antibióticos

Los genes amplificados por PCR fueron secuenciados por la empresa MacroGen USA (<http://www.macrogen.usa.com>) que utiliza las condiciones de *bioDye*TM terminator cycling. Brevemente, se envió los amplificados de los genes (30-40 ng/µl) y los iniciadores de amplificación para cada gen (10 µmol/µl), detallando sus respectivas *T_m* (Temperatura de hibridación). Ambas secuencias de cada gen fueron empalmadas utilizando el programa CAP3 (Sequence Assembly Program) y SeqAssem (Happerle, 2004).

3.7 Análisis bioinformático de secuencia

Las secuencias nucleotídicas de los genes candidatos se compararon usando el programa BioEdit (Hall, 1999), CLUSTALW ([http:// www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)) y BOXSHADE (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) para analizar las posibles mutaciones en la secuencias y determinar qué nucleótidos podrían estar asociado con la resistencia a los respectivos antibióticos. Además, se evaluaron si las mutaciones encontradas en las secuencias que codifican proteínas producen un cambio de aminoácido en la proteína. Previamente, se obtuvo la secuencia nucleotídica de los genes asociados a la resistencia del genoma secuenciado de *B. bacilliformis* KC583 (N° de accesoión CP000524) y la de *Escherichia coli* K12 depositado en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) que se utilizaron para compararlo con las cepas clínicas de *B. bacilliformis* de este trabajo. Además, se realizó el modelamiento estructural de la GyrA de *B. bacilliformis* utilizando el programa GENO3D (<http://geno3d-pbil.ibcp.fr>) y el alineamiento estructural con la GyrA de *E. coli* (PDB: 1AB4) se realizó el programa UCSF Chimera v1.3 (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/index.html>).

IV. RESULTADOS

4.1. Cepas clínicas de *B. bacilliformis*

Se realizaron dos muestreos (Tabla 5, Figura 8). En el primer muestreo realizado en Calipuy (Trujillo) se recolectaron cuatro muestras positivas presuntivas de Bartonelosis por coloración Giemsa (mayo 2008) y en el segundo muestreo realizado en Uchumayo-Quillabamba y Urubamba (Cusco) se recolectaron catorce muestras clínicas de pacientes diagnosticados positivos a hemocultivos (nueve muestras de Uchumayo y cinco de Urubamba) confirmados previamente por el INS durante los meses de agosto (2008) - marzo (2009) y con tratamiento en proceso o finalizado, dicho muestreo se realizó con el objetivo de evaluar si los pacientes tratados no tuvieran la bacteria en la sangre y presentarse como asintomático. De las 5 muestras de Trujillo sólo una muestra dio coloración y hemocultivo positivo. De las nueve muestras de Uchumayo, sólo una muestra resultó hemocultivo positivo en el noveno día de incubación (Figura 9). De las cinco muestras de Urubamba, una muestra resultó hemocultivo positivo en el cuarto día de incubación. Se realizó coloración Giemsa previamente a todas las muestras resultando negativo para todos, a excepción de una muestra de Urubamba y una muestra de Callipuy. La coloración Giemsa positivo fue visualizada y fotografiada en un microscopio a 100X (Figura 10), donde se observó bacilos curvos (color azul) dentro de eritrocitos (color rojo) y fue sembrada para las posteriores pruebas de resistencia antimicrobiana.

Tabla 5. Número de muestras de sangre de pacientes con Enfermedad de Carrión por zona de muestreo.

Lugar de Muestreo	Número de muestras	Coloración Giemsa positiva	Hemocultivo positivo	Sexo del paciente hemocultivo (+)	Síntomas	Información adicional
Calipuy-La Libertad	4	1	1 (US M-LMM-01)	F (adulto)	palidez	No tratada, frotis (+)
Uchumayo-Quillabamba (Cusco)	9	Ninguno	1 (US M-LMM-02)	M (adulto)	Dolor de cadera	Tratada con ciprofloxacina monoterapia, frotis (-)
Urubamba (Cusco)	5	1	1 (US M-LMM-03)	M (niño)	Palidez, anemia, malestar general	En tratamiento, frotis (+)

M: Masculino

F: Femenino



A) Lugar de muestreo. Caserío Calipuy (Santiago de Chuco - La Libertad)



B) Lugar de muestreo: Urubamba - Cusco, niños afectados.



C-1) Lugar de muestreo. Quillabamba - Uchumayu. Abundante vegetación de frutales y cafeto.



C-2) Lugar de muestreo. Puesto de salud Uchumayu a una hora de la ciudad de Quillabamba.

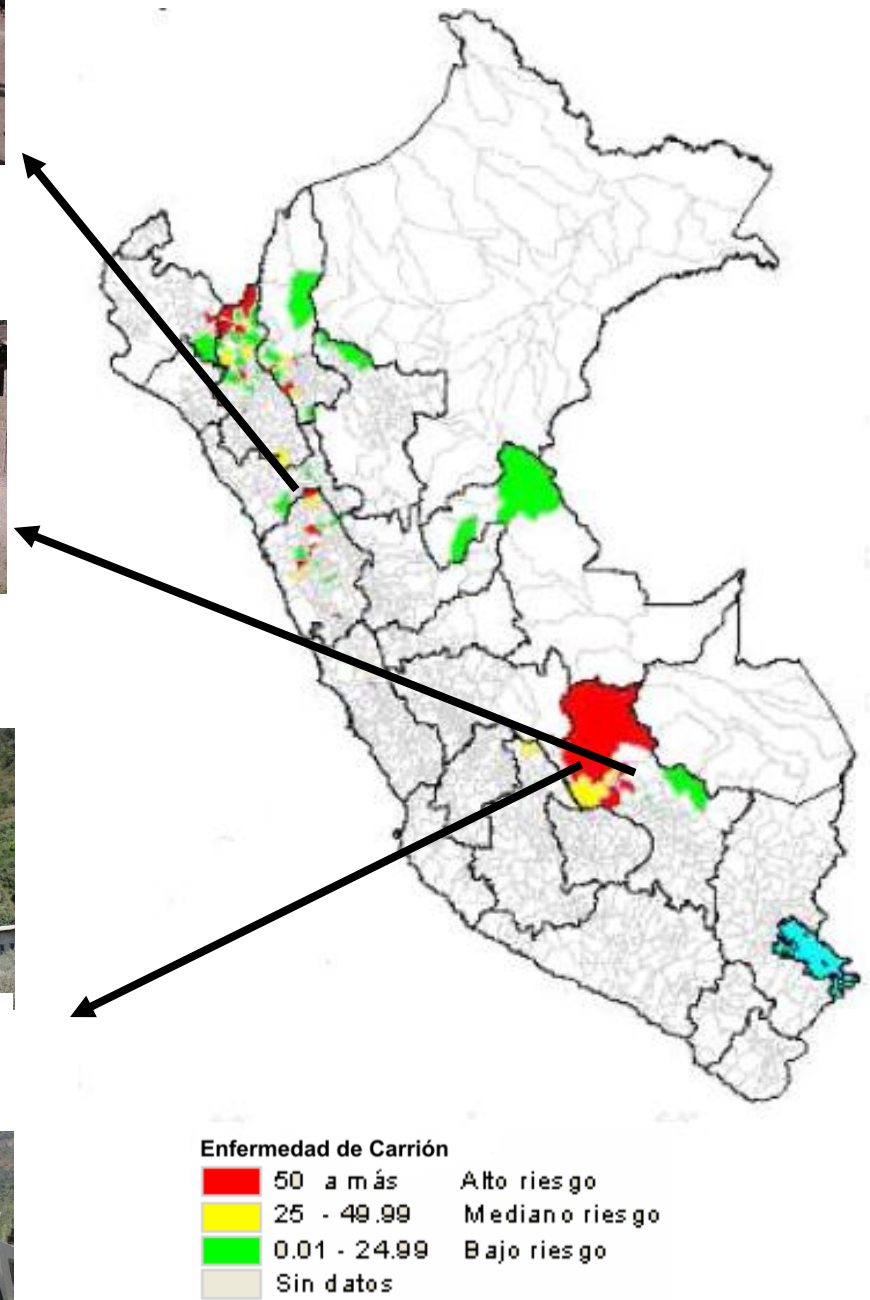


Figura 8. Mapa de incidencia de Bartonellosis (2009) y zonas de muestreo. A: Calipuy (Trujillo), B: Urubamaba (Cusco), C-1: Uchumayo-Quillabamba (Cusco). C-2: Quillabamba (Cusco).



Figura 9. Hemocultivo positivo del cual se aisló la cepa USM-LMM-002 de *B. bacilliformis* de un paciente de Uchumayo – Cusco. Se observan colonias pequeñas, transparentes y puntiformes, en el noveno día de incubación.

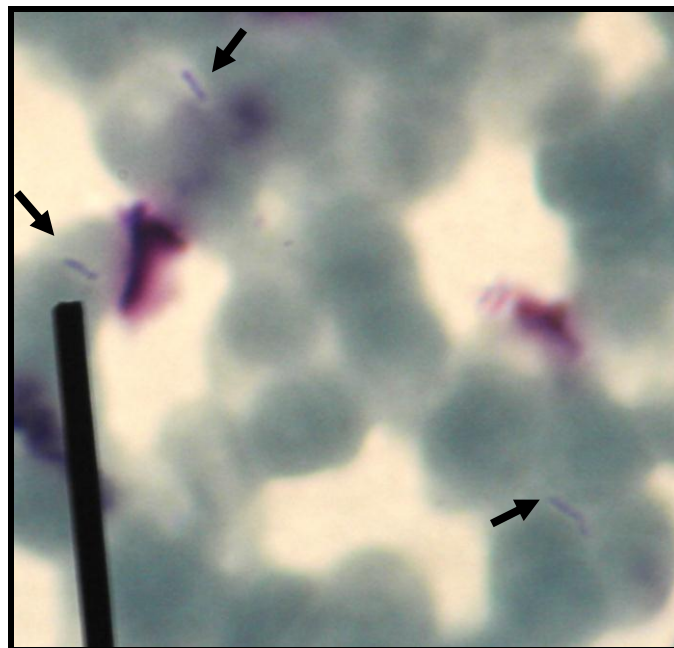


Figura 10. Coloración Giemsa de una muestra de sangre de un paciente de Calipuy – La Libertad del cual se aisló la cepa de *B. bacilliformis* USM-LMM-001. Se observa bacilos curvos de color azulado. Aumento 100X.

4.2. Cultivo de *Bartonella bacilliformis* en placa

La estandarización del cultivo en placa fue necesaria debido a que los trabajos científicos en *Bartonella bacilliformis* difieren unos de otro en relación a las condiciones de cultivo y a los días de incubación. Es por ello, que se utilizó la cepa CIP 57.18 para la estandarización logrando obtener el crecimiento óptimo de la bacteria al

sexto día de la siembra. Los resultados obtenidos fueron crecimientos uniformes en la placa como se muestra en la Figura 11.

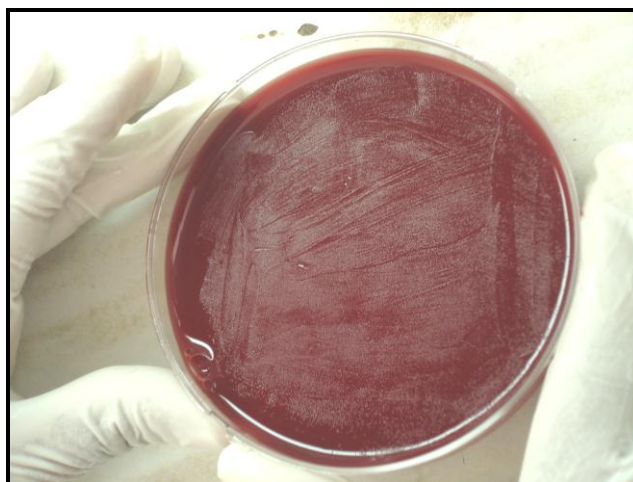


Figura 11. Crecimiento de *B. bacilliformis* CIP 57.18 en placa a 30°C con 5% de CO₂ por un período de 6 a 8 días.

4.3. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de *B. bacilliformis*

Se evaluó la susceptibilidad de todas las cepas de *B. bacilliformis* a partir de un inóculo de 200 µl de suspensión bacteriana y enfrentado a los discos de antibiótico. El crecimiento bacteriano fue evaluado diariamente hasta el sexto día de incubación (Tabla 6, Figura 12, 13, 14 y 15).

Tabla 6. Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *B. bacilliformis* a ciprofloxacina (CIP), gentamicina (CN) rifampicina (RD), doxiciclina (DO), eritromicina (E), ácido nalidíxico (AN)

Cepas	Etest	Antibiogramas (mm)								
	CIP (mg/L)	CIP (5µ)	AN (30µ)	LVX (5µ)	CN (10µ)	RD (5µ)	DO (30µ)	E(15µ)	C (30µ)	Control
CIP57.18	0,015	55	0	ND	40	80	90	80	70	(+)
CIP57.27	0,015	50	0	ND	ND	ND	SC	SC	SC	(+)
USM-LMM-001	0,125	50	0	ND	40	86	SC	SC	SC	(+)
CIP57.17	0,125	46	0	38	60	54	110	SC	SC	(+)
USM-LMM-002	2	19	0	37	40	80	104	100	110	(+)
USM-LMM-003	0,125	50	0	43	50	SC	SC	SC	SC	(+)

SC: Sin crecimiento evidente

ND: No determinado

CIP: Cepas obtenidas del Instituto Pasteur, Francia.

USM-LMM: Cepas obtenidas de muestreos en Cusco y La Libertad en la presente tesis.

Todas las cepas analizadas mostraron resistencia a ácido nalidíxico (Figura 12), pero susceptibilidad a ciprofloxacina (Figura 13 y Figura 14), a excepción de la cepa USM-LMM-002 que mostró susceptibilidad disminuida a ciprofloxacina (Figura 15E). Todas las cepas de *B. bacilliformis* son susceptibles a los demás antibióticos. No se observaron

cambios para ácido nalidíxico en presencia o ausencia de un inhibidor de bombas de expulsión para quinolonas (Figura 12).

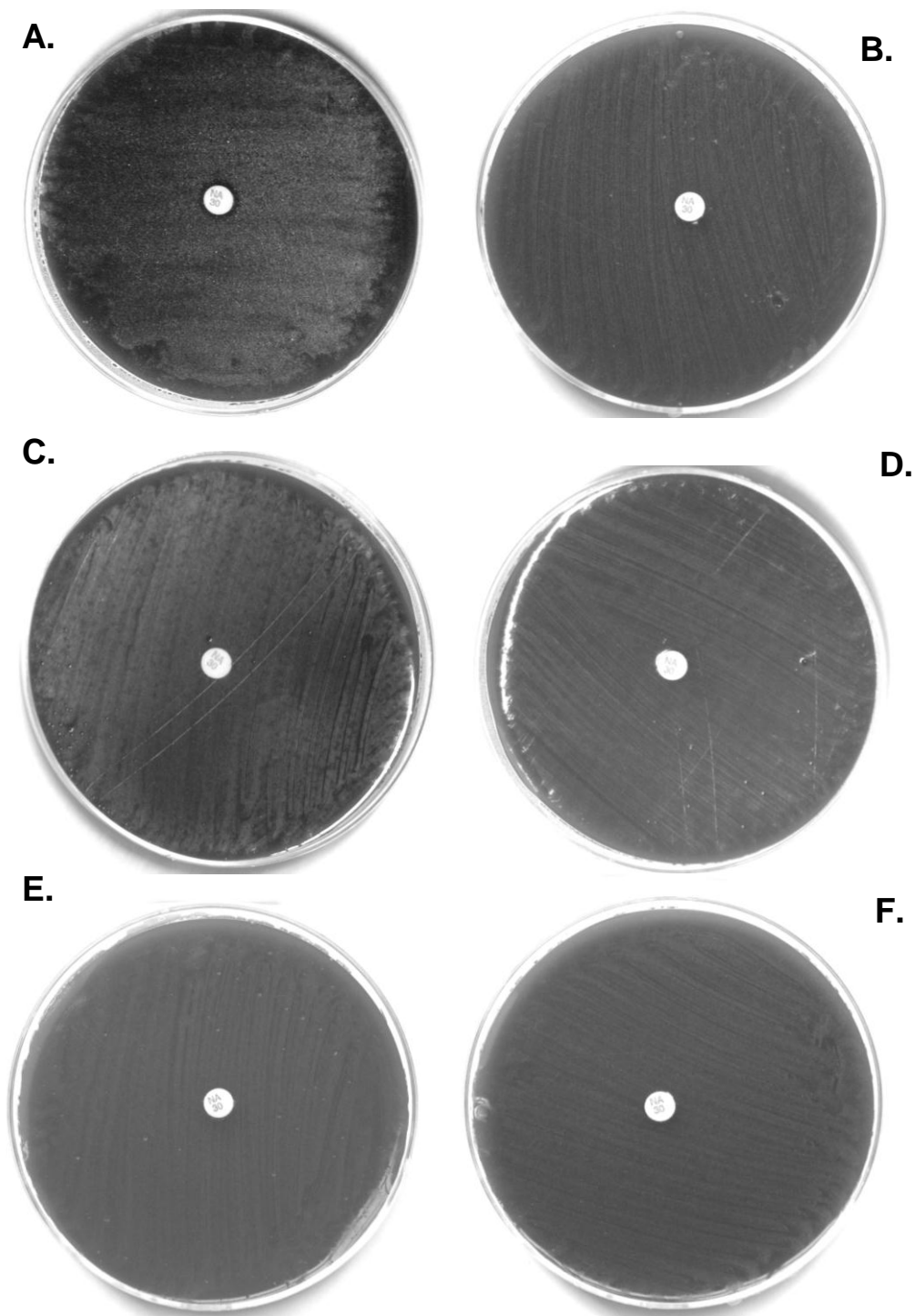


Figura 12. Resistencia al ácido nalidíxico (30 μ g) en presencia y ausencia de 20 mg/L de inhibidor de bombas de expulsión (Phe-Arg- β -naphthylamide) en 3 cepas de *B. bacilliformis*: *CIP 57.17*, (A) AN y (B) AN + I; *USM-LMM-003*, (C) AN y (D) AN + I; *USM-LMM-002*, (E) AN y (F) AN + I. (AN, ácido nalidíxico; I, Phe-Arg- β -naphthylamide).

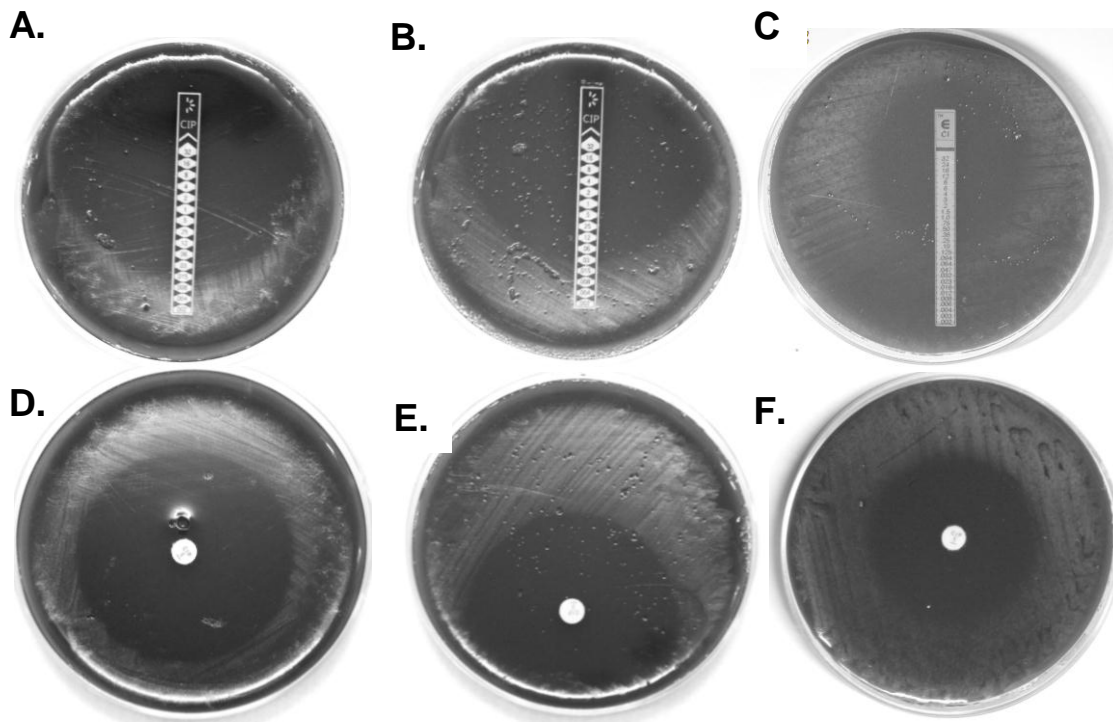


Figura 13. Susceptibilidad antimicrobiana de la cepa *Bartonella bacilliformis*: **CIP 57.18.** (A) Etest CIP (0.015 mg/L) y (D) Susceptibilidad a CIP diámetro del halo de 55 mm; **CIP 77.27.** (B) Etest CIP (0.015 mg/L) y (E) Susceptibilidad a CIP diámetro del halo de 50 mm; **CIP 57.17.** (C) Etest CIP (0.125 mg/L) y (F) Susceptibilidad a CIP diámetro de halo de 46 mm. (CIP, ciprofloxacina).

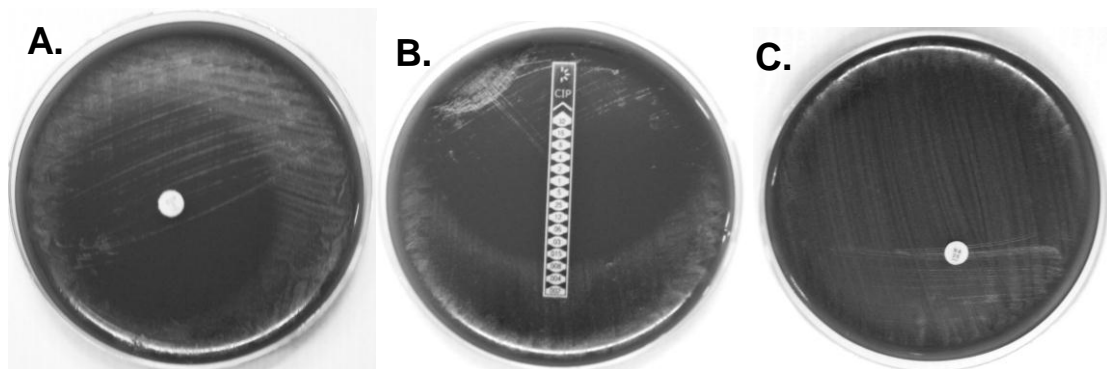


Figura 14. Susceptibilidad antimicrobiana de la cepa *Bartonella bacilliformis* **USM-LMM-001:** A. susceptibilidad a CIP diámetro del halo 50 mm, B. Etest CIP (0.125 mg/L), C. Resistencia a AN, ausencia de halo. (AN, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina).

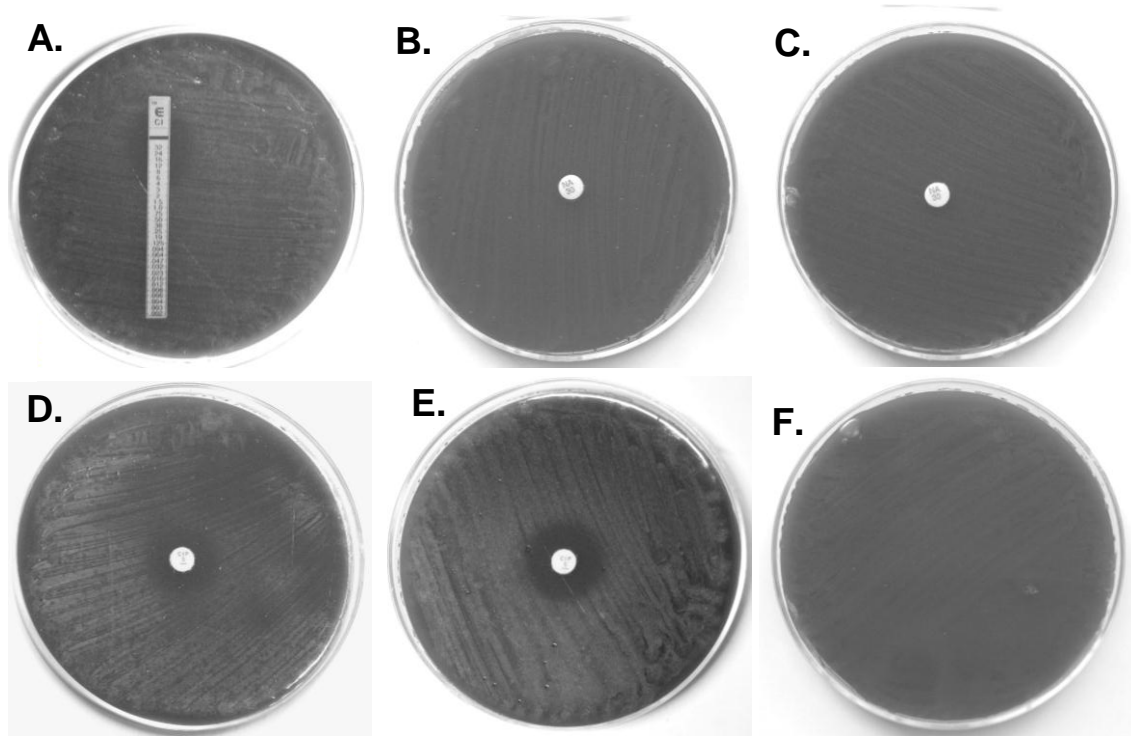


Figura 15. Susceptibilidad antimicrobiana de la cepa *Bartonella bacilliformis* USM-LMM-002: A. Etest CIP (2 mg/L), B. Resistencia AN, C. Resistencia AN + I, D. Susceptibilidad disminuida halo de 19 mm a CIP, Susceptibilidad disminuida, halo de 19 mm a CIP + I, F. Control positivo al cultivo. (AN, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; I, Phe-Arg- β -naphthylamide).

4.4. PCR de los genes asociados a la resistencia a antibióticos

Previamente, se realizó la extracción de DNA de las cepas de *B. bacilliformis* y se evidenció su presencia mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 16). Luego, se amplificó el gen *ialB* de todas las cepas del presente estudio lo que nos indica que es *B. bacilliformis* y no bacterias contaminantes. Los resultados son mostrados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se evidencia el gen *ialB* con un tamaño de 558 pb en todas las cepas analizadas (Figura 17). De la misma manera, se procedió con las cepas de *B. bacilliformis* USM-LMM-001, USM-LMM-002 y USM-LMM-003.

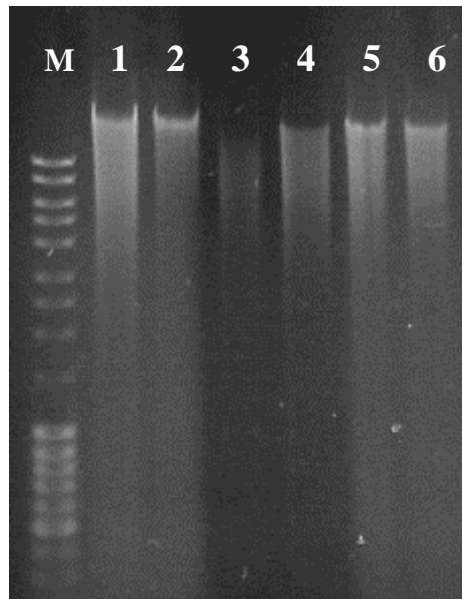


Figura 16. Extracción de DNA genómico de las cepas de *B. bacilliformis*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. 1: DNA de USM-LMM-002. 2: DNA de USM-LMM-003. 3: DNA de USM-LMM-001. 4: DNA de CIP57.17. 5: DNA de CIP57.18. 6: DNA de CIP 77.27. M: Marcador de Tamaño Molecular Mass Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).

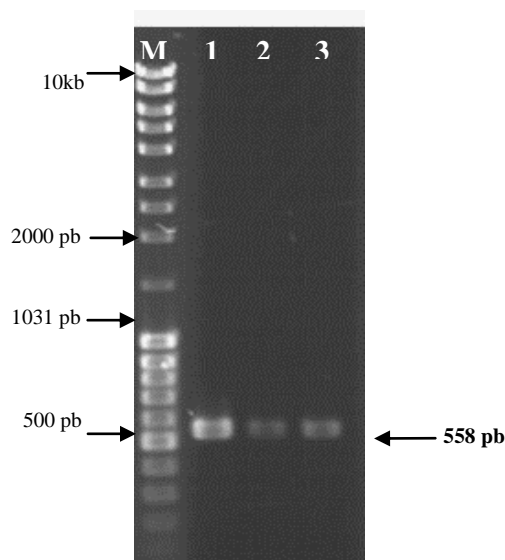


Figura 17. Amplificados del gen *ialB* para la identificación de la especie *B. bacilliformis*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. 1: Cepa CIP57.17. 2: Cepa USM-LMM-002. 3: Cepa USM-LMM-003. M: Marcador de Tamaño Molecular Mass Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).

Para la estandarización de los genes asociados a la resistencia a antibióticos; previamente, se analizó mediante el programa bioinformático: fastPCR (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm>) para predecir los tamaños de los amplificadores, debido a que los trabajos científicos relacionados con genes de

resistencia a antibióticos y de donde se obtuvo los iniciadores algunos no detallaban el fragmento a amplificar y las temperaturas de alineamiento (Tabla 7).

Tabla 7. Genes asociados a la resistencia a antibióticos en *B. bacilliformis* y la determinación del tamaño del amplificado

Genes	Tamaño del gen (pb)	Nº de aa de la proteína	Tamaño esperado del amplificado (pb)
<i>gyrA</i>	2787	928	618
<i>rpoB</i>	4152	1383	430
<i>parC</i>	2238	745	349
<i>16S-1</i>	1472	-----	779 (iniciador F1 y R1)
<i>16S-2</i>	1472	-----	873 (iniciador F2 y R2)
<i>L4</i>	621	206	621

Determinado los tamaños a amplificar, se procedió a estandarizar los PCR de los genes asociados a la resistencia. Para amplificar los genes *gyrA*, *rpoB* y *parC* se probaron varias temperaturas de alineamiento siendo la óptima de 55°C. Para amplificar los genes rRNA 16S y L4 se utilizó una temperatura de alineamiento de 42°C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se muestra los amplificados de algunos genes de resistencia positivos (Figura 18, 19, 20 y 21). Las bandas resultantes estuvieron en concordancia con la predicción realizada con el programa bioinformático utilizado.

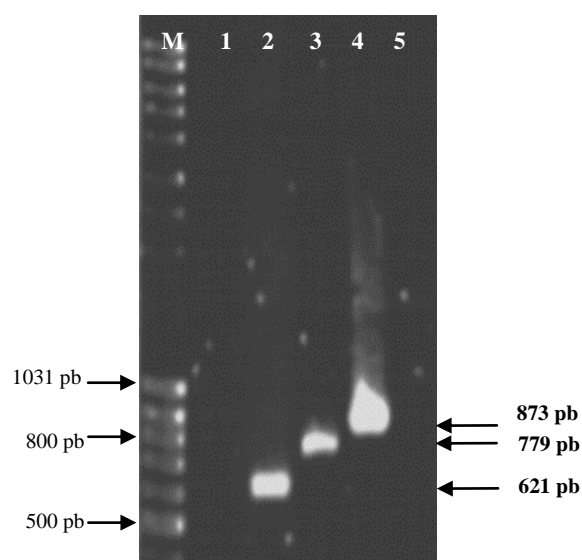


Figura 18. Posibles genes asociados a la resistencia a antibióticos de la cepa *B. bacilliformis* CIP57.18. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. 1: gen *rpoB*. 2: gen L4. 3: gen rRNA 16S-1. 4: gen rRNA 16S-2. M: Marcador de Tamaño Molecular Mass Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).

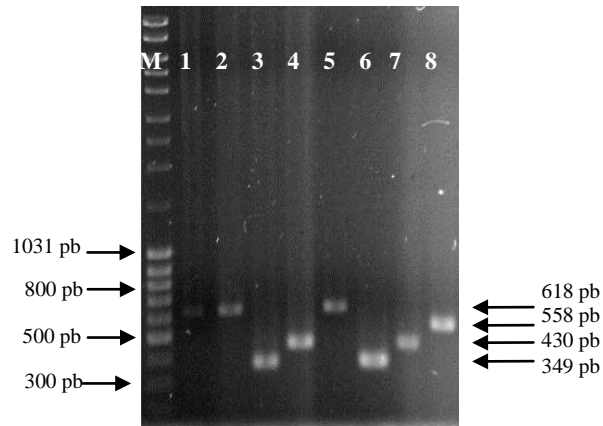


Figura 19. Amplificados de los genes probablemente asociados a la resistencia a ciprofloxacina, ácido nalidíxico, rifampicina en *B. bacilliformis*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. **1:** gen *gyrA* (USM-LMM-002). **2:** gen *gyrA* (USM-LMM-003). **3:** gen *parC* (USM-LMM-003). **4:** gen *rpoB* (USM-LMM-003). **5:** gen *gyrA* (CIP57.17). **6:** gen *parC* (CIP57.17). **7:** gen *rpoB* (CIP57.17). **8:** gen *ialB* (CIP57.17). **M:** Marcador de Tamaño Molecular Mass Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).

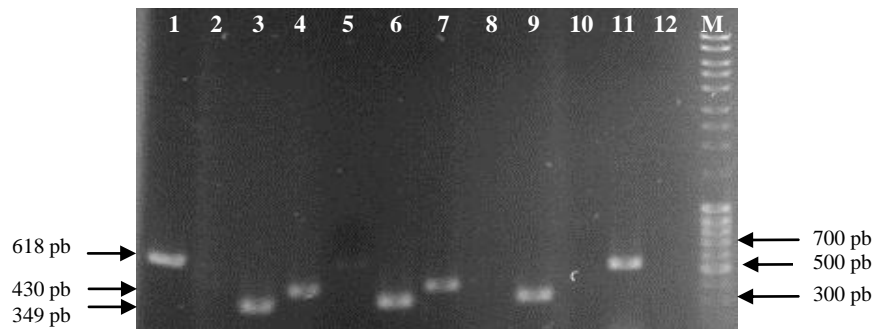


Figura 20. Posibles genes asociados a la resistencia a antibióticos en *B. bacilliformis*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. **1:** gen *gyrA* (USM-LMM-002-Sen). **3:** gen *parC* (USM-LMM-002-Sen). **4:** gen *rpoB* (USM-LMM-002). **5:** gen *gyrA* (CIP57.18). **6:** gen *parC* (CIP57.18). **7:** gen *rpoB* (CIP57.18). **8:** gen *gyrA* (USM-LMM-001). **9:** gen *parC* (USM-LMM-001). **10:** gen *rpoB* (USM-LMM-001). **11:** gen *ialB* (USM-LMM-001). **12:** gen *ialB* (CIP57.18). **M:** Marcador de Tamaño Molecular Mass Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).

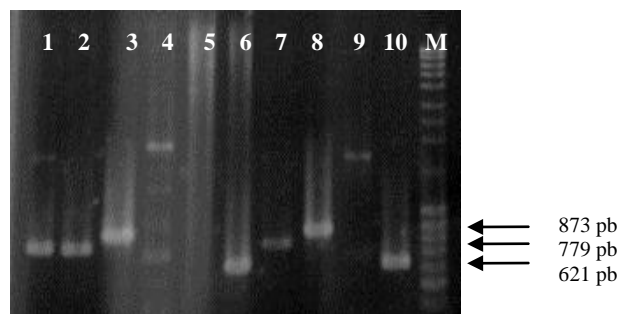


Figura 21. Posibles genes asociados a la resistencia a gentamicina y eritromicina en *B. bacilliformis*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. **1:** gen 16S-1 (USM-LMM-002). **2:** gen 16S-1 (USM-LMM-002-Sen). **3:** gen 16S-2 (USM-LMM-002). **6:** gen L4 (USM-LMM-002). **7:** gen 16S-1 (USM-LMM-003). **8:** gen 16S-2 (USM-LMM-003). **10:** gen L4 (USM-LMM-003). **M:** Marcador de Tamaño Molecular Mass Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).

4.5. Secuenciamiento y Análisis Bioinformático de los genes asociados a la resistencia.

Se obtuvo el secuenciamiento de los genes *gyrA*, *rpoB*, *parC*, rRNA 16S-1, rRNA 16S-2 y L4 ribosomal, los cuales fueron ensamblados por los programas CAP3 y Seqassem, editados con el programa BioEdit. Los resultados se muestran a continuación:

a) **Secuencia aminoacídica de GyrA:** En el análisis de las secuencias aminoacídica de GyrA de las cepas de *B. bacilliformis* analizadas no se encontraron ninguna diferencia entre ellas en relación a la región de resistencia a quinolonas (QRDR). Sin embargo, las cepas CIP 57.17 y CIP 57.18 presentan el aminoácido arginina en la posición 162 (posición 154 en la *gyrA* de *E. coli*) a diferencia de las otras cepas que presentan histidina. Además, la cepa de *B. bacilliformis* KC583 presenta el aminoácido cisteína en la posición 27 (posición 19 en la *gyrA* de *E. coli*) a diferencia de las cepas en estudio que presentan una arginina, aunque estos cambios no afecta a la susceptibilidad a ciprofloxacina. Comparando con la *gyrA* de *E. coli* se encontró que existe una diferencia a nivel del aminoácido 83 (Ser por Ala) (Figura 22).

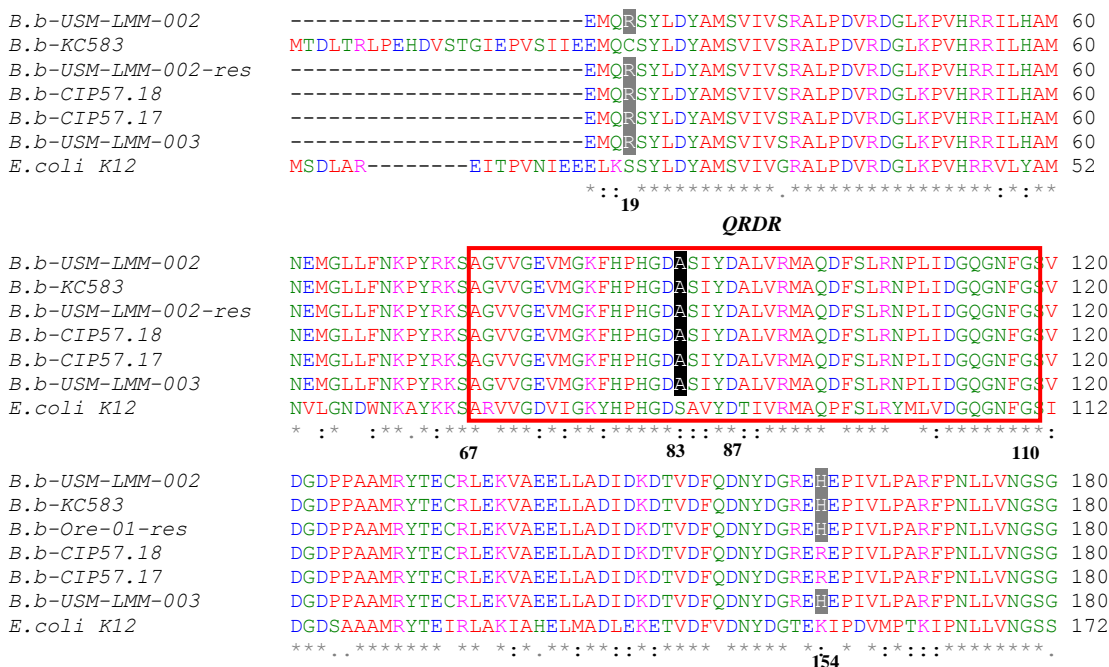


Figura 22. Alineamiento múltiple de la proteína GyrA de las cepas de *B. bacilliformis* comparadas con la GyrA de *E. coli* K12, indicando sus respectivos aminoácidos (Ser83 por Ala, en negro). Se indica en gris la diferencia aminoacídica entre cepas de *B. bacilliformis*. La numeración corresponde a la proteína GyrA de *E. coli* (AP009048).

d) Proteína L4 ribosomal: Las cepas de *B. bacilliformis* analizadas en el presente estudio presentan una mutación en la posición 6 de la proteína en comparación con la cepa KC583 (un cambio de lisina por arginina). La secuencia aminoacídica de USM-LMM-001 presenta además una mutación en la posición 13 en relación a las otras cepas (un cambio de treonina por alanina) (Figura 25).

```

          6      13
B.b-KC583      MDLI I K T L D G K K I G E L S V S E H V F G L V P R E D I L Q R V V R W Q L A R R Q K G T H K V Q G R S D I S R T G 60
B.b-USM-LMM-003  --- I R T L D G K K I G E L S V S E H V F G L V P R E D I L Q R V V R W Q L A R R Q K G T H K V Q G R S D I S R T G 60
B.b-USM-LMM-001  --- I R T L D G K K A G E L S V S E H V F G L V P R E D I L Q R V V R W Q L A R R Q K G T H K V Q G R S D I S R T G 60
B.b-USM-LMM-002  --- I R T L D G K K I G E L S V S E H V F G L V P R E D I L Q R V V R W Q L A R R Q K G T H K V Q G R S D I S R T G 60
                * : * * * * * : * * * * *
B.b-KC583      A K M Y K Q K G T G R A R H S S A R A P Q F R G G G K A H G P V I R S H A H G L P K K S F A L G L R L A L S A K F K A N 120
B.b-USM-LMM-003  A K M Y K Q K G T G R A R H S S A R A P Q F R G G G K A H G P V I R S H A H G L P K K S F A L G L R L A L S A K F K A N 120
B.b-USM-LMM-001  A K M Y K Q K G T G R A R H S S A R A P Q F R G G G K A H G P V I R S H A H G L P K K S F A L G L R L A L S A K F K A N 120
B.b-USM-LMM-002  A K M Y K Q K G T G R A R H S S A R A P Q F R G G G K A H G P V I R S H A H G L P K K S F A L G L R L A L S A K F K A N 120
                * * * * *
B.b-KC583      D L I V I D E F N L Q D P K T K V L A T N F S K L G F N N A L L I G G K E I D V N F F R A A S N I P N I D V L P I Q G I 180
B.b-USM-LMM-003  D L I V I D E F N L Q D P K T K V L A T N F S K L G F N N A L L I G G K E I D V N F F R A A S N I P N I D V L P I Q G I 180
B.b-USM-LMM-001  D L I V I D E F N L Q D P K T K V L A T N F S K L G F N N A L L I G G K E I D V N F F R A A S N I P N I D V L P I Q G I 180
B.b-USM-LMM-002  D L I V I D E F N L Q D P K T K V L A T N F S K L G F N N A L L I G G K E I D V N F F R A A S N I P N I D V L P I Q G I 180
                * * * * *
B.b-KC583      N V Y D I L R R S K L V L S K K A V E A L E E R F ----- 205
B.b-USM-LMM-003  N V Y D I L R R S K L V L S K K A V E A L E E R F ----- 205
B.b-USM-LMM-001  N V Y D I L R R S K L V L S K K A V E A L E E R ----- 204
B.b-USM-LMM-002  N V Y D I L R R S K L V L S K K A V E A L E E R ----- 204
                * * * * * : *

```

Figura 25. Alineamiento múltiple de la proteína ribosomal L4 de las cepas de *B. bacilliformis* de cepas clínicas comparadas con la proteína L4 de la *B. bacilliformis* KC583.

e) Gen ribosomal 16S: En el análisis de la región del RNA ribosomal 16S-1 y 16S-2 no se encontró ninguna mutación siendo conservada esta región. El secuenciamiento del DNA ribosomal 16S nos indica que los aislados pertenecen a la especie *B. bacilliformis* (datos no mostrados).

f) Secuencia aminoacídica de IalB: Las secuencias de la proteína IalB de las cepas clínicas analizadas nos indican que pertenecen a *B. bacilliformis* (Figura 26).

```

B.b-USM-LMM-002      -----QNVKPAATKPSVATLPNGASSLTETYGLWSVNCGIQDG 60
B.b-USM-LMM-003      -----QNVKPAATKPSVATLPNGASSLTETYGLWSVNCGIQDG 60
B.b-CIP57.17         -----QNVKPAATKPSVATLPNGASSLTETYGLWSVNCGIQDG 60
B.b-CIP57.18         -----QNVKPAATKPSVATLPNGASSLTETYGLWSVNCGIQDG 60
B.b-KC583            MKKILNLFVISAFLSISSAAFAQNVKPAATKPSVATLPNGASSLTETYGLWSVNCGIQDG 60
B.b-USM-LMM-001      -----QNVKPAATKPSVATLPNGASSLTETYGLWSVNCGIQDG 60
                      *****

B.b-USM-LMM-002      NKICIMLRQEVNEQDRVLLSMSVSLDGEQTVSGNLTIPFGILVSKPIRLHVDDSKSVIES 120
B.b-USM-LMM-003      NKICIMLRQEVNEQDRVLLSMSVSLDGEQTVSGNLTIPFGILVSKPIRLHVDDSKSVIES 120
B.b-CIP57.17         NKICIMLRQEVNEQDRVLLSMSVSLDGEQTVSGNLTIPFGILVSKPIRLHVDDSKSVIES 120
B.b-CIP57.18         NKICIMLRQEVNEQDRVLLSMSVSLDGEQTVSGNLTIPFGILVSKPIRLHVDDSKSVIES 120
B.b-KC583            NKICIMLRQEVNEQDRVLLSMSVSLDGEQTVSGNLTIPFGILVSKPIRLHVDDSKSVIES 120
B.b-USM-LMM-001      NKICIMLRQEVNEQDRVLLSMSVSLDGEQTVSGNLTIPFGILVSKPIRLHVDDSKSVIES 120
                      *****

B.b-USM-LMM-002      NVRTCVPAGCVVPIVFDKNFVGS LRAGQLKLSMTVAAPGEPTLDNLFVQLDGF SNALKR 180
B.b-USM-LMM-003      NVRTCVPAGCVVPIVFDKNFVGS LRAGQLKLSMTVAAPGEPTLDNLFVQLDGF SNALKR 180
B.b-CIP57.17         NVRTCVPAGCVVPIVFDKNFVGS LRAGQLKLSMTVAAPGEPTLDNLFVQLDGF SNALKR 180
B.b-CIP57.18         NVRTCVPAGCVVPIVFDKNFVGS LRAGQLKLSMTVAAPGEPTLDNLFVQLDGF SNALKR 180
B.b-KC583            NVRTCVPAGCVVPIVFDKNFVGS LRAGQLKLSMTVAAPGEPTLDNLFVQLDGF SNALKR 180
B.b-USM-LMM-001      NVRTCVPAGCVVPIVFDKNFVGS LRAGQLKLSMTVAAPGEPTLDNLF----- 167
                      *****

B.b-USM-LMM-002      L T S L Q K 164
B.b-USM-LMM-003      L T S L Q K 164
B.b-CIP57.17         L T S L Q K 164
B.b-CIP57.18         L T S L Q K 164
B.b-KC583            L T S L Q K 186
B.b-USM-LMM-001      -----

```

Figura 26. Alineamiento múltiple de la proteína IalB de las cepas de *B. bacilliformis* que presentan todos sus aminoácidos conservados.

V. DISCUSIÓN

La presente investigación es el primer trabajo sobre caracterización molecular de los genes asociados a la resistencia antimicrobiana a partir de cepas nativas de *B. bacilliformis* de zonas endémicas del Perú. Este estudio es de gran importancia, porque a pesar que las especies de *Bartonella* spp. son altamente susceptibles a pruebas de antibióticos (Dörbecker *et al.*, 2006), existen reportes de fallas en la monoterapia para las enfermedades relacionadas a *Bartonella* usando b-lactámicos, macrólidos, tetraciclina, rifampicina o fluoroquinolonas (Biswas *et al.*, 2007).

La obtención de mutantes resistentes a antibióticos *in vitro* en *B. bacilliformis* ha sido reportado para los genes *rpoB*, *gyrA* y RNA ribosomal 23S mediante varios pasajes de la bacteria en presencia de los antibióticos (Biswas *et al.*, 2007). Por el contrario, en este trabajo se evaluó si los genes asociados a la resistencia en cepas de *B. bacilliformis* aislados de lugares endémicos presentan o no mutaciones en dichos genes y así poder correlacionar con las mutaciones encontradas *in vitro*. Es por ello que, se realizaron las pruebas de susceptibilidad de antibióticos a las cepas de *B. bacilliformis* aisladas, y amplificación y secuenciamiento de dichos genes de resistencia a antibióticos.

El ensayo de susceptibilidad antimicrobiana fue estandarizado para realizarse de 6-8 días, siendo el tiempo óptimo para el crecimiento de la bacteria y distinguir halos de inhibición. Por otra parte, otros trabajos recomiendan para *B. bacilliformis* 12 días para reportar los MICs (Angelakis *et al.*, 2008); sin embargo, la evaluación durante este periodo demostró que no existe diferencia en el tamaño de los halos de inhibición si se lee en el sexto o el décimosegundo día, pero a más tiempo de incubación el crecimiento es abundante, pero hay un mayor riesgo de contaminación.

Todas las cepas de *B. bacilliformis* analizadas presentan un pequeño dominio con los mismos aminoácidos ⁸²DASIYDA⁸⁸ en la región del QRDR de GyrA y ParC, siendo iguales a las secuencias de *B. bacilliformis* KC583 (Numero de accesoión: YP_989035) depositadas en el GenBank, sin embargo al ser comparadas con la GyrA de *E. coli* presentan todas una diferencia en la posición 91 (Ser por Ala, correspondiente a la posición 83 en la GyrA de *E. coli*) (Figura 22). Similares resultados fueron obtenidos en la comparación de 20 cepas de *Bartonella* spp. de Australia y en *B. henselae*, *B. quintana* y *B. bacilliformis*.(Angelakis *et al.*, 2008; Angelakis *et al* 2009).

En el presente estudio se encontró que todas las cepas de *B. bacilliformis* ensayadas mostraron resistencia a ácido nalidíxico (Figura 12) y presentan la Ala-91 en GyrA y Ala-85 en ParC (posición 83 y 80, respectivamente en *E. coli*). Se ha descrito que principalmente esta resistencia está relacionada a las mutaciones encontradas en el QRDR de ParC y GyrA (topoisomerasa IV y DNA girasa, respectivamente) en las posiciones 81, 83, 87 en el GyrA que corresponden a las posiciones 78, 80 y 84 en ParC (Jiménez *et al.*, 2009). La asociación de las mutaciones de la *gyrA* con la resistencia a fluoroquinolonas ha sido establecido en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Además, la resistencia mediada por GyrA a fluoroquinolonas ha sido descrita detalladamente en *E. coli* y en varios *Mycobacterium* spp. (Biswas *et al.*, 2007). En *E. coli*, una simple mutación en el gen *gyrA* resulta en el decrecimiento de la susceptibilidad a fluoroquinolonas, y una doble sustitución de aminoácidos en dicha proteína están asociados a altos niveles de resistencia, sugiriendo que un primer paso para encontrar decrecimiento en la susceptibilidad a fluoroquinolonas es una mutación en Ser-83. De la misma manera, altos niveles de resistencia han sido reportados en *Mycobacterium tuberculosis* por sustitución de aminoácidos en la GyrA nativa en las posiciones críticas 83, 84 y 87, con MICs que han sido 100 veces mayores cuando estas mutaciones se acumulan (Biswas *et al.*, 2007).

En relación al gen *gyrA*, todas las cepas de *B. bacilliformis* ensayadas presentan también la Ala-83 en el QRDR, sin embargo las cepas fueron sensibles a ciprofloxacina (halo de 46-55 mm) a excepción de la cepa USM-LMM-002 con una susceptibilidad disminuida (halo de 19 mm) (Tabla 6), es evidente que además de esta mutación posiblemente estén participando en esta cepa otras formas de resistencia como las cromosómicas tales como mutaciones en los genes *parC* y otras regiones de la *gyrA* que colaborarían en la resistencia de la ciprofloxacina (Mininck *et al.*, 2003), y lo contrario probablemente ocurriría en las otras cepas. Otra posibilidad, es que la diferencia en susceptibilidad a fluoroquinolonas se deba a mutaciones en el gen *gyrB* como se ha demostrado en mutantes de *E. coli* KL16 tipo 2 (Lys-447 a Glu) que son resistentes a quinolonas ácidas (ácido nalidíxico) y superhipersensible a quinolonas anfotéricas (ciprofloxacina) (Yoshida *et al.*, 1991). Por otro lado, en *B. bacilliformis* se han obtenido mutantes para GyrA resistentes a ciprofloxacina donde está involucrada la posición C249T que corresponde al aminoácido D87N (numeración de la GyrA de *E.*

coli) y otras posiciones nucleotídicas (G283 por A, A269 por G) que confieren resistencia a fluoroquinolonas (Mininck *et al.*, 2003).

La alanina en la posición 91 y 85 encontrada en *B. bacilliformis* para los genes *GyrA* y *ParC*, respectivamente, estaría asociada con la resistencia a ácido nalidíxico y disminución de la susceptibilidad a ciprofloxacina dependiendo del antibiótico. Al igual que en otros microorganismos, se ha demostrado que para las especies de *Bartonella* existen heterogenicidad en la susceptibilidad a diferentes fluoroquinolonas, siendo la ciprofloxacina más efectiva que la perfloxacina y 10 veces más efectiva que la ofloxacina (Angelakis *et al.*, 2008). Además, estudios en *Salmonella enterica* var *Typhi* demuestran que la susceptibilidad al ácido nalidíxico es un buen marcador indirecto para la susceptibilidad a ciprofloxacina, pero la resistencia a ácido nalidíxico no es un valor predictivo para la resistencia a ciprofloxacina y gatifloxacina (Ray *et al.*, 2006). Aislados de *E. coli* de pacientes humanos fueron resistentes a ácido nalidíxico pero susceptible a otras quinolonas (norfloxacina, ciprofloxacina y gatifloxacina), los cuales fueron correlacionados con los genes asociados a la resistencia determinándose que los niveles de resistencia depende del número de mutaciones acumuladas en la región QRDR del gen *gyrA* y *parC*. Estos resultados apoyan que es necesario la acumulación de mutaciones en el gen de resistencia primaria (gen *gyrA*) para conferir altos niveles de resistencia a quinolonas. A la vez, otros mecanismos tales como bombas de expulsión, la alteración en la permeabilidad de la membrana, podrían estar involucrados (ITO, 2008). Del mismo modo, la presencia de Ala en las posiciones 91 y 85 del QRDR de *GyrA* y *ParC*, respectivamente, de las cepas de *B. bacilliformis* no confieriría un mismo nivel de resistencia para todas las fluoroquinolonas.

Para evaluar si el mecanismo de resistencia a fluoroquinolonas en las cepas analizadas es debido a la sobreexpresión de bombas de expulsión del antibiótico se repitieron los experimentos en presencia y ausencia de un inhibidor de bombas MC 207,110 (Phe-Arg- β -naphtylamyde) a una concentración de 20 mg/L, con las cepas resistentes a ácido nalidíxico y a la susceptibilidad disminuida de la cepa USM-LMM-002. Se concluye que las bombas de expulsión no están involucradas en la resistencia a ácido nalidíxico y a ciprofloxacina en las cepas ensayadas, observándose que la resistencia al ácido nalidíxico no se alteró en presencia del inhibidor (Figura 12). Este inhibidor actúa a nivel de bombas tipo - Mex en *Pseudomonas aeruginosa* y AcrAB in

Escherichia coli. Por el contrario, en otros trabajos donde se utilizó este inhibidor de bombas se encontró que las bombas de expulsión participan en la resistencia donde se demostró que afecta el MIC de ácido nalidíxico mientras el MIC de ciprofloxacina no cambia. En 45% de aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii* el MIC de ácido nalidíxico decreció al menos ocho veces en la presencia de este inhibidor, mientras un decrecimiento del MIC en el 18% de aislados clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia* se observó para el mismo antibiótico (Ribera *et al.*, 2002).

Los valores de MICs a partir de los Etest para ciprofloxacina se encontraron entre 0.015 a 2 mg/L para las cepas ensayadas (CIP57.18 = 0.015 mg/L, CIP77.27 = 0.015 mg/L, Cor-01 = 0.125 mg/L, CIP57.17 = 0.125 mg/L, MN-01 = 0.125 mg/L y Ore-01 fue de 2mg/L) (Tabla 6 y Figura 13). Siendo, el valor de 2 mg/L perteneciente a la susceptibilidad disminuida de la cepa USM-LMM-002. Esta diferencia en valores de Etest para ciprofloxacina entre cepas de una misma especie ya ha sido reportada, así se han encontrado rangos de susceptibilidad para ciprofloxacina que oscilan entre 0,06 a 0,5 mg/L (Sobraques *et al.*, 1999; Rolain *et al.*, 2004; Angelakis *et al.*, 2008).

Las cepas de *B. bacilliformis* analizadas mostraron sensibilidad a los demás antibióticos (gentamicina, levofloxacina, rifampicina, doxiciclina, eritromicina y cloranfenicol) los cuales fueron demostrados por la inhibición del crecimiento en los antibiogramas (Tabla 6) y por el secuenciamiento de genes que han sido asociados a dicha resistencia. Similarmente, aislados de *Bartonella* spp. de Australia fueron susceptibles a aminoglicósidos, doxiciclina y rifampicina (Angelakis *et al.*, 2008). En el presente estudio no se encontró mutaciones, inserciones o deleciones en los genes asociados a la resistencia a antibióticos: gen *rpoB*, gen ribosomal L4 y el gen ribosomal 16S. Mutaciones *in vitro* han sido reportados para la rifampicina, obteniéndose mutantes resistentes a este antibiótico que presenta un MIC de 32 mg/L y una mutación en la región determinante de resistencia a rifampicina (RRDR) del gen *rpoB* (G2868A que corresponde al aminoácido S531F, numeración de *E. coli*). Para eritromicina se obtuvieron mutantes resistentes en *E. coli* debido al gen ribosomal 23S (posición 754, 2057, 2058, 2059 y 2611) (Vester y Douthwaite, 2001; Meghari *et al.*, 2006), únicamente en *B. bacilliformis* se ha encontrado mutantes que presentan un MIC de 256 mg/L y una mutación en el gen ribosomal 23S (A2058G en el dominio V), la cual también ha sido encontrada en *B. henselae* (Biswas *et al.*, 2006). Además, la proteína

L4 participa en la resistencia a eritromicina en *B. quintana* debido a una inserción de 9 aminoácidos entre el aminoácido R71 y A72. La proteína L22 también podría estar involucrada en esta resistencia. No se han obtenido *in vitro* mutantes en *B. bacilliformis* resistentes a gentamicina y doxiciclina (Biswas *et al.*, 2007), lo que corrobora nuestros resultados obtenidos.

Todas las cepas del presente estudio fueron confirmadas como pertenecientes a la especie *B. bacilliformis* por secuenciamiento del RNA ribosomal 16S y del gen *ialB* cuya secuencias fueron idénticas a la especie. Aunque, se ha reportado amplificaciones del gen *ialB* para *B. clarridgeiae* (Flores, 2008), la comparación de la *IalB* de *B. clarridgeiae* no es idéntica a la de *B. bacilliformis*. Es importante realizar la confirmación de la especie debido a que se han reportado contaminaciones con otras bacterias en el medio de cultivo o amplificaciones de bacterias contaminantes como es el caso del género *Mezorhizobium* considerado un contaminante de agua grado molecular utilizado para la PCR (Maggi y Breitschwerdt, 2005).

Mediante herramientas bioinformáticas se realizó el modelamiento de la estructura de la proteína GyrA con la alanina en la posición 91 en el QRDR de *B. bacilliformis* KC583 (Figura 27), para lo cual se realizó también el modelo de la estructura de la GyrA de *E. coli* con el aminoácido Ala-83 (aislados resistentes a ácido nalidíxico). La comparación se realizó con la estructura de la GyrA de *E. coli* apreciando un cambio en la estructura terciaria, sugiriendo una débil interacción entre la ciprofloxacina y sus blancos afectando la unión de las fluoroquinolonas y volviendo a la bacteria menos susceptible al antibiótico. De manera similar este cambio estaría afectando al gen *parC*. Este cambio de Ser por Ala alteraría los patrones de hidrofobicidad que se relacionan con la estructura de la proteína.

Es por ello, debido a la resistencia mostrada frente al ácido nalidíxico, además de la obtención de mutaciones *in vitro* y la sensibilidad muy alta a otros antibióticos se debería revisar qué antibióticos podrían ser utilizados para mejorar el tratamiento y evitar posibles rebrotes. Doxiciclina en asociación con gentamicina podrían ser preferidos para el tratamiento de la fase aguda y eruptiva de la Enfermedad de Carrión, similares a otras enfermedades por bartonelas (Biswas *et al.*, 2007), de la misma manera en el presente trabajo se encontró una alta sensibilidad también a rifampicina,

eritromicina y cloranfenicol. Los resultados *in vitro* demuestran que el régimen usado frecuente en el tratamiento para la Fiebre de la Oroya o Verruga Peruana podría ser inadecuado (Angelakis *et al.*, 2008).

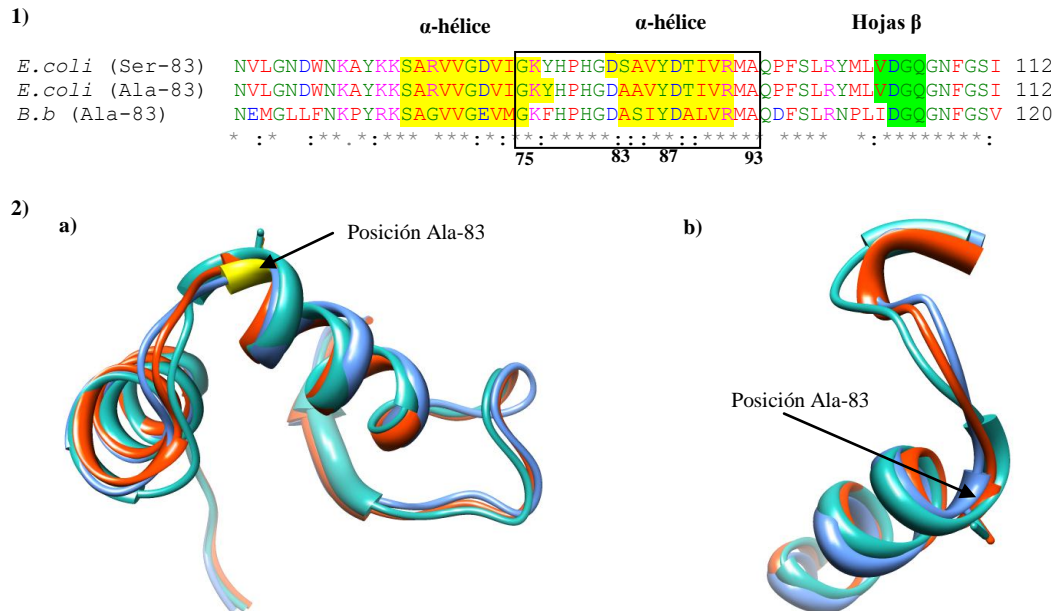


Figura 27. Análisis bioinformático de la GyrA de *B. bacilliformis* KC583. 1) Alineamiento múltiple de estructura secundaria del QRDR de GyrA. 2) Predicción de la estructura terciaria de la GyrA de *B. bacilliformis* con Alanina en la posición 83 (en azul) comparada con la GyrA mutada (Ser-83 por Ala) de *E. coli* (en rojo) y con la GyrA nativa (Ser-83) de *E. coli* (PDB: 1AB4) (en verde). Posición 83 en la GyrA de *B. bacilliformis* (en amarillo). a) Representación indicando α -hélices y hojas β , b) parte del QRDR de GyrA (indicado en el recuadro de la figura 27.1).

El examen de frotis y el cultivo realizado a partir de pacientes con síntomas de *B. bacilliformis* no se correlacionaron. De las cepas encontradas como positivas por PCR, únicamente las muestras de las cuales se aislaron las cepas USM-LMM-001 y USM-LMM-003 dieron frotis positivo, en cambio la muestra de la cual se aisló la cepa USM-LMM-002 fue frotis negativo (Tabla 5). Anteriormente, se ha demostrado que la técnica de frotis tiene una baja sensibilidad mas aún en casos leves, subclínicos y en los previamente tratados (Breña *et al.*, 2006; Maguiña *et al.*, 2008), dificultando también su aislamiento mediante cultivo por un falso negativo en el frotis. Además, siendo la cantidad de *B. bacilliformis* escasa y variable en eritrocitos es probable que no se pueda evidenciar las bacterias en un frotis. Similares resultados se obtuvieron en otras investigaciones donde se encontraron cultivos positivos y frotises negativos, resultando

el método del frotis poco sensible para detectar la presencia de *Bartonella* en comparación al cultivo (Ellis *et al.*, 1999).

De las 18 muestras tomadas en los muestreos sólo se obtuvo 3 cultivos positivos. Es por ello, importante considerar la adaptabilidad de *B. bacilliformis* al medio de cultivo siendo el período de crecimiento variable de cepa a cepa, por ejemplo la cepa USM-LMM-001 creció en 7 semanas, en cambio para las cepas USM-LMM-002 y USM-LMM-003 fue de 9 y 4 días, respectivamente. Previamente, se ha demostrado que el aislamiento de *Bartonella* consume tiempo de 2 a 6 semanas o largos periodos de aislamiento primario (Anderson and Neuman, 1997). Otra causa podría ser un falso positivo por coloración Giemsa, en el presente trabajo no se observaron bacterias en la mayoría de las muestras.

Aunque existen casos reportados en el 2008 y 2009 de la Enfermedad de Carrión, el acceso o la adquisición de las cepas de *B. bacilliformis* es difícil, solamente se logró realizar dos coordinaciones en Cuzco y La Libertad. A pesar de ello, se trabajó con tres tipos de muestra: a) una persona que no recibió tratamiento de antibióticos (USM-LMM-001), b) una persona que continuaba presentando síntomas luego del tratamiento (USM-LMM-002) y c) una persona que estaba en proceso de tratamiento (USM-LMM-003), con lo cual tenemos todas las posibilidades para analizar si las cepas eran resistentes. Solamente, se detectó el aminoácido alanina en la posición 91 y 85 para GyrA y ParC respectivamente en las cepas de *B. bacilliformis* circulantes en zonas endémicas, que proporciona una resistencia constitutiva a ácido nalidíxico. Otros microorganismos que poseen una Ala en GyrA o ParC o en ambas posiciones ya mencionadas, como *Brucella* spp., *Brevundiamonas diminuta* u otras especies del género *Bartonella* son constitutivamente resistentes a ácido nalidíxico, o presentan resistencia o niveles de susceptibilidad disminuida a ciprofloxacina (0.125 – 0.5 µg/ml o mas altos) (Del Valle *et al.*, 2009, en prensa). El estudio a futuro de otras zonas endémicas podrían aportar si *B. bacilliformis* en otras zonas está adquiriendo resistencia a antibióticos.

VI. CONCLUSIONES

- *Bartonella bacilliformis* presenta un crecimiento óptimo en placa para la lectura de antibiograma al sexto día de incubación en las condiciones estudiadas.
- La cepa clínica de *B. bacilliformis* USM-LMM-002 aislada de un paciente con tratamiento de antibiótico terminado presenta susceptibilidad disminuida a ciprofloxacina en comparación a las demás cepas.
- *B. bacilliformis* presenta resistencia constitutiva al ácido nalidíxico.
- En la secuencia específica de la región del QRDR de GyrA y ParC, la presencia de Ala en las posiciones 91 y 85, respectivamente, no determina necesariamente la resistencia a las fluoroquinolonas, aunque sí al ácido nalidíxico, necesitándose una mayor acumulación de mutaciones en GyrA y/o ParC para la resistencia a ciprofloxacina.
- Las cepas de *B. bacilliformis* estudiadas son susceptibles a gentamicina, rifampicina, cloranfenicol, doxiciclina, eritromicina y levofloxacina pudiendo recomendarse estos antibióticos para el tratamiento.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar el estudio de más cepas clínicas y en otras zonas endémicas como Ancash a fin de evaluar si existen mutaciones en las cepas de *B. bacilliformis* en dichas zonas.
- Se recomienda evaluar otros genes de resistencia como son el gen *gyrB*, *parE*, ribosomal 23S y la proteína ribosomal L22.
- Evaluar otras alternativas en el tratamiento de la Enfermedad de Carrión utilizando cloranfenicol, gentamicina y doxiciclina.
- Se recomienda que el aislamiento primario debe ser realizado por siembra en medio bifásico y en placa, porque en el presente trabajo se obtuvo mejores resultados en placa.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Anderson BE, Neuman MA.** 1997. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev 10(2): 203-19.
- **Angelakis E, Biswas S, Taylor C, Raoult D, Rolain JM.** 2008. Heterogeneity of susceptibility to fluoroquinolones in *Bartonella* isolates from Australia reveals a natural mutation in *gyrA*. J Antimicrob Chemother 61(6): 1252-5.
- **Angelakis E, Raoult D, Rolain JM.** 2009. Molecular characterization of resistance to fluoroquinolones in *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana*. J Antimicrob Chemother 63(6):1288-9.
- **Baron S.** 1995. Medical Microbiology. In Section 1.11: Antimicrobial Chemotherapy (Harold C. Neu and Thomas D. Gootz). Fourth Edition. The University of Texas Medical Branch at Galveston.
- **Bass JW, Vincent JM, Person DA.** 1997. The expanding spectrum of *Bartonella* infection: I. Bartonellosis and trench fever. Pediatr Infect Dis J 16: 2-10.
- **Berghoff J, Viezens J, Guptill L, Fabbi M, Arvand M.** 2007. *Bartonella henselae* exists as a mosaic of different genetic variants in the infected host. Microbiology 153: 2045–2051.
- **Biswas S, Raoult D, Rolain JM.** 2006. Molecular characterization of resistance to macrolides in *Bartonella henselae*. Antimicrob Agents Chemother 50(9): 3192-3.
- **Biswas S, Raoult D, Rolain JM.** 2007. Molecular mechanisms of resistance to antibiotics in *Bartonella bacilliformis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance 59(6): 1065-1070.
- **Brenner D, O'Connor S, Winkler H, Steigerwalt A.** 1993. Proposals To Unify the Genera *Bartonella* and *Rochalimaea* , with Descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb . nov. , *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and To Remove the Family *Bartonellaceae* from the Order Rickettsiales. Int. J. Syst. Bacteriol 45: 1–8.
- **Breña J, Maguiña C, Hernández H, Castillo M, Pozo W.** 2006. Acute Bartonellosis in children. Study of 32 cases at the Instituto Especializado de Salud del Niño and the Hospital Nacional Cayetano Heredia (Period 1993-2003). Rev Med Hered 17 (3): 122-131.
- **Burstein Z, Mayta P.** 2007. En defensa de la denominación como “Enfermedad de Carrión” para la Bartonelosis Humana producida por la *Bartonella bacilliformis*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública 24(2): 103-106.

- **Cáceres A, Galati E, Le Pont F, Velásquez C.** 1995. La fauna flebotómica (Diptera: Psychodidae) de tres provincias de la Región Nor Oriental del Marañón, Perú. *Rev Soc Bras Med Trop* 28: 215-21.
- **Cáceres A, Galati E, Le Pont F, Velásquez C.** 1997. Possible role of *Lutzomyia maranonensis* and *Lutzomyia robusta* (Diptera: Psychodidae) as vectors of human bartonellosis in three provinces of Región Nor Oriental del Marañón, Perú. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 39: 51-2.
- **Cornejo W, Vizcarra H.** 1999. *Bartonella henselae*: Nuevo Patógeno en Humanos. *Anales de la Facultad de Medicina* 60(4): 281 – 292.
- **Del Valle LJ, Flores L, Vargas M, García de la Guarda R, Quispe R, Ibáñez ZB, Alvarado D, Ramírez P, Ruiz J.** 2009. Is *Bartonella bacilliformis*, endemic pathogen of the Andean areas, intrinsically resistant to quinolones?. *International Journal of Infectious Diseases* (en prensa).
- **DGE. Boletín epidemiológico N° 22.** 2007. Órgano oficial de difusión técnico de la dirección general de epidemiología y la red nacional de epidemiología (RENACE) Ministerio de Salud, Lima-Perú.
- **DGE. Boletín epidemiológico N° 30.** 2009. Órgano oficial de difusión técnico de la dirección general de epidemiología y la red nacional de epidemiología (RENACE) Ministerio de Salud, Lima-Perú.
- **Dörbecker C, Sander A, Oberle K, Schülin-Casonato T.** 2006. *In vitro* susceptibility of *Bartonella* species to 17 antimicrobial compounds: comparison of Etest and agar dilution. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58: 784–788.
- **Ehrenborg C.** 2007. *Bartonella* Infections in Sweden: Clinical Investigations and Molecular Epidemiology. Thesis for the degree of Doctor of philosophy. Faculty of Medicine. Uppsala Universitet. Acta Universitatis Upsaliensis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 257. 62pp.
- **Ellis B, Rotz L, Leake J., et al.** 1999. An outbreak of acute bartonellosis (Oroya fever) in the Urubamba region of Peru, 1998. *Am J Trop Med Hyg* 61(2): 344-349.
- **Flores L.** 2008. Estudios moleculares en *Bartonella bacilliformis* para el control de la enfermedad de Carrión. Tesis de Maestría en Biología Molecular, Facultad Ciencias Biológicas-Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- **Fluit A, Visser M, Schmitz F.** 2001. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev* 14(4): 836-71.
- **Gonzáles C, Maguiña C, Heras F, Conde-Salazar L.** 2007. Bartonellosis (Fiebre de la Oroya o Verruga Peruana) ¿Enfermedad Ocupacional?. *Med Segur Trab* 53(209): 35-41.

- **Hall, TA.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- **Henríquez C, Infante B, Merello J, Gallino M, Santibáñez L, Maguiña C, Guerra H, Birtles R, Ventosilla P.** 2002. Identificación de *Bartonella bacilliformis* por métodos moleculares. *Rev Med Hered* 13: 58-63.
- **Henriquez C, Hinojosa C, Ventosilla P.** 2004. Report of an unusual case of persistent bacteremia by *Bartonella bacilliformis* in a splenectomized patient. *The american society of tropical medicine and hygiene* 71(1): 53-55.
- **ITO, Carmen Antonia Sanches et al.** 2008. Quinolone-resistant *Escherichia coli*. *Braz J Infect Dis* 12(1): 5-9.
- **Ives TJ, Marston EL, Regnery RL, Butts JD.** 2001. *In vitro* susceptibilities of *Bartonella* and *Rickettsia* spp. to fluoroquinolone antibiotics as determined by immunofluorescent antibody analysis of infected Vero cell monolayers. *Int J Antimicrob Agents* 18(3): 217-22.
- **Jiménez A, Arrabal M, Noguerras M.** 2009. Resistencias a quinolonas en aislados clínicos de *Escherichia coli* productores de betalactamasas de espectro extendido. *Hig. Sanid. Ambient* 9: 449-466.
- **Maggi R, Breitschwerdt E.** 2005. Potential Limitations of the 16S-23S rRNA Intergenic Region for Molecular Detection of *Bartonella* Species. *J. Clin. Microbiol* 43(3): 1171-1176.
- **Maguiña C.** 1998. Bartonelosis o Enfermedad de Carrión. Nuevos aspectos de una vieja enfermedad. A.F.A. Editores Importadores S. A., Lima, Perú 195pp.
- **Maguiña C, Ugarte-Gil C, Breña P, Ordaya E, Ventosilla P, Huarcaya E, Henriquez C.** 2008. Actualización de la enfermedad de Carrión. Update of Carrion's disease. *Rev Med Hered* 19 (1): 36-41.
- **Meghari S, Rolain JM, Grau GE, Platt E, Barrassi L, Mege JL, Raoult D.** 2006. Antiangiogenic effect of erythromycin: an in vitro model of *Bartonella quintana* infection. *J Infect Dis* 193(3): 380-6.
- **Minnick MF, Wilson ZR, Smitherman LS, Samuels DS.** 2003. *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant *Bartonella bacilliformis* strains obtained in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 47(1): 383-6.
- **MINSA.** 2005. Análisis de la Situación Actual: Bartonelosis Región Cusco. Primera Edición. 43pp.
- **Mogollon-Pasapera E, Otvos L Jr, Giordano A, Cassone M.** 2009. *Bartonella*: emerging pathogen or emerging awareness?. *Int J Infect Dis* 13(1): 3-8.

- **Montoya M, Cordova A.** 2001. Tratamiento antimicrobiano de la bartonelosis aguda. www.abmcusco.com.org.
- **Pachas, P.** 2005. Comunicación oral durante su conferencia en el Taller Internacional de Bartonelosis Humana, Organizado por el MINSA, Lima-Perú.
- **Pendle S, Ginn A, Iredell J.** 2006. Antimicrobial susceptibility of *Bartonella henselae* using Etest methodology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57: 761-763.
- **Ray P, Sharma J, Marak RS, Garg RK.** 2006. Predictive efficacy of nalidixic acid resistance as a marker of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* var Typhi. *Indian J Med Res* 124 (1): 105-8.
- **Ribera A, Ruiz J, Jimenez de Anta MT, Vila J.** 2002. Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 49(4): 697-8.
- **Rolain JM, Brouqui P, Koehler JE, Maguina C, Dolan MJ, Raoult D.** 2004. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. *Antimicrob Agents Chemother* 48(6): 1921-33.
- **Schutze GE.** 2000. Diagnóstico y tratamiento de las infecciones por *Bartonella henselae*. *Pediatr Infect Dis J* 16: 1185-1188.
- **Sobraquès M, Maurin M, Birtles RJ, Raoult D.** 1999. In vitro susceptibilities of four *Bartonella bacilliformis* strains to 30 antibiotic compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 43(8): 2090-2.
- **Tarazona A, Maguiña C, López de Guimaraes D, Montoya M, Pachas P.** 2006. Terapia antibiótica para el Manejo de la Bartonelosis o Enfermedad de Carrión en el Perú. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* 23(3): 188-200.
- **Tejada A, Vizcarra H, Pérez J, Cáceres A, Quispe J, Pinto J, Zorrilla V, Suarez AM, Picón L.** 2003. Estudio clínico epidemiológico de bartonelosis humana en el valle del Monzón, Huamalíes, Huánuco 64(4): 211-217.
- **Vega C, Ariza R.** 2008. Bartonelosis: espectro clínico actual de un viejo patógeno. *Med Int Mex* 24(3): 217-23.
- **Vester B, Douthwaite S.** 2001. Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* 45(1): 1-12.

- **Villaseca P, Padilla C, Ventura G, Samalvides F, Yañez H, Chevarría L, Ellis B, Rotz L, Leake J, Beati L.** 1999. Importancia de la *Lutzomyia peruensis* en la transmisión de la enfermedad de Carrión en el valle sagrado de los Incas Urubamba-Cusco, Perú. Rev Med Exp 15(1-2): 28-30.
- **Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Yamanaka LM, Nakamura S.** 1991. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 35(8): 1647-50.
- **Zerpa R, Tejada A, Guillén A.** 2006. Bartonellosis en una nueva visión. Rev Peru Med Exp Salud Pública 23(3): 230-232.

IX. ANEXOS

A) Medios de Cultivo

1.- Agar Columbia suplementados con al 4% de GRC y 2% de SBF

- Agar columbia 4.2 g
- Glóbulos rojos de carnero 4 ml
- Suero bovino fetal 2 ml.
- Agua destilada 100 ml

Autoclavar el Agar Columbia a 121°C por 15 minutos. Enfriar a 50°C y adicionar suero de bovino fetal y glóbulos rojo de carnero.

B) Preparación de soluciones

1.-TAE 50X

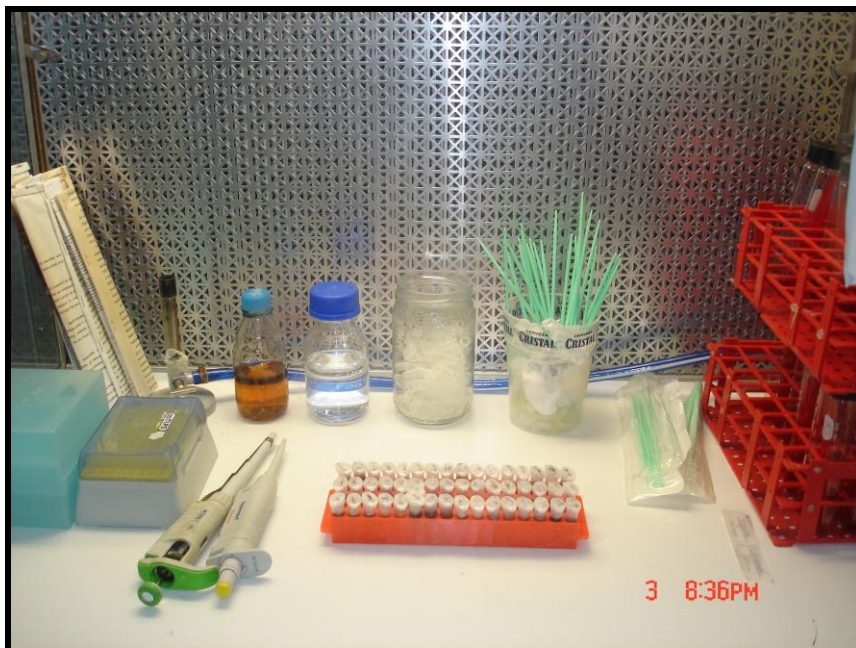
- Tris-base 242 mg
- Ácido acético 57.1 ml
- EDTA (0.5 M) 100 ml

Enrasar con 1 Litro de agua destilada y ajustar el pH a 8.0.

2.-Agarosa al 1%

- Pesar 0.3 g de agarosa y adicionar 30 ml de TAE 1X

C) Materiales utilizados



Materiales necesarios para el procesamiento de todas las muestras sanguíneas aisladas de pacientes.