

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

**“CARACTERIZACIÓN DE LAS REGIONES
DETERMINANTES DE RESISTENCIA A
ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE *bartonella
bacilliformis* AISLADAS EN ZONAS ENDÉMICAS DEL
PERÚ”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magister en Biología Molecular

AUTOR

Abraham Omar Espinoza Culupú

Lima – Perú

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO



Exped. N° 112-UPG-FCB-2014

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO
DE MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR

Siendo las...10:15... horas del día 25 de Agosto..... en el Salón de Grados
de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado Examinador presidido por:

Dra. Rina L. Ramírez Mesias	e integrado por
Dr. Jaime R. Sánchez Venegas	(Miembro)
Mg. Susana M. Gutiérrez Moreno	(Miembro)
Mg. Giovanna E. Sotil Caycho	(Miembro)
Mg. Ruth H. García de la Guarda	(Asesora)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara el Bachiller Don ABRAHAM OMAR ESPINOZA CULUPÚ.

Después de darse lectura al Expediente N° 112-UPG-FCB-14, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recibieron la exposición de la Tesis Titulada:

“CARACTERIZACIÓN DE LAS REGIONES DETERMINANTES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE *Bartonella bacilliformis* AISLADAS EN ZONAS ENDÉMICAS DEL PERÚ”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO



Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de... Ex.celente con la nota de 19

A continuación la Presidente del Jurado Examinador recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en... BIOLOGÍA MOLECULARal Bachiller... ABRAHAM OMAR ESPINOZA COLUPU

Siendo las... 12:20 se levantó la Sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, a los 25 días del mes de agosto del año 2014.

Dra. Rina L. Ramírez Mesias
Profesora Principal a D.E.
PRESIDENTE

Mg. Ruth H. García de la Guarda
Profesora Principal a D.E.
ASESORA

Dr. Jaime R. Sánchez Venegas
Profesor Auxiliar a T.C.
MIEMBRO

Mg. Susana M. Gutiérrez Moreno
Profesora Principal a T.C.
MIEMBRO

Mg. Giovanna E. Sotil Caycho
Profesor Auxiliar a T.P.
MIEMBRO

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis, ha requerido de esfuerzo y dedicación por parte del autor, no hubiese sido posible sin el apoyo desinteresado de todas y cada una de las personas que a continuación citaré.

- Antes de nada agradecer a Dios y a la Virgen por estar siempre conmigo en cada momento, iluminar mi mente y poderme guiar por el camino de aquellas personas que son mi compañía durante mi vida.
- Agradezco siempre a mi familia quienes a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica, creyeron en mí en todo momento y no dudaron de mis habilidades, mi madre María Culupú, por ser la persona que me brinda la fortaleza para seguir adelante, mis hermanas que siempre me apoyan y a mi hijo Erick.
- Un agradecimiento muy especial a mi asesora de tesis la Magister Ruth García de la Guarda, por brindarme su confianza, apoyo y consejos en la realización de la presente tesis, trabajar a su lado es una experiencia muy enriquecedora. Asimismo, le agradezco por su esfuerzo en lograr uno de los aspectos fundamentales para el desarrollo de mi tesis: el financiamiento, el cual provino del Proyecto PROCYT N°323-2010-CONCYTEC-OAJ, ganado por ella en uno de los concursos nacionales convocados por CONCYTEC.
- Al Doctor Pablo Ramírez Roca, por su apoyo, críticas y enseñanzas brindadas en la maestría y en la realización de la tesis.
- A la Magister Débora Alvarado por su apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio.
- A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por brindarme a través de los profesores las enseñanzas durante la maestría y a quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias a ellos por su paciencia y enseñanza.

- Al estado Peruano por brindarme la oportunidad de realizar la Maestría de Biología Molecular mediante la beca “Haya de la Torre”.
- A los ayudantes del laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología que me asistieron en la investigación: Melisa Icho, Anika Eca, George Vásquez, Aida Taboada.
- A los técnicos de laboratorio Juan Carlos Guerrero, Nexar Alvarado, Jesús Paico y Rosa Pintado del Centro de Salud I-4 Huancabamba, Piura por brindarnos su apoyo en la toma de muestras.
- A mis colegas y amigos de Piura los biólogos José Luis Ramos Coveñas y Martín Nizama Teixeira por su compañía y apoyo en las salidas de campo para las tomas de muestras.
- A mis amigos y colegas del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología por su solidaridad y grata compañía durante mi estancia.
- En general agradezco a todas las personas que han vivido conmigo la realización de esta investigación, desde lo más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado su apoyo, colaboración, ánimo y amistad.

Dedicada con mucho cariño
para una gran mujer, que me
enseñó desde pequeño la
perseverancia y a seguir mis
sueños...
Para ti mamá

ÍNDICE

	Pág.
Abreviaturas	I
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	IX
1.INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 <i>B. bacilliformis</i> .	3
2.2 Epidemiología de la Enfermedad de Carrión.	3
2.3 Características clínicas.	4
2.4 Diagnóstico.	5
2.5 Tratamiento de la Enfermedad de Carrión.	6
2.6 Resistencia a antibióticos y genes asociados a esta.	7
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	13
3.1 Hipótesis.	13
3.2 Objetivos.	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1 Área de estudio.	14
4.2 Aislamiento de cepas.	14
4.3 Extracción de DNA genómico.	15
4.4 Confirmación de la especie de <i>B. bacilliformis</i> de las muestras clínicas por PCR.	16
4.5 Electroforesis en gel de agarosa.	16
4.6 Estandarización del método de Kirby-Bauer para determinar la susceptibilidad antimicrobiana en <i>B. bacilliformis</i> .	17
4.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria en <i>B. bacilliformis</i> .	17
4.8 Cepas de <i>B. bacilliformis</i> con las que se ha trabajado.	18
4.9 Diseño de “ <i>primers</i> ” para la amplificación de las regiones. determinantes de resistencia.	19
4.10 Amplificación y secuenciamiento de los genes relacionados a la resistencia antimicrobiana.	20

4.11 Obtención de las secuencias de genes relacionados a resistencia antimicrobiana en el GenBank.	21
4.12 Análisis <i>in silico</i> de las secuencias obtenidas en el estudio.	23
4.12.1 Para las secuencias nucleotídicas.	23
4.12.2 Para las secuencias aminoacídicas.	23
4.13 Ingreso de las secuencias analizadas a la base de datos de secuencias nucleotídicas	25
5. RESULTADOS	26
5.1 Cultivo de las muestras colectadas.	26
5.2 Confirmación de la especie <i>B. bacilliformis</i> mediante amplificación del gen <i>ialB</i> por PCR.	27
5.3 Desarrollo de un antibiograma para determinar la susceptibilidad antimicrobiana en <i>B. bacilliformis</i> .	28
5.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria en <i>Bartonella bacilliformis</i> .	31
5.5 Amplificación de los genes relacionados con resistencia antimicrobiana en las cepas aisladas de <i>B. bacilliformis</i> .	33
5.6 Análisis <i>in silico</i> de la subunidad A de la DNA girasa (<i>gyrA</i>).	36
5.7 Análisis <i>in silico</i> de la subunidad B de la DNA girasa (<i>gyrB</i>).	38
5.8 Análisis <i>in silico</i> de la subunidad A de la topoisomerasa IV (<i>parC</i>).	41
5.9 Análisis <i>in silico</i> de la subunidad B de la topoisomerasa IV (<i>parE</i>).	43
5.10 Análisis <i>in silico</i> de la subunidad β de la RNA polimerasa (<i>rpoB</i>).	46
5.11 Análisis <i>in silico</i> del gen <i>rplD</i> ribosomal.	52
5.12 Análisis <i>in silico</i> del gen <i>rRNA16S</i> .	54
5.13 Modelamiento por homología de las regiones determinantes de resistencia antimicrobiana en <i>B. bacilliformis</i> .	58
5.14 Modelamiento de la estructura secundaria de la región conservada del <i>rRNA16S</i> .	63
5.15 Análisis del perfil de hidrofobicidad de las QRDR de GyrA, ParC y ParE de <i>B. bacilliformis</i> .	64
6. DISCUSIÓN	68
6.1 Desarrollo de una prueba de difusión por disco (Kirby-Bauer), CIM (prueba ϵ) y análisis de la susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de <i>B. bacilliformis</i> .	68

6.2 Análisis de genes relacionados con resistencia antimicrobiana estudiados en los aislados de <i>B. bacilliformis</i> .	70
6.3 Modelamiento y análisis del perfil de hidrofobicidad de las regiones determinantes de resistencia antimicrobiana en los aislados de <i>B. bacilliformis</i> .	77
7. CONCLUSIONES	79
8. RECOMENDACIONES	80
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
10. ANEXOS	89

ABREVIATURAS

AN	Ácido nalidíxico.
AM	Amoxicilina.
ARDB	Base de datos de genes de resistencia a antibióticos.
BHI	Caldo de cultivo infusión cerebro corazón.
Cip	Ciprofloxacina.
CN	Gentamicina.
CL	Cloranfenicol.
CRO	Ceftriaxona
°C	Grados Celsius
CIM	Concentración inhibitoria mínima.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato.
E	Eritromicina.
ERDR	Región determinante de resistencia a eritromicina.
<i>gyrA</i>	Gen de la girasa subunidad A.
GyrA	Proteína girasa subunidad A.
<i>gyrB</i>	Gen de la girasa subunidad B.
GyrB	Proteína girasa subunidad B.
INS	Instituto Nacional de Salud.
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica.
NLS	Solución de lisis nuclear.
MINSA	Ministerio de Salud.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PBS	Buffer fosfato salino.
pb	Pares de bases.
<i>parC</i>	Gen de la topoisomerasa IV subunidad A.
ParC	Proteína topoisomerasa IV subunidad A.
<i>parE</i>	Gen de la topoisomerasa IV subunidad B.
ParE	Proteína topoisomerasa IV subunidad B.
PDB	Base de datos de proteínas.
QRDR	Región determinante de resistencia a quinolonas.
RD	Rifampicina.
RNA	Ácido ribonucleico.

RRDR	Región determinante de resistencia a rifampicina.
<i>rlpD</i>	Gen de la proteína ribosomal L4.
rpm	Revoluciones por minuto.
<i>rpoB</i>	Gen de la subunidad β de la RNA polimerasa.
RpoB	Proteína subunidad β de la RNA polimerasa.
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal.
TAE	Tris-acetato-EDTA.
μM	Micromolar.
μg	Microgramos.
μl	Microlitros.
μm	micrómetros.
VPN	Valor predictivo negativo.
%	Porcentaje.

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Enfermedad de Carrión según departamentos en el Perú.	4
Figura 2: Forma eruptiva de la Enfermedad de Carrión.	5
Figura 3: Blancos de antibióticos en bacterias Gram positivas y Gram negativas.	7
Figura 4: Mecanismos moleculares de resistencia a antibióticos en <i>Bartonella</i> spp.	11
Figura 5: Prueba Épsilon con concentraciones crecientes.	18
Figura 6: Crecimiento en placa de <i>B. bacilliformis</i> .	26
Figura 7: Crecimiento en medio bifásico de <i>B. bacilliformis</i> .	27
Figura 8: Amplificados del gen <i>lalB</i> para la identificación de la especie <i>B. bacilliformis</i> .	28
Figura 9: Desarrollo de un antibiograma para determinar la susceptibilidad antimicrobiana con antibiótico gentamicina.	29
Figura 10: Desarrollo de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana Con discos de ciprofloxacina.	30
Figura 11: Desarrollo de la prueba de Concentración Inhibitoria Mínima con tiras de gradiente de concentración de ciprofloxacina	31
Figura 12: Crecimiento de <i>B. bacilliformis</i> en placa con el antibiótico ácido nalidíxico.	32
Figura 13: Amplificados de una fracción del gen <i>gyrA</i> de las cepas aisladas en el estudio.	34
Figura 14: Amplificación de fracciones de los genes: <i>gyrB</i> y <i>rpoB</i> de las cepas aisladas en este estudio.	34
Figura 15: Amplificados de fracciones de los genes: <i>parC</i> y <i>parE</i> de las cepas aisladas en este estudio.	35
Figura 16: Amplificación de una fracción del gen 16S rRNA de las cepas aisladas en este estudio.	35
Figura 17: Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de <i>gyrA</i> de <i>B. bacilliformis</i> KC 583 y las aisladas.	36

Figura 18: Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de GyrA de <i>B. bacilliformis</i> y las aisladas.	37
Figura 19: Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de <i>gyrB</i> de <i>B. bacilliformis</i> KC 583 y las aisladas.	38
Figura 20: Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de GyrB de <i>B. bacilliformis</i> KC 583 y las aisladas.	40
Figura 21: Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de <i>parC</i> de <i>B. bacilliformis</i> KC 583 y las aisladas.	41
Figura 22: Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de <i>parC</i> de <i>B. bacilliformis</i> KC 583 y las aisladas.	42
Figura 23: Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de <i>parE</i> de <i>B. bacilliformis</i> KC583 y las aisladas.	43
Figura 24: Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de ParE de <i>B. bacilliformis</i> KC583 y las aisladas.	45
Figura 25: Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de <i>rpoB</i> de <i>B. bacilliformis</i> KC583 y las aisladas.	49
Figura 26: Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de RpoB de <i>B. bacilliformis</i> KC583 y las aisladas.	51
Figura 27: Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de <i>rplD</i> de <i>B. bacilliformis</i> KC583 y las aisladas.	52
Figura 28: Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de L4 de <i>B. bacilliformis</i> KC583 y las aisladas.	53
Figura 29: Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de <i>rRNA</i> 16S de <i>B. bacilliformis</i> KC583 y las de aisladas.	57
Figura 30: Modelamiento de la estructura terciaria del QRDR de GyrA.	58
Figura 31: Modelamiento de la estructura terciaria del QRDR de GyrB.	59
Figura 32: Modelamiento de la estructura terciaria del QRDR de ParC.	60
Figura 33: Modelamiento de la estructura terciaria del QRDR de ParE.	61
Figura 34: Modelamiento de la estructura terciaria de la proteína L4 ribosomal.	62

Figura 35: Modelo de la estructura secundaria de <i>rRNA</i> 16S de la región altamente conservada.	63
Figura 36: Perfil de hidrofobicidad de la región QRDR de GyrA.	65
Figura 37: Perfil de hidrofobicidad de la región QRDR de ParC.	66
Figura 38: Perfil de hidrofobicidad de la región QRDR de ParE.	67

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Concentración inhibitoria mínima de cepas de <i>B. bacilliformis</i> mediante la técnica de dilución en agar.	9
Tabla 2: Protocolo de trabajo para la PCR.	16
Tabla 3: Cepas de <i>B. bacilliformis</i> aisladas para el desarrollo del antibiograma.	18
Tabla 4: <i>Primers</i> empleados para amplificar las regiones de los genes asociados a la resistencia a antibióticos.	20
Tabla 5: Programa de PCR utilizado para la amplificación de las regiones determinantes de resistencia.	21
Tabla 6: Genes de referencia empleados en el estudio, obtenidos del GenBank.	22
Tabla 7: Números de acceso de las secuencias de las regiones determinantes de resistencia de las cepas aisladas de <i>B. bacilliformis</i> .	25
Tabla 8: Cepas de <i>Bartonella bacilliformis</i> aisladas y su lugar de procedencia.	26
Tabla 9: Efecto de la concentración del inóculo sobre el halo de inhibición con el antibiótico gentamicina.	29
Tabla 10: Efecto de la concentración del inóculo sobre el halo de inhibición con el antibiótico ciprofloxacina.	30
Tabla 11: Efecto de la concentración del inóculo sobre la concentración inhibitoria mínima con el antibiótico ciprofloxacina..	31
Tabla 12: Valores del diámetro del halo de inhibición del crecimiento en milímetros, obtenidos mediante disco difusión en agar para determinar la susceptibilidad antimicrobiana, y valores de la CIM en mg/l mediante la prueba Épsilon de las cepas de <i>B. bacilliformis</i> ensayadas.	33
Tabla 13: Escala de valores de Kyte & Doolittle.	64

RESUMEN

Bartonella bacilliformis, agente causal de la Enfermedad de Carrión transmitida por insectos flebotomíneos del género *Lutzomyia* y otros, es una endemia ancestral que afecta especialmente a la población más pobre de nuestros valles interandinos. En el Perú está presente en 12 de 25 departamentos. Es endémica en Ancash, Cajamarca, Amazonas, Cusco, La Libertad y Piura. Pocas son las investigaciones acerca de la susceptibilidad *in vitro* a antimicrobianos de *Bartonella bacilliformis*, no se cuenta con una prueba estandarizada de antibiograma para esta bacteria, como tampoco se conocen los mecanismos de resistencia ni las secuencias de los genes asociados a dicha resistencia. Por consiguiente, se ha planteado evaluar la resistencia antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Bartonella bacilliformis* aisladas de zonas endémicas, mediante métodos convencionales y métodos moleculares, con la finalidad de conocer la resistencia a drogas de las cepas circulantes en las zonas endémicas.

En el presente trabajo se obtuvieron muestras sanguíneas de 47 pacientes procedentes de Piura, Cusco y Ancash las cuales se sembraron en placas de agar sangre e incubaron a 30°C con 5% CO₂. Se ha estandarizado un método de difusión por disco (para el antibiograma) y la prueba de Épsilon (para determinar la concentración mínima inhibitoria) para el estudio *in vitro* de la susceptibilidad antimicrobiana de *B. bacilliformis*, empleando los aislados clínicos y una cepa del Instituto Pasteur de Francia. Luego se procedió a extraer el DNA genómico, amplificar los genes mencionados, secuenciarlos y analizarlos mediante herramientas bioinformáticas.

Se obtuvieron 3 cultivos positivos. Las cepas fueron sensibles a la ciprofloxacina, gentamicina, rifampicina, eritromicina, cloranfenicol, ceftriaxona y amoxicilina y resistentes al ácido nalidíxico. Del análisis de las secuencias aminoacídicas de las proteínas de GyrA, GyrB, ParC y ParE de *B. bacilliformis*, asociados a la resistencia de las quinolonas (ciprofloxacina, ácido nalidíxico) se concluye que presentan diferencias aminoacídicas de Ser por Ala, en comparación con las secuencias de las proteínas respectivas de *E. coli* K12 MG1655. Esta diferencia probablemente confiera resistencia al ácido nalidíxico pero no a la ciprofloxacina en *B. bacilliformis*. Se determinó que las QRDR de las proteínas GyrA, GyrB, ParC y ParE de *B. bacilliformis* están comprendidas entre los aminoácidos 74 a 124, 428

a 426, 67 a 118, y 473 a 530, respectivamente. Para el antibiótico rifampicina se determinó la RRDR en el gen *rpoB* comprendida entre los aminoácidos 521 a 547, y para el gen *rplD* de la proteína L4 relacionado con resistencia a eritromicina reportamos la ERDR nunca antes mencionado y comprende los aminoácidos 60 a 79, siendo el primer reporte para este gen en *Bartonella bacilliformis*. Finalmente en el modelamiento de las estructuras terciarias de las regiones determinantes de resistencia se apreciaron cambios en las posiciones de Ser por Ala, y estos cambios permiten una débil interacción con la droga. Al evaluar los perfiles de hidrofobicidad de los aminoácidos pertenecientes a la región determinante de resistencia, nos permitió inferir que los cambios de aminoácidos con propiedades diferentes como Ser por Ala contribuyen a la resistencia.

Palabras Claves: región determinante de resistencia; quinolonas; genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, *rpoB*, *rplD*; resistencia antimicrobiana.

ABSTRACT

Bartonella bacilliformis, the causal agent of Carrion's disease, is transmitted by sandflies *Lutzomyia*. In Peru it is an ancestral endemic disease and we can find it in twelve of twenty five departments. It is endemic in Ancash, Cajamarca, Amazonas, Cusco La Libertad and Piura. There are very few investigations about the *in vitro* antimicrobial susceptibility of *Bartonella bacilliformis* and there is no standardized antibiogram test for this bacteria. The resistance mechanisms or the sequences of the genes associated with this resistance are not known, for this reason we proposed to evaluate the *in vitro* antimicrobial resistance in *Bartonella bacilliformis* strains isolated from endemic areas, by conventional and molecular methods, with the purpose of knowing drug resistance strains in endemic areas. We obtained 47 blood samples from Piura, Cusco and Ancash patients, which were streaked on blood agar and incubated at 30° C with 5% CO₂. A method of disk diffusion (for susceptibility testing) and Epsilon test (to determine the minimum inhibitory concentration) are standardized for the *in vitro* study of the antimicrobial susceptibility of *B. bacilliformis* using the clinical isolates and as a control one strain of Pasteur Institute, France. We extracted the genomic DNA, amplifying the genes, sequence them and analyzed using bioinformatics tools. Three positive cultures were obtained. The strains were sensitive to ciprofloxacin, gentamicin, rifampicin, erythromycin, chloramphenicol, ceftriaxone and amoxicillin and they were resistant to nalidixic acid. Analysing the amino acid sequences as associated with quinolone resistance GyrA, GyrB, ParC and ParE (ciprofloxacin, nalidixic acid) it is found that amino acid differences presented Ser to Ala, as compared with the sequences of *E. coli* K12 MG1655. This difference would confer resistance to nalidixic acid but not to ciprofloxacin in *B. bacilliformis*. It was determined that the differences GyrA QRDR, GyrB, ParC and ParE *B. bacilliformis* protein are between amino acids 74-124, 428-426, 67-118, and 473-530, respectively. For the RRDR rifampicin was determined in the *rpoB* gene around 521-547 amino acids positions, and for *rplD* gene of protein L4 related erythromycin resistance never report the ERDR, between amino acids 60 and 79, being the first report for this gene in *Bartonella bacilliformis*. Finally modeling the tertiary structures of the resistance determining regions changes in the positions of Ser for Ala were noted and these changes allow a weak interaction with the drug.

In evaluating the hydrophobicity profiles of amino acids belonging to the resistance determining region, allowed us to infer that the amino acid changes with different properties as Ser by Ala contributes to resistance.

Key words: resistance determinate region; quinolone; genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, *rpoB*, *rplD*; antimicrobial resistance.

1. INTRODUCCIÓN

Bartonella bacilliformis fue descrita en 1909 por Alberto Barton. Es un bacilo gram negativo, pleomórfico, intracelular de 0.2-0.5 por 1-2 μm , aeróbico, no fermentativo, con 2 a 16 flagelos lofotricos que le confiere alta movilidad (Maurin *et al.*, 1997). Esta bacteria causa la Enfermedad de Carrión (Burstein y Mayta 2007; Pachas, 2001, Amano *et al.*, 1997), una enfermedad endémica ancestral pre-colombina que afecta especialmente a la población más pobre de los valles interandinos del Perú. Esta enfermedad es de notificación obligatoria en el país y sus tasas de incidencia por regiones han variado a lo largo de décadas, con un número elevado de casos en Amazonas, Ancash y Piura en los últimos años (DGE, 2013). El principal vector implicado en la transmisión de *B. bacilliformis* es la hembra del mosquito del género *Lutzomyia*, siendo en el Perú *Lutzomyia verrucarum*, la especie más frecuente encontrada entre los 5° y 13° 13' de latitud sur (Andre *et al.*, 1998).

Se han usado diferentes antibacterianos para tratar infecciones con *B. bacilliformis*, como eritromicina, cloranfenicol y rifampicina, entre otros (MINSA 2006, Rolain *et al.*, 2004). El tratamiento con estas drogas produce rápida desaparición de la bacteria en sangre, sin embargo, se ha reportado persistencia de la bacteremia después de retirar estos antibióticos (Perez *et al.*, 2010; Biswas y Rolain 2010; Rolain *et al.*, 2004; Henriquez *et al.*, 2004).

La ciprofloxacina (Cip), que tiene una buena penetración intracelular, se ha incluido como tratamiento de primera línea en el Perú (MINSA 2006; Tarazona *et al.*, 2006), lo cual ha sido aparentemente exitoso (Maguiña *et al.*, 2001; Rolain *et al.*, 2004), pero existen reportes que después del tratamiento con Cip el 22.6% de los pacientes presentan bacteriemia asintomática crónica (Pachas, 2000). Estudios previos han demostrado *B. bacilliformis* con susceptibilidad disminuida a la Cip también como a otras fluoroquinolonas (Flores, 2008; Dörbecker *et al.*, 2006; Sobraques *et al.*, 1999). Asimismo, se ha determinado que las fluoroquinolonas usadas en monoterapias pueden ser inefectivas porque se han aislado fácilmente *B. bacilliformis* resistentes a Cip *in vitro* (Biswas *et al.*, 2007).

Recientemente se ha determinado que *B. bacilliformis* presenta resistencia constitutiva a quinolonas (Del Valle, 2010), aconsejándose no usar Cip para tratar la bartonelosis. Asimismo, se ha demostrado que existen cepas de *Bartonella bacilliformis* que están adquiriendo resistencia a rifampicina y eritromicina además de Cip (Biswas *et al.*, 2007; Minnick *et al.*, 2003). Maguiña *et al.* (2008) afirma que 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 y controlados para la búsqueda de un mejor tratamiento. Actualmente se están presentando fallas en el tratamiento con Cip como lo señala Guerrero J, (Comunicación verbal) del centro de salud de Huancabamba.

Hay pocas investigaciones acerca de la susceptibilidad a antimicrobianos *in vitro* de *B. bacilliformis*, no existe un antibiograma estandarizado para esta bacteria, tampoco se conocen los mecanismos de resistencia ni las secuencias de los genes asociados a dicha resistencia. En este sentido se ha estudiado la resistencia antimicrobiana *in vitro* de cepas de *B. bacilliformis* aisladas de zonas endémicas del Perú, con métodos convencionales (prueba de difusión de disco en placas, prueba Épsilon para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria) y moleculares (amplificación por PCR y secuenciamiento de las regiones determinantes de resistencia de los genes asociados a ésta) con la finalidad de conocer la resistencia a drogas de las cepas circulantes en las zonas endémicas en estudio y determinar la ocurrencia o no de mutaciones asociadas a dichas resistencias y contribuir a mejorar el tratamiento antibiótico de la Enfermedad de Carrión y la vigilancia de la resistencia a antimicrobianos.

2. ANTECEDENTES

2.1.- *Bartonella bacilliformis*

Es la causante de la enfermedad de Carrión y transmitida por la picadura del mosquito flebótomo del género *Lutzomyia* y es endémica en el Perú, Ecuador y Colombia (Maguiña y Gotuzzo, 2000; MINSA, 1998). La Enfermedad de Carrión se presenta principalmente en valles interandinos ubicados entre 500 y 3200 m.s.n.m de algunas regiones del Perú. Estos valles tienen las condiciones ecológicas propicias para que el vector *Lutzomyia verrucarum* viva y transmita la enfermedad (Cáceres, 1993; Herrero, 1990).

2.2.- Epidemiología de la Enfermedad de Carrión

En el año 2003 se ha notificado la existencia de nuevas áreas endémicas de la Enfermedad de Carrión 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 (Tejada *et al.*, 2003). Esta enfermedad es de notificación obligatoria en el país y sus tasas de incidencia por regiones han variado a lo largo de varias décadas, con un número elevado de casos en Amazonas, Ancash y Piura en los últimos años (DGE, 2013), como se observa en la Figura 1.

DEPARTAMENTOS	AÑOS									
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	
CAJAMARCA	4126	1487	957	738	399	145	286	156	65	
ANCASH	3214	1515	700	503	143	103	115	192	102	
LA LIBERTAD	1787	1450	966	65	1	4	9	10	17	
AMAZONAS	823	378	294	144	66	30	39	116	64	
PIURA	129	76	38	70	71	44	248	62	619	
LIMA	209	224	87	10	2	0	1	0	37	
CUSCO	22	157	36	122	28	5	3	6	8	
HUANUCO	195	36	19	6	3	1	4	1	0	
AYACUCHO	0	124	83	6	4	3	2	10	12	
PUNO	0	51	32	1	0	0	0	0	0	
LAMBAYEQUE	6	22	9	8	0	1	5	8	0	
LORETO	0	26	5	0	0	0	0	0	0	
SAN MARTIN	6	8	5	1	4	0	0	0	3	
JUNIN	0	8	1	0	0	0	0	0	1	
PASCO	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
MADRE DE DIOS	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
APURIMAC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
TACNA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CALLAO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ICA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
AREQUIPA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
UCAYALI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
HUANCAVELICA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MOQUEGUA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
TUMBES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total general	10517	5562	3233	1675	721	336	712	561	928	

Figura 1. Enfermedad de Carrión según departamentos en el Perú: años 2005 -2013

[Fuente: Red Nacional de Epidemiología (RENACE) – DGE, 2013].

2.3 Características clínicas

Existen dos fases clínicas bien diferenciadas de esta enfermedad: la fase aguda o anémica caracterizada por anemia hemolítica y la fase crónica caracterizada por la presencia de verrugas, la primera puede ser mortal si no es tratada a tiempo (Maguiña *et al.*, 2001).

a) Fase anémica

Es la forma de presentación más grave, tiene un período de incubación promedio de 61 días (rango de 10-210) (Maguiña y Gotuzzo, 2000). Los síntomas más frecuentes son: fiebre, malestar general, escalofríos leves, mialgias, artralgias, cefalea, náuseas, vómitos, palidez, ictericia (Maguiña, 1993).

b) Fase eruptiva

Se observa generalmente en niños que viven en áreas endémicas; sin embargo, mientras que en algunas zonas es la principal forma clínica de presentación, con baja letalidad, ejemplo Callejón de Huaylas y Conchucos en Ancash y en la provincia de Manabi en el Ecuador, en otras áreas predomina la forma anémica con alta letalidad y muy pocos casos de la forma eruptiva como lo muestra la Figura 2. Durante el brote en las provincias de La Convención y Urubamba en Cusco no se observó la fase eruptiva en ningún paciente hasta seis meses después de haber sufrido la fase aguda. Aunque no se encontró diferencia en el secuenciamiento del gen de la citrato sintetasa de *B. bacilliformis* no se descarta la posibilidad de que exista variación genética con cepas aisladas de otras regiones (Ellis *et al.*, 1999).



Figura 2. Forma eruptiva de la enfermedad de Carrion.
[Fuente: Minnick; Battisti JM. 2009].

2.4 Diagnóstico

Los métodos de diagnóstico actualmente utilizados tienen muchas limitaciones. El frotis de sangre periférica es un método sencillo y de bajo costo pero tiene el inconveniente que es poco sensible (Ellis *et al.*, 1999) y depende principalmente de dos factores: una buena toma de muestra y de personal debidamente capacitado para la lectura del frotis. El diagnóstico por cultivo es más sensible que el frotis, pero se necesita mayor infraestructura y tecnología; requiere de la preparación de medios de cultivo muy enriquecidos, que fácilmente se

contaminan, ambientes especiales como cámara de flujo laminar para realizar la siembra, una temperatura de incubación de 28°C, períodos de incubación prolongados hasta por ocho semanas (Pachas, 2001). El diagnóstico serológico por ELISA desarrollado por Knobloch (1988) necesita la preparación de un antígeno altamente purificado (Malqui *et al.*, 2000). Asimismo, el ELISA indirecto del lisado total de *B. bacilliformis* para el diagnóstico rápido de la Enfermedad de Carrión en donde no mostró que fuese una herramienta diagnóstica, a pesar de su aceptable especificidad (94,1%), presentó una baja sensibilidad (68,6 %) y VPN (64,0 %) (Anaya *et al.*, 2008).

2.5 Tratamiento de la Enfermedad de Carrión

El tratamiento 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 la concentración mínima inhibitoria (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 intracelular y extracelular de *Bartonella*, el tratamiento consiste en usar 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 quinolona (Vega y Ariza, 2008) y el uso de ciprofloxacina es de gran utilidad.

Para la fase aguda grave de la enfermedad de Carrión, se utiliza como primera línea ciprofloxacina más ceftriaxona o ceftriaxona más cloranfenicol. Para la fase crónica eruptiva, el tratamiento de primera línea en todos los casos es azitromicina a una dosis de 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).

2.6 Resistencia a antibióticos y genes asociados

Aunque un gran número de antibióticos se utilizan clínicamente, las dianas que inhiben son limitadas, y estos se clasifican sobre la base de su estructura y modo de acción. Las principales clases de antibióticos inhiben cuatro blancos clásicos (Figura 3) que son la síntesis de: pared celular, proteínas, DNA, RNA y folato (Walsh, 2003).

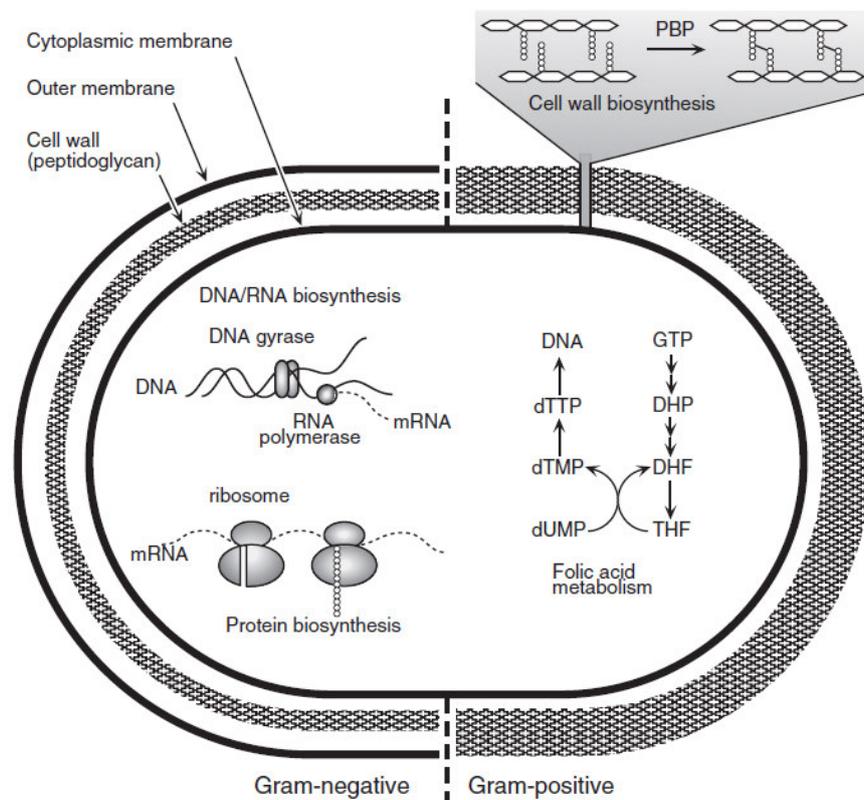


Figura 3. Blancos de antibióticos en bacterias Gram positivas y Gram negativas.

[Fuente: Hiroshi y Katsumata, 2006].

Se ha demostrado mediante estudios *in vitro* la sensibilidad de *B. bacilliformis* a los antibióticos utilizando como medio de cultivo agar Columbia enriquecido con 10% de sangre de caballo, con antibióticos diluidos a diferentes concentraciones, determinando que las cuatro cepas utilizadas de *B. bacilliformis* KC583 (ATCC 35685), KC584 (ATCC 35686), Acochaca y Monzón (cepas peruanas) tienen un patrón homogéneo de alta sensibilidad a muchos antibióticos beta lactámicos (excepto para oxacilina, cefalotina y cefotetan), aminoglucósidos, cloranfenicol, macrólidos, doxiciclina, cotrimoxazol, rifampicina y vancomicina. Entre las quinolonas ciprofloxacina y sparfloxacina son las más efectivas. Clindamicina y colistina tienen poca efectividad en inhibir el crecimiento de *B. bacilliformis* como se muestra en la Tabla 1 (Sobraques *et al.*, 1999).

Otros estudios han demostrado la sensibilidad de otras especies de *Bartonella* patógenas para el humano a los macrólidos (Ives *et al.*, 1997) y a otros antibióticos (Maurin *et al.*, 1995). Los resultados de susceptibilidad de las otras *Bartonellas* comparados con la susceptibilidad de *B. bacilliformis* son muy similares.

Tabla 1. Concentración Inhibitoria Mínima de cepas de *B. bacilliformis* mediante la técnica de dilución en agar, con Agar Columbia.

Antibióticos	CIM ($\mu\text{g/ml}$) de cepas de <i>B. bacilliformis</i>			
	ATCC 35685	ATCC 35686	Acochacha 812	Monzon 269
Penicilina G	0.015	0.015	0.03	0.03
Oxacilina	0.5	0.25	0.5	0.5
Amoxicilina	0.03	0.03	0.06	0.06
Amoxicilina-clavulanato	0.03-0.003	0.03-0.003	0.06-0.006	0.06-0.006
Ticarcilina	0.06	0.06	0.12	0.12
Cefalotina	8	4	8	8
Cefotetan	2	2	2	2
Cefotaxima	0.06	0.03	0.12	0.12
Ceftriaxona	0.003	0.003	0.006	0.003
Ceftazidima	0.25	0.12	0.25	0.25
Imipenem	1	0.5	1	1
Streptomina	4	4	4	4
Gentamicina	1	1	2	2
Tobramicina	2	2	4	4
Amikacina	4	2	8	4
Eritromicina	0.06	0.06	0.06	0.06
Azitromicina	0.015	0.015	0.015	0.015
Claritromicina	0.03	0.015	0.03	0.015
Roxitromicina	0.03	0.03	0.03	0.03
Clindamicina	64	32	64	64
Doxiciclina	0.03	0.03	0.03	0.06
Pefloxacina	2	2	2	1
Ciprofloxacina	0.25	0.5	0.5	0.5
Sparfloxacina	0.25	0.25	0.25	0.25
Tianfenicol	0.25	0.25	0.25	0.25
Trimetoprim-sulfametoxazol	0.8-4	0.8-2	0.8-4	0.4-2
Rifampina	0.003	0.003	0.003	0.003
Fosfomicina	16	8	16	16
Colistina	16	16	16	16
Vancomicina	8	4	8	8

[Fuente: Sobraques *et al.*, 1999]

La resistencia a las fluoroquinolonas está asociada con mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* (Figura 4.D). Se ha reportado que las especies de *Bartonella* presentan una mutación natural en la posición 83 (numeración de *E. coli*) (Del Valle *et al.*, 2010; Angelakis *et al.*, 2008; Biswas *et al.*, 2008). Esta mutación natural en la posición 83 puede explicar la heterogeneidad de susceptibilidad a fluoroquinolonas reportados en otras bacterias intracelulares tales como *Tropheryma whippelii* y bacterias del género *Brucella* (Angelakis *et al.*, 2008; Rolain *et al.*, 2004). En las pruebas de susceptibilidad *in vitro* de 31 cepas de *Bartonella spp.* las fluoroquinolonas fueron los antimicrobianos más potentes (Dörbecker *et al.*, 2006).

Además, estudios previos han demostrado una susceptibilidad disminuida de *B. bacilliformis* a la Cip, también como a otras fluoroquinolonas (Quispe, 2009; Flores 2008, Dörbecker *et al.*, 2006, Sobraques *et al.*, 1999). Asimismo, se ha determinado que las fluoroquinolonas usadas en monoterapias pueden ser inefectivas porque se han aislado fácilmente *B. bacilliformis* resistentes a Cip *in vitro* (Biswas *et al.*, 2007). Recientemente, se ha determinado que *B. bacilliformis* presenta resistencia constitutiva a la quinolona ácido nalidíxico (Nal) (Del Valle *et al.*, 2010; Quispe 2009).

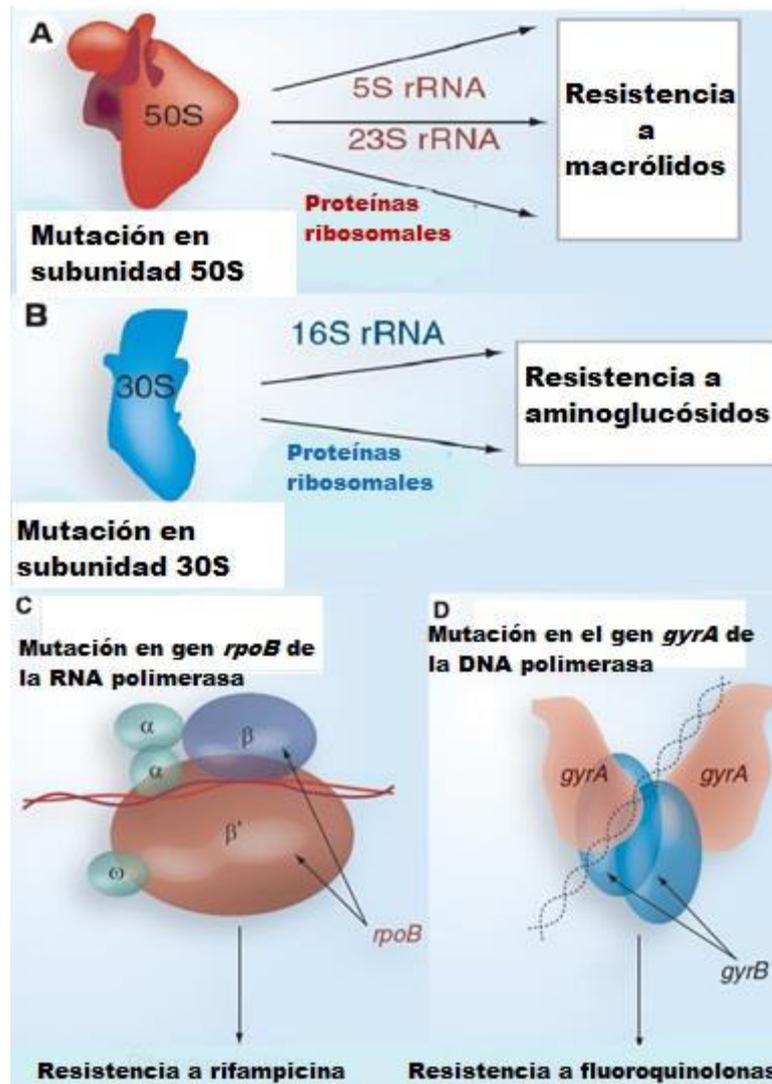


Figura 4. Mecanismos moleculares de resistencia a antibióticos en *Bartonella* spp. (A) Resistencia de macrólidos debido a cambios en la subunidad ribosomal 50S. (B) Resistencia de aminoglucósidos debido a cambios en la subunidad ribosomal 30S. (C) Resistencia de rifampicina debido a cambios en el gen *rpoB*. (D) Resistencia de fluoroquinolonas debido a cambios en el gen *gyrA*.

[Fuente: Biswas y Rolain, 2010]

El cloranfenicol es efectivo, pero no en todos los pacientes con la Enfermedad de Carrión, las fallas terapéuticas y la persistencia de la bacteriemia han sido reportadas sin eliminar el riesgo del paciente en desarrollar la fase verrucosa de esta infección (Rolain *et al.*, 2004).

La resistencia a eritromicina está asociada a los genes: *rRNA* 23S y los de las proteínas ribosomales de la subunidad 50S (Figura 4.A). Por estudios *in vitro* para *B. quintana* luego de 16 pasajes con el antibiótico, se encontró una inserción de 27 bases nucleotídicas lo que resulta en la inserción de 9 aminoácidos repetidos comprendidos entre R71 y A72 para la proteína L4 ribosomal (Meghari *et al.*, 2006). Para *B. henselae* se han reportado varias mutaciones en el gen que codifica el *rRNA* 23S (A2058G, A2058C y C2611T) y en la proteína L4 en donde se han encontrado mutaciones de aminoácidos G71R y H75Y cuyo fenotipo resultó eritromicina resistente (Biswas *et al.*, 2006).

La resistencia a gentamicina está asociada a los genes: *rRNA* 16S y los genes de las proteínas ribosomales 30S (Figura 4.B). Por estudios *in vitro* para *B. henselae* se obtuvo un mutante resistente a gentamicina luego de 9 subcultivos con el antibiótico gentamicina; caracterizando el gen *rRNA* 16S se encontró una mutación de G por A en la posición 1408 (Numeración de *E. coli* K-12 MG1655). Aunque se obtuvo un mutante resistente *in vitro* después de 9 pasajes, lo que sugiere que la selección de tales cepas resistentes a gentamicina no es probable que se produzca *in vivo* (Biswas *et al.*, 2008). Esta mutación también se ha reportado en aislados clínicos para otras bacterias (Pfister, 2003; Mingeot, 1999; Rchet, 1999; Davies y Wright, 1997).

La resistencia a rifampicina está asociada al gen *rpoB* (subunidad Beta de la RNA polimerasa) (Figura 4.C). Por estudios *in vitro* en *B. bacilliformis* (Biswas *et al.*, 2007) y *B. quintana* (Biswas *et al.*, 2009a) se han obtenido cepas resistentes a rifampicina, mostrando una mutación en la posición 531 (Ser→Phe), este mismo aminoácido es uno de los más frecuentemente mutados en cepas resistentes a este mismo antibiótico en otras especies bacterianas como *Mycobacterium tuberculosis* (Yam *et al.*, 2004; Telenti *et al.*, 1993).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

En base a que algunas cepas de *Bartonella bacilliformis* aisladas en zonas endémicas del Perú, presentan susceptibilidad disminuida a algunos fármacos como la ciprofloxacina; se postula la existencia de mutaciones nucleotídicas en las regiones de los genes asociados a la resistencia antimicrobiana.

3.2 OBJETIVOS

Objetivos General.

- Caracterizar las regiones determinantes de los genes asociados a resistencia antimicrobiana de cepas *Bartonella bacilliformis* aisladas de zonas endémicas.

Objetivos Específicos.

- Aislar cepas de *Bartonella bacilliformis* de casos clínicos de las zonas endémicas.
- Evaluar la susceptibilidad antimicrobiana mediante la prueba de difusión en disco (Kirby-Bauer) de las cepas aisladas.
- Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima por la prueba Épsilon.
- Identificar las regiones de aminoácidos que comprenden las regiones determinantes de resistencia en *B. bacilliformis*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de estudio

Se realizaron muestreos en las siguientes zonas endémicas de la Enfermedad de Carrión (MINSA, 2009):

- a) Sondor, Sondorrillo, Carmen de la Frontera pertenecientes a la provincia de Huancabamba, departamento de Piura.
- b) Caraz, departamento de Ancash.
- c) Cuzco.

Se colectaron 47 muestras de sangre venosa en tubos al vacío con anticoagulante a personas con síntomas de la enfermedad según su historia clínica.

Declaración de Ética

El estudio fue aprobado bajo los lineamientos del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Biológica de la UNMSM. Todos los pacientes o adultos responsables firmaron por escrito el consentimiento informado para la toma de muestra de sangre y su posterior análisis para fines de investigación.

Criterios de inclusión para la toma de muestra

- Pacientes con diagnóstico presuntivo de Enfermedad de Carrión sobre la base de la coloración Giemsa del frotis sanguíneo, antes de iniciar el tratamiento, o con tratamiento en proceso o con tratamiento finalizado.
- Pacientes con diagnóstico confirmativo a la Enfermedad de Carrión sobre la base de hemocultivos positivos, antes de iniciar el tratamiento, o con tratamiento en proceso o con tratamiento finalizado.

4.2 Aislamiento de cepas

Para el aislamiento de *B. bacilliformis* a partir de sangre de pacientes, se emplearon placas de agar Columbia suplementado con 5% de glóbulos rojos de carnero y 2% de suero bovino fetal, así como tubos con medio bifásico compuestos por una fase sólida del medio de cultivo ya descrito y una fase líquida de caldo infusión cerebro corazón (BHI) (Coleman y Minnick, 2003; Colichón y De

Bedon, 1973). Las placas se sembraron por diseminación con 200 µl de sangre del paciente y los tubos con medio bifásico con la adición de 800 a 1000 µl de sangre, siguiendo con la metodología de Quispe (2009). Los cultivos se incubaron a 30°C con 5% de CO₂ a una humedad relativa de 100% (Quispe, 2009; Minnick *et al.*, 2003) por seis a ocho días hasta su crecimiento. Los subcultivos y los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron en agar Columbia suplementado con 8% de glóbulos rojos de carnero.

4.3 Extracción de DNA genómico:

La extracción del DNA genómico de las cepas de *B. bacilliformis* proveniente de cultivos en placas, se realizó usando el kit Miniprep de Wizard Genomic Purification (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante que incluye 6 pasos:

Lavado del paquete celular: Se hicieron 3 lavados de las células bacterianas con agua de grado molecular para eliminar restos de medio de cultivo, centrifugando a 13000 rpm por 2 minutos y descartando el sobrenadante.

Lisis Nuclear y acción de la RNAsa: Al pellet bacteriano se adicionó 600 µl de la solución de lisis nuclear (NSL) incubando a 80°C por 5 minutos, luego se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos para adicionar 3 µl de RNasa (4mg/ml) y se incubó a 37°C por 1 hora.

Precipitación de proteínas: se agregaron 200 µl de solución de precipitación de proteínas (PPS) al lisado tratado con RNasa, se homogeneizó vigorosamente por 20 segundos e incubó por 5 minutos en hielo. Luego se centrifugó a 13000 rpm por 3 minutos colocando el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.

Precipitación de DNA: Al tubo de microcentrifuga con el sobrenadante, se adicionaron 600 µl de isopropanol absoluto mezclando suavemente por inversión, hasta formar una masa visible de DNA, para luego centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos, eliminando el sobrenadante cuidadosamente y escurriendo el tubo en papel absorbente limpio.

Lavado del DNA: Al tubo que contenía el sedimento de DNA se adicionaron 600 µl de etanol al 70%, invirtiendo suavemente el tubo varias veces para lavar el sedimento, luego se centrifugó a 13000 rpm por 2 minutos eliminando el sobrenadante cuidadosamente y dejando secar el tubo de 10 a 15 minutos.

Hidratación del DNA: El DNA fue rehidratado con 100 µl de solución de rehidratación de DNA por incubación a 65°C por 1 hora, periódicamente se golpeaba el tubo suavemente para mezclar la solución. Finalmente se guardó a -20°C hasta su uso.

4.4 Confirmación de la identificación de *B. bacilliformis* por PCR

La amplificación por PCR del gen *ialB* de *B. bacilliformis* se realizó para confirmar la especie (Flores, 2008; Mitchell y Minnick 1995), utilizando el siguiente protocolo de PCR (Tabla 2) y fue el mismo para todos los genes en estudio.

Tabla 2. Protocolo de trabajo para la PCR.

Componentes	Volumen (µl)
Buffer PCR 10X	5
Oligonucleótido directo (10µM)	1.5
Oligonucleótido reverso (10µM)	1.5
MgSO ₄ (25mM)	3
dNTPs (2mM)	5
DNA molde	1
Taq polimerasa(1U/µL)	1.5
Agua de grado molecular	31.5
Volumen Final	50

4.5 Electroforesis en gel de agarosa:

Para visualizar el DNA y los productos de amplificación las muestras se mezclaron con solución de carga 6X Novagen® y se utilizaron geles de agarosa al 1% en buffer TAE 0.5X. Se utilizó los siguientes marcadores de tamaño molecular: Perfect DNA™ 100 bp Ladder Novagen®, 1Kb DNA Ladder Promega, Perfect DNA™ Markers, 0.1 – 12 Kbp Novagen®, Perfect DNA™ 50 bp Ladder (Novagen®). Luego de la electroforesis los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), por 45 segundos, para visualizarlos en el transluminador.

4.6 Estandarización del método de Kirby-Bauer para determinar la susceptibilidad antimicrobiana en *B. bacilliformis*.

Se empleó la técnica de Kirby-Bauer (CLSI 2011; Perilla *et al.*, 2003; Restrepo *et al.*, 2002) o ensayos de difusión en disco. Los cultivos de *B. bacilliformis* aislados de pacientes y la cepa del Instituto Pasteur de Francia CIP57.17, se resuspendieron en un volumen de 3 ml de solución salina fisiológica a pH 7.2 a una concentración celular equivalente a las escalas de 0.5, 1 y 2 de McFarland.

Cada tubo estándar de McFarland fue agitado antes de ser comparado en forma visual con el inóculo. Se inoculó un volumen de 1.5 ml de la suspensión celular en las placas, homogeneizando el contenido, el exceso fue aspirado con una micropipeta para permitir el secado de la placa, siguiendo la técnica de Pendle *et al.* (2006) que fue realizada para *B. henselae*. Luego, se procedió a colocar el disco de antibiótico y se incubó a 30°C con 5% de CO₂ a una humedad relativa de 100%. La evaluación del crecimiento e inhibición bacteriana en las placas se realizaron desde el día 5 hasta el 12. Para la susceptibilidad bacteriana se emplearon los siguientes antimicrobianos: discos de ciprofloxacina (5 µg), rifampicina (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (15 µg), ácido nalidíxico (30 µg) ceftriaxona (30 µg), amoxicilina (30 µg), y cloranfenicol (30 µg).

4.7 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria en *B. bacilliformis*

Se determinó mediante la prueba Épsilon (E-test) (M.I.C.E., Oxoid), que es un método cuantitativo basado en gradiente de antibiótico. Se realizó según Pendle *et al.*, (2006), siguiendo las instrucciones del fabricante. El método del Etest permite mediante lectura directa determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) de cada antibiótico que en un período predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* del inóculo bacteriano ensayado.

Para cada cepa de *B. bacilliformis* se emplearon 9 placas de agar sangre preparadas de igual manera que para el antibiograma, a cada una de las cuales se le colocó una de las tiras de E-test (tiras plásticas no porosas que tienen impregnado un gradiente de concentración de un antibiótico dado equivalente a 15 diluciones), como se muestra en la Figura 5.

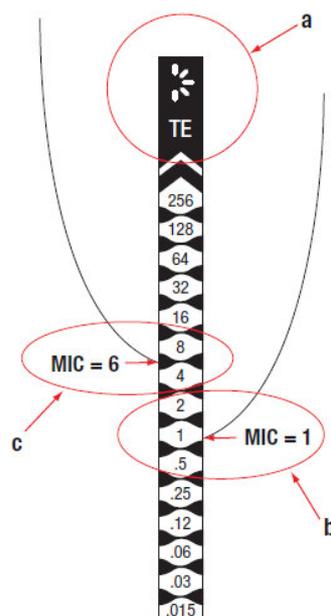


Figura 5. Prueba Épsilon con concentraciones crecientes: Si el crecimiento toca la tira en la sección blanca, la CIM se lee como el valor de esa sección (b), si el crecimiento toca la tira en la sección negra se lee como el valor en la siguiente sección blanca por encima de donde el crecimiento ha finalizado (c) y si hay crecimiento a lo largo de toda la tira (ausencia de inhibición), la CIM debe leerse el más alto valor en la tira (a). Si se obtiene una gran zona de inhibición y el crecimiento del microorganismo no interacciona con la tira, la CIM debe leerse el más bajo valor de la tira. Fuente: www.oxid.com

4.8 Cepas de *B. bacilliformis* con las que se ha trabajado para la estandarización del antibiograma:

Se ha trabajado con los aislados clínicos y con una cepa del Instituto Pasteur de Francia (control positivo) como se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. Cepas de *B. bacilliformis* aisladas para el desarrollo del antibiograma.

Código de cepas	Procedencia	Año
CIP 57.17	Instituto Pasteur de Francia.	
USM-LMMB-005	Sondor – Piura.	2010
USM-LMMB-006	Quillabamba-Cuzco	2011
USM-LMMB-007	Carmen de la Frontera- Piura.	2011

USM-LMMB: Universidad San Marcos - Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología.

4.9 Diseño de *primers* para la amplificación de las regiones determinantes de resistencia antimicrobiana.

Los *primers* para la amplificación de las regiones determinantes de resistencia a la ciprofloxacina, ácido nalidíxico, rifampicina, gentamicina y eritromicina se enviaron a sintetizar a la empresa Invitrogen sobre la base de las publicaciones de Flores (2008), Biswas *et al.* (2007) y Meghari *et al.* (2006).

En el Laboratorio, se hicieron los estudios bioinformáticos para diseñar los *primers* para la amplificación de la región determinante de resistencia de los genes *gyrA*, *gyrB* y *parE*, asociados a la resistencia a quinolonas y el gen *rpoB*, asociado a la resistencia a rifampicina. Para esto se accedió a la base de datos de genes GenBank, y se accedió al genoma secuenciado de *Bartonella bacilliformis* KC583.

Posteriormente estas secuencias se colocaron a la página de “primer – BLAST” (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome). Una vez que el programa generó diversas opciones de *primers*, se evaluaron con el programa IDT: (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/OligoAnalyzer/>), el cual analiza todas las condiciones necesarias para que dichos *primers* funcionen.

Luego se evaluaron en la web de PCR *in silico* (<http://insilico.ehu.es/PCR/>), que los *primers* diseñados en la investigación funcionen correctamente para enviarse a sintetizar a la empresa Invitrogen. Los *primers* diseñados y los de referencia se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. *Primers* empleados para amplificar las regiones de los genes asociados a la resistencia a antibióticos en la investigación.

Primers	5'	Secuencia	3'	Referencia	Gen	Resistencia
ParCF	TCTTATGCTAAGTGTGCACGGA			Flores, 2008	<i>parC</i>	Quinolonas
ParCR	TACCAACAGCAATCCCTGAAGAA			Flores, 2008	<i>parC</i>	Quinolonas
Ba16SF1	TTCAATATGAGAGTTTGA			Biswas <i>et al.</i> , 2007	<i>rRNA 16S</i>	Aminoglicosidos
Ba16SR1	ACGGCTAACATTCATCGT			Biswas <i>et al.</i> , 2007	<i>rRNA 16S</i>	Aminoglicosidos
Ba16SF2	GAATCCGAGTGTAGAGG			Biswas <i>et al.</i> , 2007	<i>rRNA 16S</i>	Aminoglicosidos
Ba16SR2	AGAAAGGAGGTGATCCAG			Biswas <i>et al.</i> , 2007	<i>rRNA 16S</i>	Aminoglicosidos
BQL4F	ATGGATCTTGTAAATTAGAAC			Meghari <i>et al.</i> , 2006	<i>L4 ribosomal</i>	Macrolidos
BQL4R	TCATTTAAAACGCTCCTCAA			Meghari <i>et al.</i> , 2006	<i>L4 ribosomal</i>	Macrolidos
GyrAF	GACCGATCTTACTCGACTACC			(Este estudio)	<i>gyrA</i>	Quinolonas
GyrAR	ATAAGCAGAACGGACACCAGA			(Este estudio)	<i>gyrA</i>	Quinolonas
GyrBF	TCCGCAGCGCCTTAACACGTC			(Este estudio)	<i>gyrB</i>	Quinolonas
GyrBR	GCACCAGCGATTGCTGCTTGC			(Este estudio)	<i>gyrB</i>	Quinolonas
RpoBF	GAGCCGAAAGGTGGGCGTCC			(Este estudio)	<i>rpoB</i>	Rifampicina
RpoBR	TGGGCTTTCGCCTTTTGGGGT			(Este estudio)	<i>rpoB</i>	Rifampicina
ParEF	GAAGTCGCACGAGAGCGCAA			(Este estudio)	<i>parE</i>	Quinolonas
ParER	AGCGGAACCGTTCTTCCGGT			(Este estudio)	<i>parE</i>	Quinolonas

4.10 Amplificación y secuenciación de los genes relacionados a la resistencia antimicrobiana.

La amplificación se realizó utilizando DNA extraído de las cepas de *B. bacilliformis* de aislados clínicos mediante el programa de PCR que se indica en la Tabla 5, siendo las temperaturas de hibridación las siguientes para cada gen: 42°C (*rRNA16S2*, *L4 ribosomal*); 43°C (*rRNA16S1*); 55°C (*parC*); 57°C (*gyrA*), 58°C (*lalB*); 62°C (*gyrB*, *rpoB*, *parE*).

Tabla 5. Programa de PCR utilizado para la amplificación de las regiones determinantes de resistencia.

	Temperatura	Tiempo	
1.-Denaturación inicial	95°C	3 minutos	
2.-Denaturación	94°C	30 segundos	} 29 ciclos
3.-Hibridación	60°C	30 segundos	
4.-Extension	72°C	30 segundos	
5.-Extensión Final	72°C	7 minutos	
6.-Pausa	4°C	Indeterminado	

Los genes amplificados fueron secuenciados por la empresa MacroGen (<http://www.macrogen.com/eng/index/>), siguiendo sus recomendaciones para el secuenciamiento, detallando su respectiva Temperatura de fusión de los *primers*.

4.11 Obtención de las secuencias de genes relacionados a resistencia antimicrobiana en el GenBank

Se ingresó al GenBank para obtener las secuencias de los genes y proteínas involucrados en resistencia antimicrobiana como se describe en el Tabla 6, para compararlas con nuestras secuencias obtenidas.

Con la secuencias de *E. coli* K-12 MG1655 se obtuvo por alineamiento que aminoácidos comprenden las regiones determinantes de resistencia de los genes en estudio y con la secuencia de *S. pneumoniae* R6 para obtener la numeración de los aminoácidos en el caso de la proteína ribosomal L4.

Tabla 6. Genes de referencia empleados en el estudio con sus respectivos números de acceso en el GenBank.

<i>Bartonella bacilliformis</i> KC583 ATCC 35685						
Nombre	Símbolo	Acceso	Gene ID	Tamaño (pb)	Proteína	N° aa
DNA girasa subunidad A	<i>gyrA</i>	NC_008783.1	4684890	2787	YP_989035.1	928
DNA girasa subunidad B	<i>gyrB</i>	NC_008783.1	4684252	2430	YP_989593.1	809
DNA topoisomerasa IV subunidad A	<i>parC</i>	NC_008783.1	4684170	2238	YP_989154.1	745
DNA Topoisomerasa IV subunidad B	<i>parE</i>	NC_008783.1	4684565	2079	YP_989184.1	692
RNA polimerasa subunidad beta	<i>rpoB</i>	NC_008783.1	4683812	4152	YP_988881.1	1383
50S ribosomal proteína L4	<i>rlpD</i>	NC_008783.1	4683931	621	YP_988998.1	206
16S ribosomal RNA	<i>16SrRNA</i>	NR_074203.1		1472		
<i>Bartonella quintana</i> str. Toulouse						
Nombre	Símbolo	Acceso	Gene ID	Tamaño (pb)	Proteína	N° aa
RNA polimerasa subunidad beta	<i>rpoB</i>	NC_005955.1	2866551	4152	YP_032349.1	1383
50S ribosomal proteína L4	<i>rlpD</i>	NC_005955.1	2866749	621	YP_032445.1	206
<i>Bartonella henselae</i> str. Houston-1						
Nombre	Símbolo	Acceso	Gene ID	Tamaño (pb)	Proteína	N° aa
50S ribosomal proteína L4	<i>rlpD</i>	NC_005956.1	2866002	621	YP_033834.1	206
16S ribosomal RNA	<i>16SrRNA</i>	NR_074335.1		1492		
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6						
Nombre	Símbolo	Acceso	Gene ID	Tamaño (pb)	Proteína	N° aa
50S ribosomal proteína L4	<i>rlpD</i>	NC_003098.1	933169	621	NP_357783.1	207
<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655						
Nombre	Símbolo	Acceso	Gene ID	Tamaño (pb)	Proteína	N° aa
DNA girasa subunidad A	<i>gyrA</i>	NC_000913.2	946614	2628	NP_416734.1	875
DNA girasa subunidad B	<i>gyrB</i>	NC_000913.2	948211	2415	YP_026241.1	804
DNA topoisomerasa IV subunidad A	<i>parC</i>	NC_000913.2	947499	2259	NP_417491.1	752
DNA topoisomerasa IV subunidad B	<i>parE</i>	NC_000913.2	947501	1893	NP_417502.1	630
RNA polimerasa subunidad beta	<i>rpoB</i>	NC_000913.2	948488	4029	NP_418414.1	1342
50S ribosomal proteína L4	<i>rlpD</i>	NC_000913.2	947818	606	NP_417778.1	201
16S ribosomal RNA	<i>16SrRNA</i>	NR_102804.1		1552		

4.12 Análisis *in silico* de las secuencias obtenidas en el estudio.

Una vez obtenidas las secuencias de los amplificadores enviados a MacroGen se procedió a realizar el análisis bioinformático empleando las siguientes herramientas:

4.12.1. Para las secuencias nucleotídicas

- Se analizaron los cromatogramas empleando los programas bioinformáticos: BioEdit 7.0 (Hall T, 1999) y MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011) para evaluarlos y obtener la secuencia consenso. Luego, los alineamientos se analizaron en CLUSTALW 2.1 (Thompson *et al.*, 1994) para determinar las posibles mutaciones en las secuencias y qué nucleótidos podrían estar asociados a la resistencia antimicrobiana.
- Se ingresó a la base de datos de ARDB (Antibiotic Resistance Genes Database <http://ardb.cbcb.umd.edu/>) donde se realizó una búsqueda de genes relacionados a la resistencia con *Bartonella bacilliformis* KC583.
- Para el caso del *rRNA 16S* de los aislados de *B. bacilliformis*, se realizó la predicción de la estructura secundaria de la región que involucra el nucleótido cambiante en resistencia al aminoglucosido gentamicina, mediante el servidor RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>)

4.12.2 Para las secuencias aminoacídicas

- Una vez obtenidas las secuencias de los genes en el paso anterior, se realizó la traducción de aminoácidos empleando el programa MEGA. Estas secuencias fueron alineadas y enviadas al CLUSTALW para analizar las posibles mutaciones en las secuencias aminoacídicas, comparando con las secuencias obtenidas del GenBank. También se les comparó en el servidor Protein Mutant Database (<http://pmd.ddbj.nig.ac.jp/~pmd/pmd.html>)

- Con las secuencias aminoacídicas de *B. bacilliformis* se realizaron los modelamientos para localizar, en la estructura, los aminoácidos involucrados en la resistencia antimicrobiana, para estos modelamientos se empleó el servidor online SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>), luego los datos del servidor fueron enviados en formato .pdb para lo cual se emplearon programas de visualización como Swiss-PdbViewer 4.1.0 y RasMol 2.7.5

- Finalmente los aminoácidos comprendidos dentro de la región determinante de resistencia, se analizaron para determinar el perfil de hidrofobicidad y evaluar cómo influye un cambio de aminoácido por otro mediante el servidor online ProScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) de la Web ExPASy Bioinformatics Resource Portal.

4.13 Ingreso de las secuencias analizadas a la base de datos de secuencias nucleotídicas.

Las secuencias nucleotídicas que se obtuvieron de los aislados clínicos de *B. bacilliformis*, luego de ser analizadas, se ingresaron al archivo europeo de secuencias nucleotídicas ENA (<http://www.ebi.ac.uk/ena/>), la que nos proporcionó los siguientes números de accesos, como se indica en la Tabla 7.

Tabla 7. Números de acceso de las secuencias de las regiones determinantes de resistencia de las cepas aisladas de *B. bacilliformis*.

<i>Bartonella bacilliformis</i> USM-LMBM-005					
Nombre	Símbolo	N° Acceso	Tamaño pb	N° Acceso Proteína	N° aa
DNA girasa Sub unidad A	gyrA	HG424427	698	CDG58271	233
DNA girasa Sub unidad B	gyrB	HG315959	948	CDF77243	316
DNA Topoisomerasa IV Sub unidad A	parC	HG315965	327	CDF77249	109
DNA Topoisomerasa IV Sub unidad B	parE	HG315962	1410	CDF77246	470
RNA polimerasa Sub unidad beta	rpoB	HG328242	2484	CDG24223	828
50S ribosomal proteína L4	rlpD	HG328239	596	CDG24220	198
16S ribosomal RNA	16S rRNA	HG315957	1365		
<i>Bartonella bacilliformis</i> USM-LMBM-006					
Nombre	Símbolo	N° Acceso	Tamaño pb	N° Acceso Proteína	N° aa
DNA girasa Sub unidad A	gyrA	HG424428	672	CDG58272	224
DNA girasa Sub unidad B	gyrB	HG315960	948	CDF77244	316
DNA Topoisomerasa IV Sub unidad A	parC	HG315966	327	CDF77250	109
DNA Topoisomerasa IV Sub unidad B	parE	HG315963	1410	CDF77247	470
RNA polimerasa Sub unidad beta	rpoB	HG328243	2484	CDG24225	828
50S ribosomal proteína L4	rlpD	HG328240	596	CDG24221	198
16S ribosomal RNA	16S rRNA	HG328245	1365		
<i>Bartonella bacilliformis</i> USM-LMBM-007					
Nombre	Símbolo	N° Acceso	Tamaño pb	N° Acceso Proteína	N° aa
DNA girasa Sub unidad A	gyrA	HG424429	698	CDG58273	233
DNA girasa Sub unidad B	gyrB	HG315961	927	CDF77245	309
DNA Topoisomerasa IV Sub unidad A	parC	HG315967	327	CDF77251	109
DNA Topoisomerasa IV Sub unidad B	parE	HG315964	1410	CDF77248	470
RNA polimerasa Sub unidad beta	rpoB	HG328244	2484	CDG24224	828
50S ribosomal proteína L4	rlpD	HG328241	596	CDG24222	198
16S ribosomal RNA	16S rRNA	HG315958	1365		

5. RESULTADOS

5.1 Cultivo de las muestras colectadas.

De los 47 hemocultivos realizados (Tabla 8) a cada uno de los pacientes encontrados en las localidades muestreadas como: Sondor, Sondorillo y Carmen de la Frontera de la provincia de Huancabamba, Piura, y un envío de Cuzco de la localidad de Quillabamba, tres cultivos resultaron positivos (crecimiento de colonias puntiformes y transparentes como se observa en la Figura 6 y 7), dos de Piura a los que se les asignó los códigos USM-LMMB-005, USM-LMMB-007 y el de Cuzco con código USM-LMMB-006 como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 8. Cepas de *Bartonella bacilliformis* aisladas y su lugar de procedencia

Muestreo/ Localidad/ Año	N° de Muestras	Positivas en cultivo	Negativas en Cultivo
1 Sondorillo - Hbba – Piura – 2010	12	1	11
2 Sondor - Hbba – Piura – 2010	8	0	8
3 Caraz - Huaraz – 2011	3	0	3
4 Carmen de la Frontera - Piura – 2011	23	1	22
Quillabamba - Cuzco – 2011	1	1	0

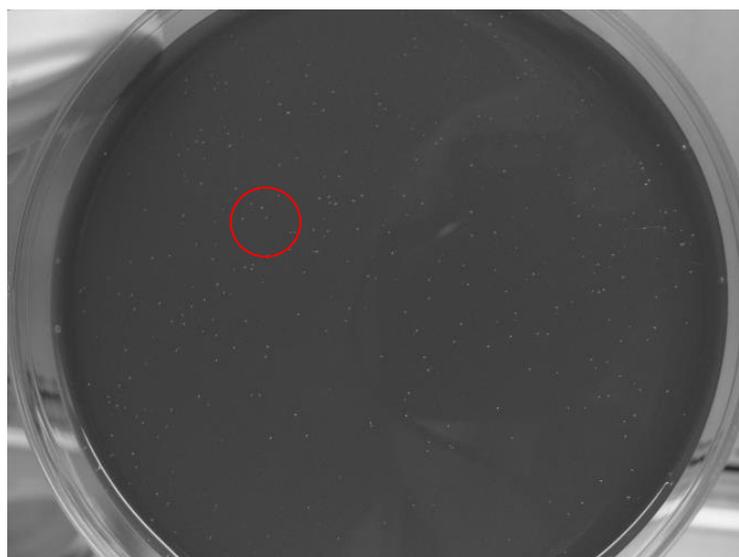


Figura 6. Crecimiento en placa de *B. bacilliformis* de la cepa USM-LMMB-005. Se observan las colonias puntiformes y transparentes.



Figura 7. Crecimiento en medio bifásico de *B. bacilliformis* de la cepa USM-LMMB-007. Se observan las colonias puntiformes y transparentes.

5.2 Confirmación de la especie de *Bartonella bacilliformis* mediante amplificación del gen *ialB* por PCR

Luego del crecimiento se procedió a la extracción de DNA para amplificar 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 amplificado del gen *ialB* con un tamaño de 558 pb en todas las cepas analizadas (Figura 8).

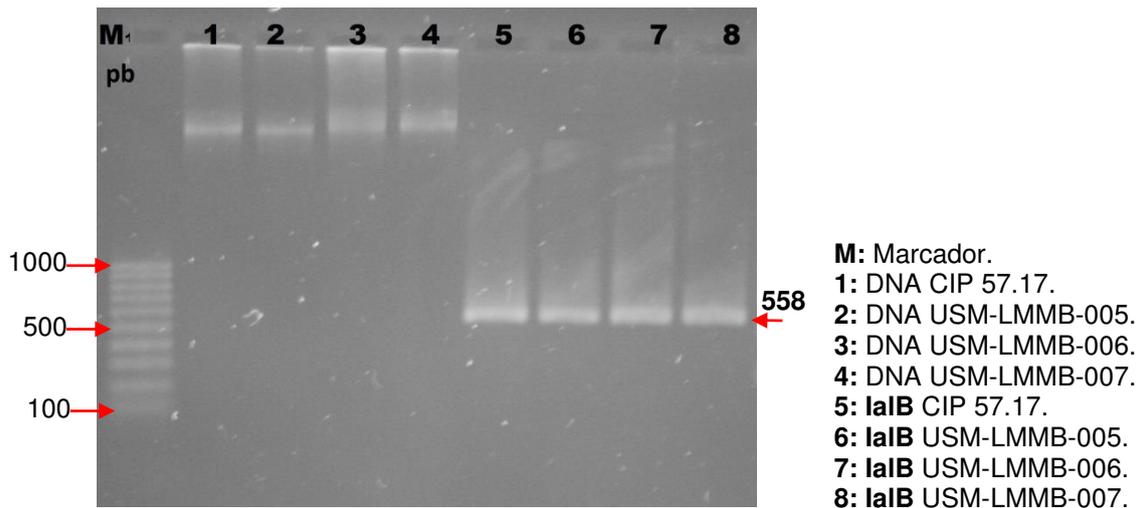


Figura 8. Amplificados del gen *ialB* con tamaño de 558 pb para la identificación de la especie *B. bacilliformis* correspondiente a los carriles del 5 al 8 en gel de agarosa al 1%. Los carriles del 1 al 4 corresponden el DNA genómico de las cepas. M corresponden al marcador de tamaño molecular Perfect DNA™ 100 bp Ladder Novagen®.

5.3 Desarrollo de un antibiograma para determinar la susceptibilidad antimicrobiana en *Bartonella bacilliformis* mediante disco difusión en agar.

Los resultados obtenidos fueron crecimientos uniformes en la placa, siendo el sexto día de la siembra el óptimo para visualizar los halos de inhibición del crecimiento bacteriano, en las pruebas de susceptibilidad como se muestra en las Figura 9.

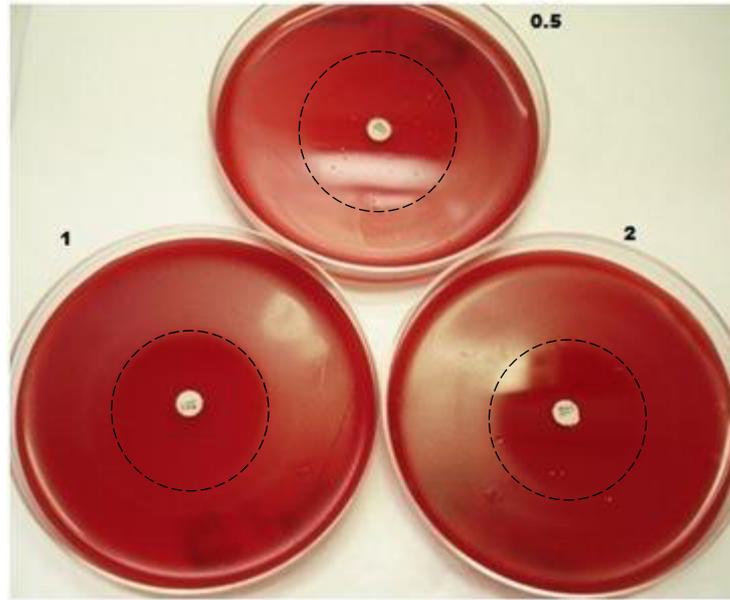


Figura 9. Desarrollo de un antibiograma para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de la cepa USM-LMMB-005, mediante disco difusión en agar con el antibiótico gentamicina (10ug) ensayado con inóculos ajustados a las escalas de McFarland: 0.5 la placa superior, 1 la de la izquierda y 2 la de la derecha, evaluado hasta los 12 días.

En la Tabla 9 se muestra la lectura, obtenida con un inóculo ajustado a escala 1 de McFarland. Los ensayos se hicieron por triplicado.

Tabla 9. Efecto de la concentración del inóculo sobre el halo de inhibición con el antibiótico gentamicina.

Escala McFarland	Tiempo de incubación (días)			
	5	6	7	12
0.5	N.D	44(ED)	44	44
1	44(ED)	44	44	44
2	44(ED)	44	44	44

Valores en milímetros

ND: No definido.

ED: Empezando a definirse el halo.

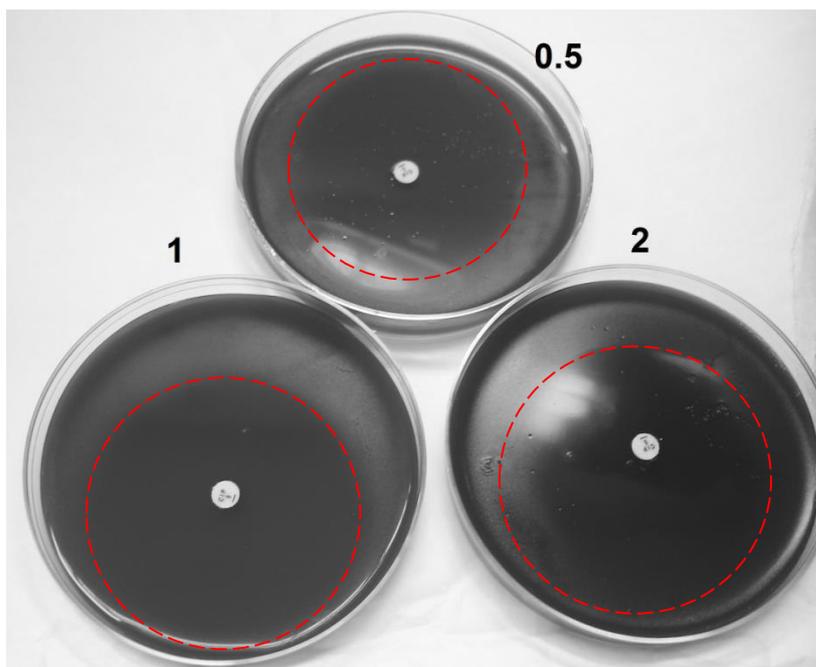


Figura 10. Desarrollo de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana de la cepa USM-LMMB-005 mediante disco difusión en agar con el antibiótico ciprofloxacina (5ug) ensayado con inóculos ajustados a las escalas de McFarland: 0.5 la placa superior, 1 la de la izquierda y 2 la de la derecha, evaluado hasta los 12 días.

En la Tabla 10 se muestra la lectura, obtenida con un inóculo ajustado a escala 1 de McFarland. Los ensayos se hicieron por triplicado.

Tabla 10. Efecto de la concentración del inóculo sobre el halo de inhibición con el antibiótico ciprofloxacina.

Escala McFarland	Tiempo de incubación (días)			
	5	6	7	12
0.5	N.D	52(ED)	52	52
1	52(ED)	52	52	52
2	52(ED)	52	52	52

Valores en milímetros

ND: No definido.

ED: Empezando a definirse el halo.

5.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria en *B. bacilliformis*

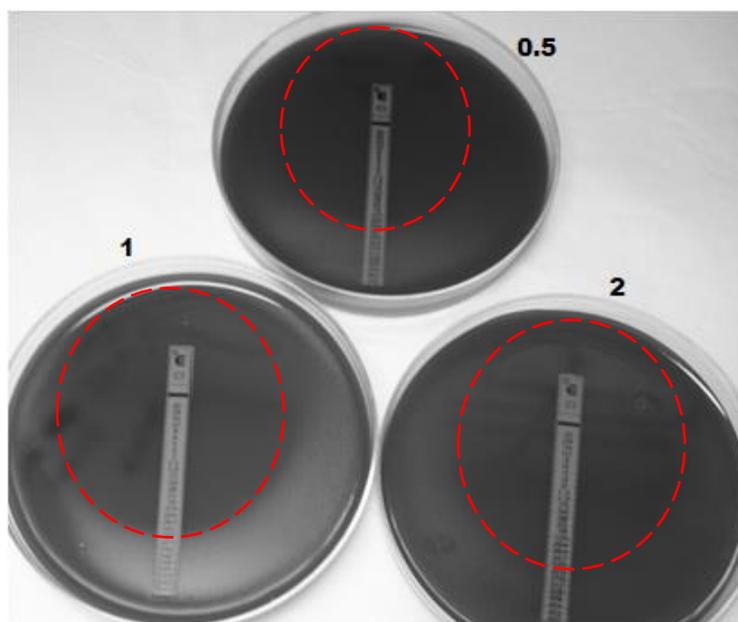


Figura 11. Concentración Inhibitoria Mínima para la cepa USM-LMMB-005 con tiras de gradiente de concentración de ciprofloxacina, ensayado con inóculos ajustados a las escalas de McFarland: 0.5 la placa superior, 1 la de la izquierda y 2 la de la derecha, evaluado hasta los 12 días.

En la Tabla 11 se muestra la lectura, obtenida con un inóculo ajustado a escala 1 de McFarland. Los ensayos se hicieron por triplicado.

Tabla 11. Efecto de la concentración del inóculo sobre la concentración inhibitoria mínima con el antibiótico ciprofloxacina.

Escala McFarland	Tiempo de incubación (días)			
	5	6	7	12
0.5	N.D	0.023(ED)	0.023	0.023
1	0.023(ED)	0.023	0.023	0.023
2	0.032(ED)	0.032	0.032	0.032

Valores en mg/L

ND: No definido.

ED: Empezando a definirse la elipse.

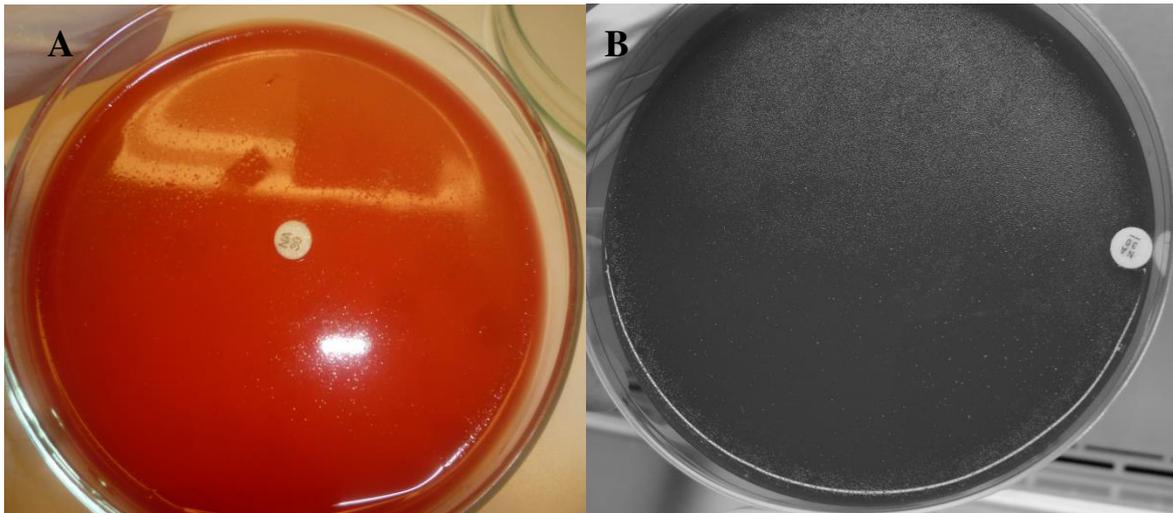


Figura 12. Crecimiento de *B. bacilliformis* en placa a 30°C con 5% de CO₂ por un período de 6 días, con el antibiótico ácido nalidíxico sin presencia de halo de inhibición mostrando que todas las cepas ensayadas presentan una resistencia natural a esta quinolona. En A, se muestra el disco del antibiótico en el centro y en B disco en el borde en ambos sin presencia de halo de inhibición.

Con las cepas de *Bartonella bacilliformis* aisladas en este estudio y la cepa 57.17, se estandarizó la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana mediante ensayos de difusión por disco para los siguientes antibióticos: ciprofloxacina (5 µg), ácido nalidíxico (30 µg), rifampicina (5 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), ceftriaxona (30 µg), amoxicilina (30 µg). El crecimiento bacteriano fue evaluado diariamente, habiéndose determinado que el tiempo óptimo para la observación de los halos de inhibición fue al sexto día (Tabla 12; Figuras 10, 11, y 12).

Tabla 12. Valores del diámetro del halo de inhibición del crecimiento en milímetros, obtenidos mediante difusión por disco en agar para determinar la susceptibilidad antimicrobiana, y valores de la CIM en mg/l mediante la prueba Épsilon de las cepas de *B. bacilliformis* ensayadas.

CEPAS	CIM		Kirby-Bauer						
	Cip (mg/L)	Cip (5µg)	Nal (30µg)	CN (10µg)	RD (5µg)	E (15µg)	CL (30µg)	CRO (30µg)	AM (30µg)
CIP 57.17	0.125	46	6	60	54	SC	SC	85	75
USM-LMMB-005	0.023	52	6	44	85	SC	85	85	74
USM-LMMB-006	0.023	50	6	34	80	90	82	80	80
USM-LMMB-007	0.19	78	6	30	90	80	76	SC	60

ciprofloxacina (Cip), ácido nalidíxico (Nal), gentamicina (CN), rifampicina (RD), eritromicina (E), cloranfenicol (CL), ceftriaxona (CRO), Amoxicilina (AM).

SC: Sin crecimiento evidente.

CIP: Cepas obtenida de la Colección del Instituto Pasteur, Francia.

Las cepas analizadas mostraron resistencia a la quinolona ácido nalidíxico (Figura 12 y Tabla 12), pero susceptibles a los demás antibióticos.

5.5 Amplificación de los genes relacionados con resistencia antimicrobiana en las cepas aisladas de *B. bacilliformis*.

Una vez verificada la buena calidad del DNA bacteriano en un gel de agarosa al 1% como se muestra en la Figura 8, se empleó para amplificar por PCR los genes relacionados con la resistencia antimicrobiana estudiados como se observa en las siguientes Figuras 13, 14, 15 y 16.

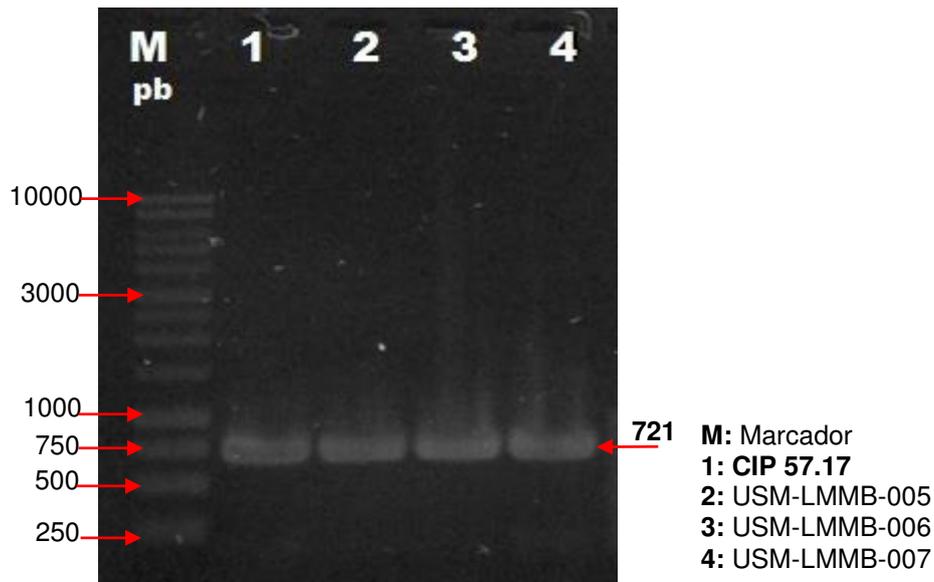


Figura 13. Amplificados de una fracción del gen *gyrA* con tamaño de 721 pb de las cepas aisladas en el estudio correspondientes a los carriles del 1 al 4, M corresponde al marcador de tamaño molecular en pares de bases 1Kb DNA Ladder Promega.

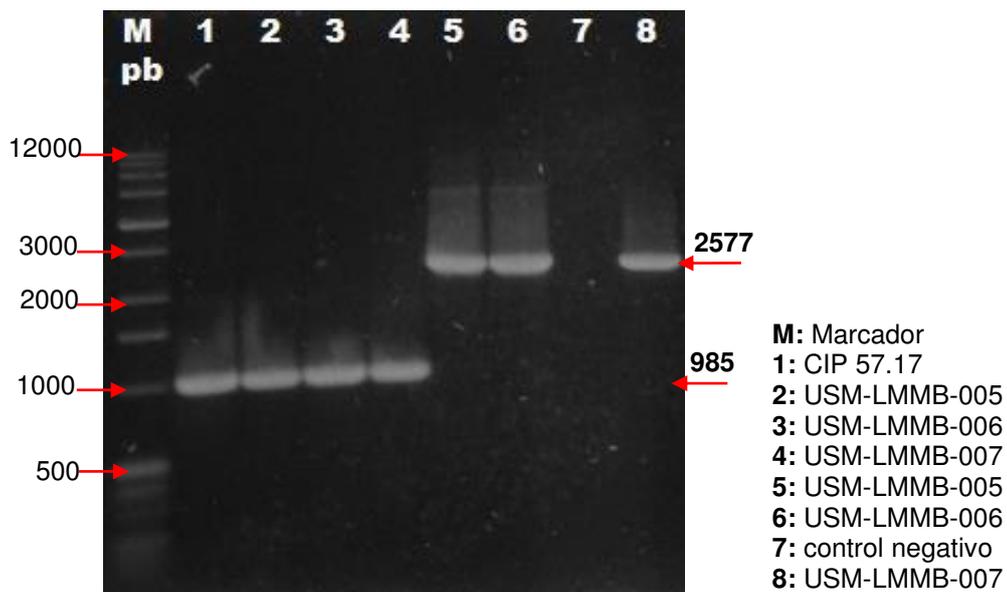


Figura 14. Amplificación de fracciones de los genes: gen *gyrB* (985 pb) del carril 1 al 4 y del gen *rpoB* (2577 pb) del carril 5 al 8. M corresponde al marcador de tamaño molecular en pares de bases Perfect DNA™ Markers, 0.1 – 12 Kbp Novagen®. 1 cepa CIP57.17, 2 a 8 son cepas aisladas en este estudio.

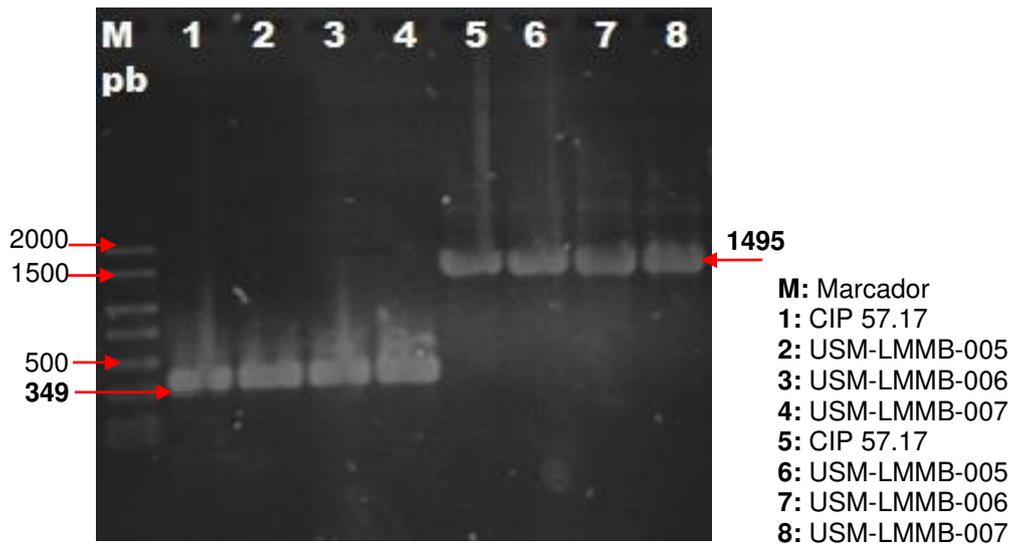


Figura 15. Amplificados de fracciones de los genes: gen *parC* (349 pb) del carril 1 al 4 y del gen *parE* (1495 pb) del carril 5 al 8. M corresponde al marcador de tamaño molecular en pares de bases Perfect DNA™ 50 bp Ladder Novagen®. 1 y 5 cepa CIP57.17, 2 al 8 cepas aisladas en este estudio.

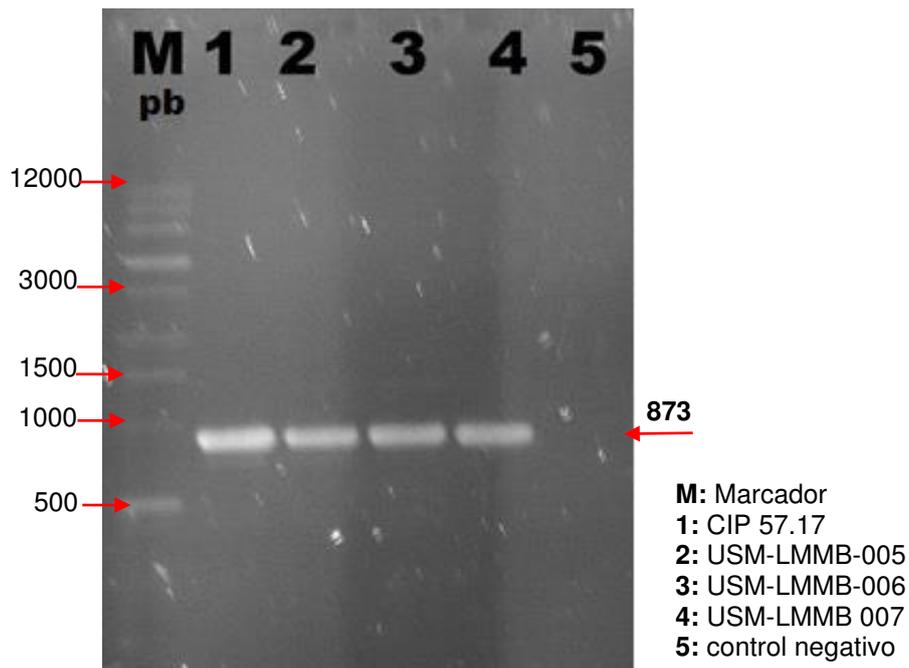


Figura 16. Amplificación de una fracción del gen 16S rRNA (873 pb) empleando los *primers* 16S2. M corresponde al marcador de tamaño molecular Perfect DNA™ Markers, 0.1 – 12 Kbp Novagen®. 1 cepa CIP57.17, 2 a 4 son cepas aisladas en este estudio.

5.6 Análisis *in silico* de la subunidad A de la DNA girasa (*gyrA*)

5.6.1 Secuencias nucleotídicas de *gyrA*: Mediante el análisis de las secuencias nucleotídicas del gen *gyrA* de las cepas aisladas se encontró una mutación en el aislado USM-LMMB-007 como se muestra en la Figura 17.

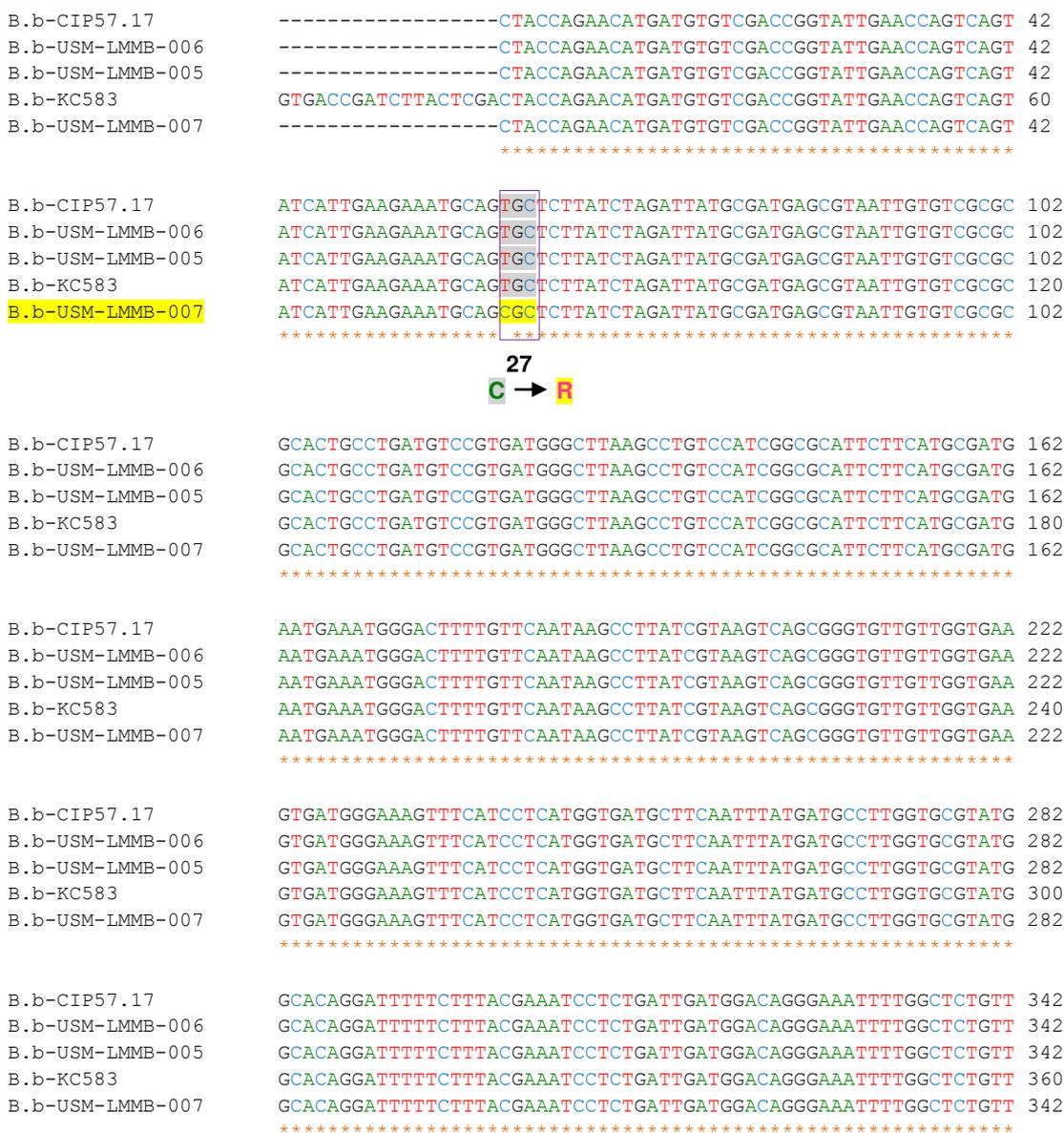


Figura 17. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas de *gyrA* de *B. bacilliformis* KC 583 (ID: 4684252) y las aisladas, utilizando el programa ClustalW 2.1. Se encontró una mutación puntual en el aislado USM-LMM-007 resaltado en color amarillo. La numeración en negrita corresponde al codón traducido de *B. bacilliformis*.

5.7 Análisis *in silico* de la subunidad B de la DNA girasa (*gyrB*)

5.7.1 Secuencias nucleotídicas de *gyrB*: Mediante el análisis de las secuencias nucleotídicas del gen *gyrB* en las cepas de *B. bacilliformis* se encontró mutaciones puntuales en el aislado USM-LMMB-005 como se muestra en la Figura 19.

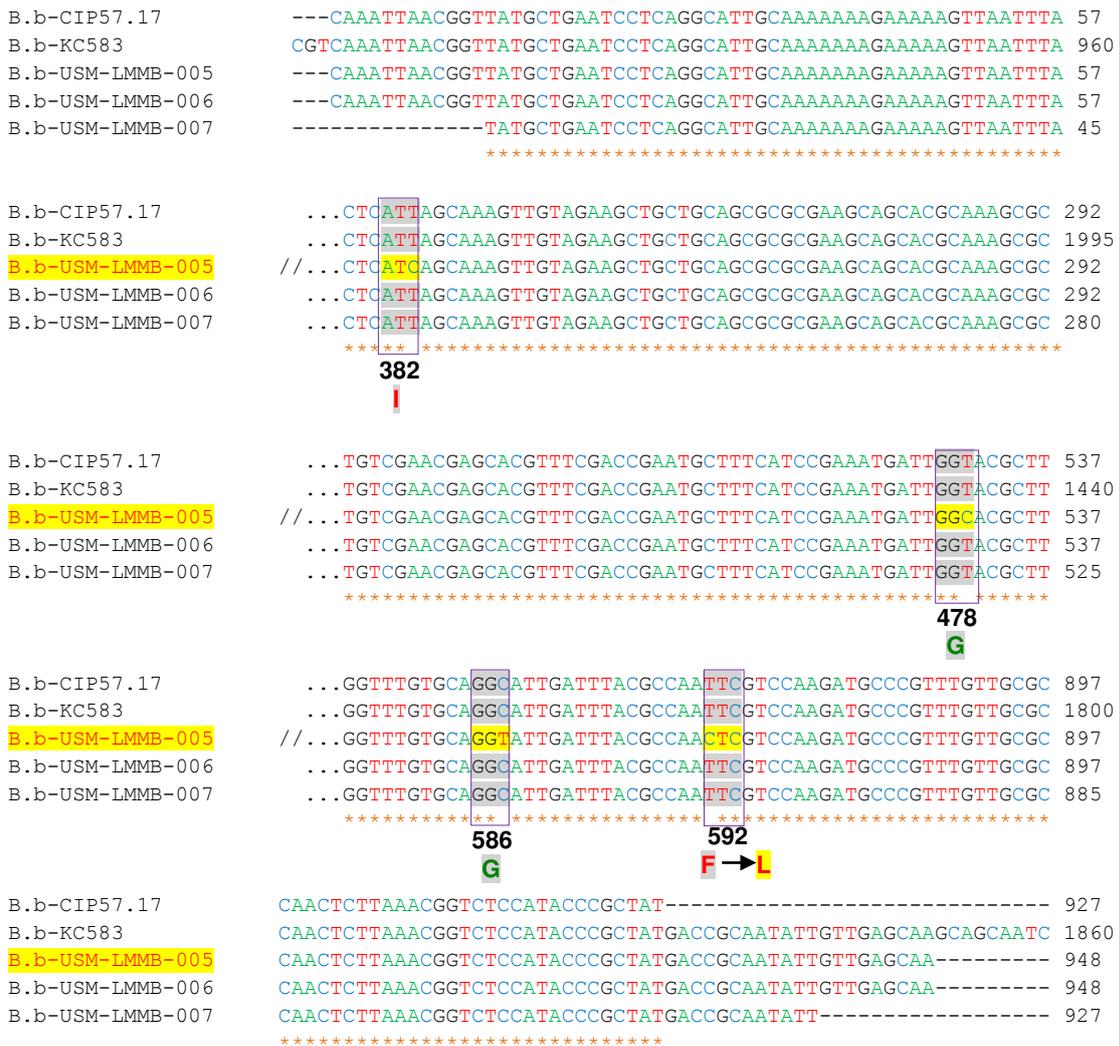


Figura 19. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas de *gyrB* de *B. bacilliformis* KC 583 (ID: 4684252) y las aisladas, utilizando el programa ClustalW 2.1. Se encontró cuatro mutaciones puntuales en el aislado USM-LMM-005 resaltadas en color amarillo, una mutación produjo cambios en el aminoácido respectivo correspondiente a la numeración 592. La numeración en negrita corresponde al codón traducido de *B. bacilliformis*.


```

B.b-USM-LMMB-007  LRQLLNGLHTRYDRNI----- 309
B.b-KC583         LRQLLNGLHTRYDRNIVEQAAIAGAFNFEAFATPETAQKIADDTIAKRLDLIADDMERGWS 658
B.b-USM-LMMB-006  LRQLLNGLHTRYDRNIVEQ----- 316
B.b-USM-LMMB-005  LRQLLNGLHTRYDRNIVEQ----- 316
B.b-CIP57.17      LRQLLNGLHTRY----- 309
E.c-str.K-12-MG1655 TQKMINRMERRYPKAMLKELIYQPTLLEADLSDEQTVTRWVNALVSELNDKEQHGSQWKF 649
                  :::* :. **

```

Figura 20. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de GyrB de la cepa de *B. bacilliformis* KC 583 y las aisladas, comparadas con GyrB de *E. coli* K-12, utilizando el programa ClustalW 2.1. Se indica el QRDR comprendido en el recuadro rojo, y las sustituciones aminoacídicas (Lis por Arg) resaltado en color negro dentro del QRDR. La numeración en la parte inferior corresponde a la proteína GyrB de *E. coli* K-12 (YP_026241.1) y en la parte superior su equivalente para *B. bacilliformis* (YP_989593.1).

5.8 Análisis *in silico* de la subunidad A de la topoisomerasa IV (*parC*)

5.8.1 Secuencias nucleotídicas de *parC*: Mediante el análisis de las secuencias nucleotídicas del gen *parC* en las cepas de *B. bacilliformis* no se encontró diferencias nucleotídicas entre las aisladas y la *B. bacilliformis* KC 583 como se muestra en la Figura 21.

```

B.b-USM-LMMB-005 -----AAGTGTGCACGGATTGTAGGTGATGTTATGGGGAAATTTTCAT 42
B.b-USM-LMMB-006 -----AAGTGTGCACGGATTGTAGGTGATGTTATGGGGAAATTTTCAT 42
B.b-USM-LMMB-007 -----AAGTGTGCACGGATTGTAGGTGATGTTATGGGGAAATTTTCAT 42
B.b-KC583 CCTGCACAATCTTATGCTAAGTGTGCACGGATTGTAGGTGATGTTATGGGGAAATTTTCAT 240
B.b-CIP57.17 -----AAGTGTGCACGGATTGTAGGTGATGTTATGGGGAAATTTTCAT 42
                        *****

B.b-USM-LMMB-005 CCTCATGGTGATGCCTCTATTTATGATGCATTAGTTCGTTTGGCACAGGACTTTGCTGTC 102
B.b-USM-LMMB-006 CCTCATGGTGATGCCTCTATTTATGATGCATTAGTTCGTTTGGCACAGGACTTTGCTGTC 102
B.b-USM-LMMB-007 CCTCATGGTGATGCCTCTATTTATGATGCATTAGTTCGTTTGGCACAGGACTTTGCTGTC 102
B.b-KC583 CCTCATGGTGATGCCTCTATTTATGATGCATTAGTTCGTTTGGCACAGGACTTTGCTGTC 300
B.b-CIP57.17 CCTCATGGTGATGCCTCTATTTATGATGCATTAGTTCGTTTGGCACAGGACTTTGCTGTC 102
                        *****

B.b-USM-LMMB-005 CGTTATCCATTAATTGATGGACAAGGAAATTTCCGGTAATATCGACGGTGATAATGCTGCA 162
B.b-USM-LMMB-006 CGTTATCCATTAATTGATGGACAAGGAAATTTCCGGTAATATCGACGGTGATAATGCTGCA 162
B.b-USM-LMMB-007 CGTTATCCATTAATTGATGGACAAGGAAATTTCCGGTAATATCGACGGTGATAATGCTGCA 162
B.b-KC583 CGTTATCCATTAATTGATGGACAAGGAAATTTCCGGTAATATCGACGGTGATAATGCTGCA 360
B.b-CIP57.17 CGTTATCCATTAATTGATGGACAAGGAAATTTCCGGTAATATCGACGGTGATAATGCTGCA 162
                        *****

B.b-USM-LMMB-005 GCTATGCGTTATACAGAAGCACGCATGACTGAAGTAGCAGAATTGTTACTTGAGGGTATC 222
B.b-USM-LMMB-006 GCTATGCGTTATACAGAAGCACGCATGACTGAAGTAGCAGAATTGTTACTTGAGGGTATC 222
B.b-USM-LMMB-007 GCTATGCGTTATACAGAAGCACGCATGACTGAAGTAGCAGAATTGTTACTTGAGGGTATC 222
B.b-KC583 GCTATGCGTTATACAGAAGCACGCATGACTGAAGTAGCAGAATTGTTACTTGAGGGTATC 420
B.b-CIP57.17 GCTATGCGTTATACAGAAGCACGCATGACTGAAGTAGCAGAATTGTTACTTGAGGGTATC 222
                        *****

B.b-USM-LMMB-005 AACGAAAATGCTATTGATTTTCGTTTAACTTATAATGAAGAAGATGAAGAGCCTATTGTT 282
B.b-USM-LMMB-006 AACGAAAATGCTATTGATTTTCGTTTAACTTATAATGAAGAAGATGAAGAGCCTATTGTT 282
B.b-USM-LMMB-007 AACGAAAATGCTATTGATTTTCGTTTAACTTATAATGAAGAAGATGAAGAGCCTATTGTT 282
B.b-KC583 AACGAAAATGCTATTGATTTTCGTTTAACTTATAATGAAGAAGATGAAGAGCCTATTGTT 480
B.b-CIP57.17 AACGAAAATGCTATTGATTTTCGTTTAACTTATAATGAAGAAGATGAAGAGCCTATTGTT 282
                        *****

B.b-USM-LMMB-005 TTACCAGGAGCTTTTCCTAATCTTTTAGCCAATGGTTCCTTCAGGG----- 327
B.b-USM-LMMB-006 TTACCAGGAGCTTTTCCTAATCTTTTAGCCAATGGTTCCTTCAGGG----- 327
B.b-USM-LMMB-007 TTACCAGGAGCTTTTCCTAATCTTTTAGCCAATGGTTCCTTCAGGG----- 327
B.b-KC583 TTACCAGGAGCTTTTCCTAATCTTTTAGCCAATGGTTCCTTCAGGGATTGCTGTTGGTATG 540
B.b-CIP57.17 TTACCAGGAGCTTTTCCTAATCTTTTAGCCAATGGTTCCTTCAGGG----- 327
                        *****

```

Figura 21. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas de *parC* de *B. bacilliformis* KC 583 (ID: 4684170) y las aisladas, utilizando el programa ClustalW 2.1. No encontrándose diferencias entre ellas.

5.8.2 Secuencias aminoacídicas de ParC: Mediante el análisis de las secuencias aminoacídicas para ParC de las cepas analizadas no se encontró ninguna diferencia entre ellas en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR). En relación con la secuencia de *E. coli* K-12 se encontró dos diferencias dentro del QRDR en los aminoácidos 80 y 94 de S por A (posiciones 85 y 99 para *B. bacilliformis*). Otros cambios muy cercanos al sitio activo en los aminoácidos 123 y 129 también de (Ser por Ala), como se muestra en la Figura 22.

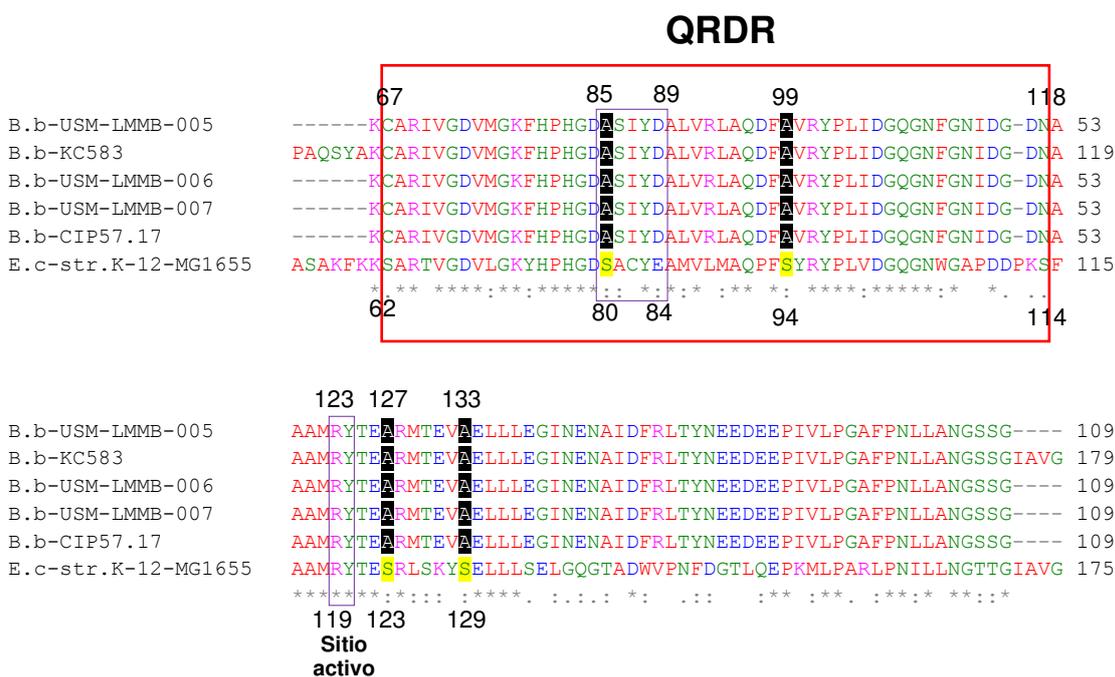


Figura 22. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de ParC de la cepa de *B. bacilliformis* KC 583 y las aisladas comparadas con ParC de *E. coli* K-12, utilizando el programa ClustalW 2.1. Se indica el QRDR comprendido en el recuadro rojo, y las sustituciones aminoacídicas (Ser por Ala) resaltado en color negro. La numeración en la parte inferior corresponde a las posiciones de los aminoácidos de la proteína ParC de *E. coli* (NP_417491.1) y en la parte superior su equivalente en *B. bacilliformis* (YP_989154.1).

5.9 Análisis *in silico* de la subunidad B de la topoisomerasa IV (*parE*)

5.9.1 Secuencias nucleotídicas de *parE*: Mediante el análisis de las secuencias nucleotídicas del gen *parE* de las cepas de *B. bacilliformis* se encontró dos mutaciones puntuales en el aislado USM-LMMB-005 los cuales no produjeron cambios en el codón respectivo como se muestra en la Figura 23.

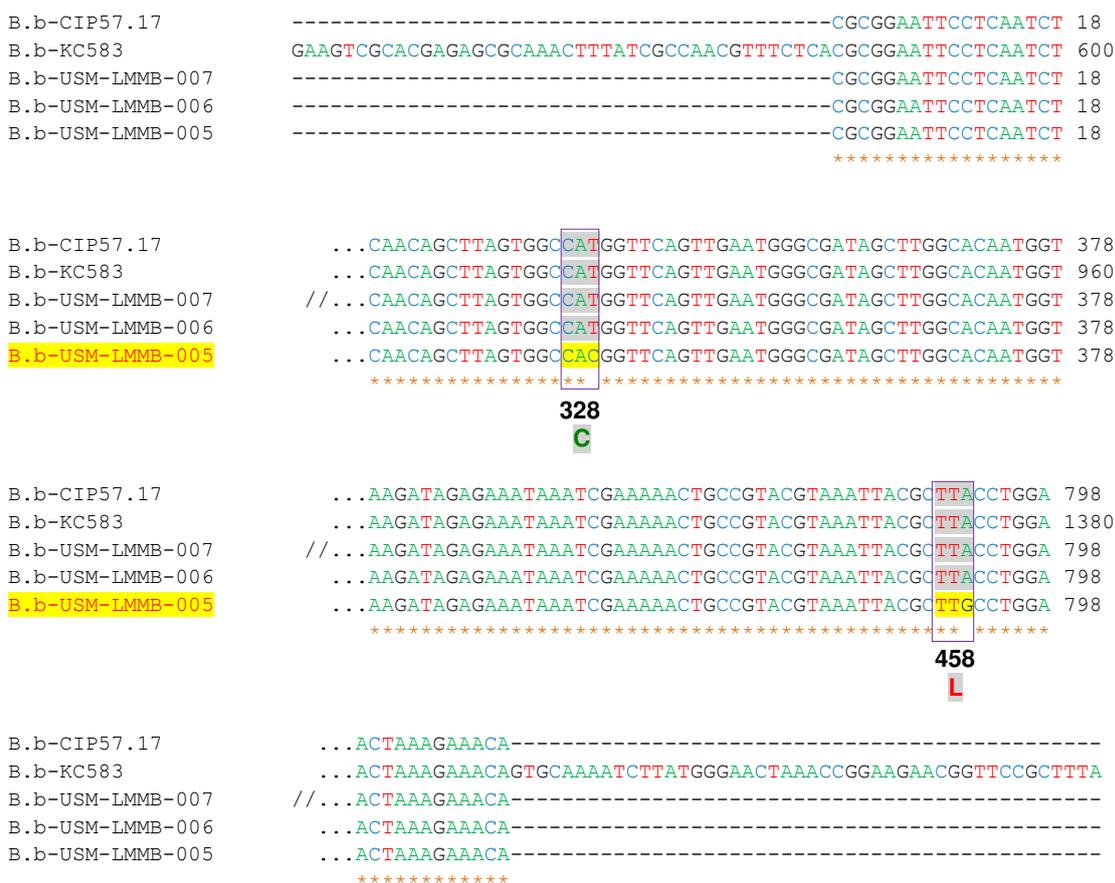


Figura 23. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas de *parE* de *B. bacilliformis* KC 583 (ID: 4684565) y las aisladas, utilizando el programa ClustalW 2.1. Se encontró dos mutaciones puntuales en el aislado USM-LMM-005 resaltadas en color amarillo. La numeración en negra corresponde al codón traducido de *B. bacilliformis*


```

B.b-USM-LMMB-005 YREEDLRYERIIIMTDADV DGAHIASLLITFFFQEIPDLIRAGHLYLAVPPLYRISQGGK 402
B.b-USM-LMMB-006 YREEDLRYERIIIMTDADV DGAHIASLLITFFFQEIPDLIRAGHLYLAVPPLYRISQGGK 402
B.b-USM-LMMB-007 YREEDLRYERIIIMTDADV DGAHIASLLITFFFQEIPDLIRAGHLYLAVPPLYRISQGGK 402
B.b-CIP57.17 YREEDLRYERIIIMTDADV DGAHIASLLITFFFQEIPDLIRAGHLYLAVPPLYRISQGGK 402
B.b-KC583 YREEDLRYERIIIMTDADV DGAHIASLLITFFFQEIPDLIRAGHLYLAVPPLYRISQGGK 596
E.c-str.K-12-MG1655 DLS-QLRYGKICILADADS DGLHIATLLCALFVKHFRALVKHGHVYVALPPLYRIDLGKE 534
. :*** :* *::*** ** **::** ::*...: *:: **:*:*:*****. * :

```

Figura 24. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de ParE de la cepa de *B. bacilliformis* KC583 y las aisladas, comparadas con ParE de *E. coli* K-12, utilizando el programa ClustalW 2.1. Se indica el QRDR comprendido en el recuadro rojo, y sus respectivos aminoácidos cambiantes (Lys por Arg) resaltado en color negro. La numeración en la parte inferior corresponde a las posiciones de los aminoácidos de la proteína ParE de *E. coli* (NP_417502.1) y en la parte superior su equivalente para *B. bacilliformis* (YP_989184.1).

5.10 Análisis *in silico* de la subunidad β de la RNA polimerasa (*rpoB*)

5.10.1 Secuencias nucleotídicas de *rpoB*: Mediante el análisis de las secuencias nucleotídicas del gen *rpoB* en las cepas de *B. bacilliformis* no se encontró diferencias nucleotídicas entre las aisladas y la *B. bacilliformis* KC 583 como se muestra en la Figura 25.

B.b-USM-LMMB-005	GTGCGTTACGAATTTGATGCACCAAAGTTTGTGTTGAAGAATGTCGTGAGCGCGATCTA	108
B.b-USM-LMMB-006	GTGCGTTACGAATTTGATGCACCAAAGTTTGTGTTGAAGAATGTCGTGAGCGCGATCTA	108
B.b-USM-LMMB-007	GTGCGTTACGAATTTGATGCACCAAAGTTTGTGTTGAAGAATGTCGTGAGCGCGATCTA	108
B.b-KC583	GTGCGTTACGAATTTGATGCACCAAAGTTTGTGTTGAAGAATGTCGTGAGCGCGATCTA	300
B.b-CIP57.17	GTGCGTTACGAATTTGATGCACCAAAGTTTGTGTTGAAGAATGTCGTGAGCGCGATCTA	108

B.b-USM-LMMB-005	ACTTATGCAGCACCATTAAGGTGATATTACGCTTAATCGTATTTGATATTGATGAAGAT	168
B.b-USM-LMMB-006	ACTTATGCAGCACCATTAAGGTGATATTACGCTTAATCGTATTTGATATTGATGAAGAT	168
B.b-USM-LMMB-007	ACTTATGCAGCACCATTAAGGTGATATTACGCTTAATCGTATTTGATATTGATGAAGAT	168
B.b-KC583	ACTTATGCAGCACCATTAAGGTGATATTACGCTTAATCGTATTTGATATTGATGAAGAT	360
B.b-CIP57.17	ACTTATGCAGCACCATTAAGGTGATATTACGCTTAATCGTATTTGATATTGATGAAGAT	168

B.b-USM-LMMB-005	ACCGGTTCTAAAGATATTAAGGATATCAAAGAGCAGGGTGCTATATGGGCGATATGCCT	228
B.b-USM-LMMB-006	ACCGGTTCTAAAGATATTAAGGATATCAAAGAGCAGGGTGCTATATGGGCGATATGCCT	228
B.b-USM-LMMB-007	ACCGGTTCTAAAGATATTAAGGATATCAAAGAGCAGGGTGCTATATGGGCGATATGCCT	228
B.b-KC583	ACCGGTTCTAAAGATATTAAGGATATCAAAGAGCAGGGTGCTATATGGGCGATATGCCT	420
B.b-CIP57.17	ACCGGTTCTAAAGATATTAAGGATATCAAAGAGCAGGGTGCTATATGGGCGATATGCCT	228

B.b-USM-LMMB-005	TTAATGACGAGTAATGGTACTTTTATCATTAAACGGTACAGAGCGTGTATTGTTTCGCAG	288
B.b-USM-LMMB-006	TTAATGACGAGTAATGGTACTTTTATCATTAAACGGTACAGAGCGTGTATTGTTTCGCAG	288
B.b-USM-LMMB-007	TTAATGACGAGTAATGGTACTTTTATCATTAAACGGTACAGAGCGTGTATTGTTTCGCAG	288
B.b-KC583	TTAATGACGAGTAATGGTACTTTTATCATTAAACGGTACAGAGCGTGTATTGTTTCGCAG	480
B.b-CIP57.17	TTAATGACGAGTAATGGTACTTTTATCATTAAACGGTACAGAGCGTGTATTGTTTCGCAG	288

B.b-USM-LMMB-005	ATGCATCGTTCCTCCCGGTGTGTTTTTGTGATCATGATAAAGGAAAATCTCATTGTCAGGA	348
B.b-USM-LMMB-006	ATGCATCGTTCCTCCCGGTGTGTTTTTGTGATCATGATAAAGGAAAATCTCATTGTCAGGA	348
B.b-USM-LMMB-007	ATGCATCGTTCCTCCCGGTGTGTTTTTGTGATCATGATAAAGGAAAATCTCATTGTCAGGA	348
B.b-KC583	ATGCATCGTTCCTCCCGGTGTGTTTTTGTGATCATGATAAAGGAAAATCTCATTGTCAGGA	540
B.b-CIP57.17	ATGCATCGTTCCTCCCGGTGTGTTTTTGTGATCATGATAAAGGAAAATCTCATTGTCAGGA	348

B.b-USM-LMMB-005	AAGGTTCTTTTTCAGCCCCGTGTAATTCCTTATCGTGGTTCCTGGTTAGATATTGAATTT	408
B.b-USM-LMMB-006	AAGGTTCTTTTTCAGCCCCGTGTAATTCCTTATCGTGGTTCCTGGTTAGATATTGAATTT	408
B.b-USM-LMMB-007	AAGGTTCTTTTTCAGCCCCGTGTAATTCCTTATCGTGGTTCCTGGTTAGATATTGAATTT	408
B.b-KC583	AAGGTTCTTTTTCAGCCCCGTGTAATTCCTTATCGTGGTTCCTGGTTAGATATTGAATTT	600
B.b-CIP57.17	AAGGTTCTTTTTCAGCCCCGTGTAATTCCTTATCGTGGTTCCTGGTTAGATATTGAATTT	408

B.b-USM-LMMB-005	GATGCGAAAGATATCGTTTATGCTCGCATTGATCGGAGACGAAAGATTCCGGTTACTAGC	468
B.b-USM-LMMB-006	GATGCGAAAGATATCGTTTATGCTCGCATTGATCGGAGACGAAAGATTCCGGTTACTAGC	468
B.b-USM-LMMB-007	GATGCGAAAGATATCGTTTATGCTCGCATTGATCGGAGACGAAAGATTCCGGTTACTAGC	468
B.b-KC583	GATGCGAAAGATATCGTTTATGCTCGCATTGATCGGAGACGAAAGATTCCGGTTACTAGC	660
B.b-CIP57.17	GATGCGAAAGATATCGTTTATGCTCGCATTGATCGGAGACGAAAGATTCCGGTTACTAGC	468

B.b-USM-LMMB-005	TTTCTGATGGCATTGGGTATGGATGCATCGGATATTTTGTCAACCTTTTATAATAAAGTT	528
B.b-USM-LMMB-006	TTTCTGATGGCATTGGGTATGGATGCATCGGATATTTTGTCAACCTTTTATAATAAAGTT	528
B.b-USM-LMMB-007	TTTCTGATGGCATTGGGTATGGATGCATCGGATATTTTGTCAACCTTTTATAATAAAGTT	528
B.b-KC583	TTTCTGATGGCATTGGGTATGGATGCATCGGATATTTTGTCAACCTTTTATAATAAAGTT	720
B.b-CIP57.17	TTTCTGATGGCATTGGGTATGGATGCATCGGATATTTTGTCAACCTTTTATAATAAAGTT	528

B.b-USM-LMMB-005	ACTTATGAGCGGGTTGAAAGTGGGTGGCGTATTCCTTATTCAGTGGATCGCTTTAAGGGA	588
B.b-USM-LMMB-006	ACTTATGAGCGGGTTGAAAGTGGGTGGCGTATTCCTTATTCAGTGGATCGCTTTAAGGGA	588
B.b-USM-LMMB-007	ACTTATGAGCGGGTTGAAAGTGGGTGGCGTATTCCTTATTCAGTGGATCGCTTTAAGGGA	588
B.b-KC583	ACTTATGAGCGGGTTGAAAGTGGGTGGCGTATTCCTTATTCAGTGGATCGCTTTAAGGGA	780
B.b-CIP57.17	ACTTATGAGCGGGTTGAAAGTGGGTGGCGTATTCCTTATTCAGTGGATCGCTTTAAGGGA	588

B.b-USM-LMMB-005 GTAAAATTGGTTTCTGATCTTGTGATGCAGAGAGTGGAGAGGTTGTTGCTGAGGCTGGT 648
B.b-USM-LMMB-006 GTAAAATTGGTTTCTGATCTTGTGATGCAGAGAGTGGAGAGGTTGTTGCTGAGGCTGGT 648
B.b-USM-LMMB-007 GTAAAATTGGTTTCTGATCTTGTGATGCAGAGAGTGGAGAGGTTGTTGCTGAGGCTGGT 648
B.b-KC583 GTAAAATTGGTTTCTGATCTTGTGATGCAGAGAGTGGAGAGGTTGTTGCTGAGGCTGGT 840
B.b-CIP57.17 GTAAAATTGGTTTCTGATCTTGTGATGCAGAGAGTGGAGAGGTTGTTGCTGAGGCTGGT 648

B.b-USM-LMMB-005 AAAAAAGCTAACAGCTCGCACTGCAAAGCTTTTGTAGAAAAAGGTCCTAAAGGCCGATTAGA 708
B.b-USM-LMMB-006 AAAAAAGCTAACAGCTCGCACTGCAAAGCTTTTGTAGAAAAAGGTCCTAAAGGCCGATTAGA 708
B.b-USM-LMMB-007 AAAAAAGCTAACAGCTCGCACTGCAAAGCTTTTGTAGAAAAAGGTCCTAAAGGCCGATTAGA 708
B.b-KC583 AAAAAAGCTAACAGCTCGCACTGCAAAGCTTTTGTAGAAAAAGGTCCTAAAGGCCGATTAGA 900
B.b-CIP57.17 AAAAAAGCTAACAGCTCGCACTGCAAAGCTTTTGTAGAAAAAGGTCCTAAAGGCCGATTAGA 708

B.b-USM-LMMB-005 GTCAGTGAAGATGAATTATTAGGGTCTTATTAGCGGATGATATCGTTAATTATGAAACA 768
B.b-USM-LMMB-006 GTCAGTGAAGATGAATTATTAGGGTCTTATTAGCGGATGATATCGTTAATTATGAAACA 768
B.b-USM-LMMB-007 GTCAGTGAAGATGAATTATTAGGGTCTTATTAGCGGATGATATCGTTAATTATGAAACA 768
B.b-KC583 GTCAGTGAAGATGAATTATTAGGGTCTTATTAGCGGATGATATCGTTAATTATGAAACA 960
B.b-CIP57.17 GTCAGTGAAGATGAATTATTAGGGTCTTATTAGCGGATGATATCGTTAATTATGAAACA 768

B.b-USM-LMMB-005 GGTGAGATTTATCTTGAAGCTGGTGTGAAATTGATGAAAAAGTATTAAGTTTATTT 828
B.b-USM-LMMB-006 GGTGAGATTTATCTTGAAGCTGGTGTGAAATTGATGAAAAAGTATTAAGTTTATTT 828
B.b-USM-LMMB-007 GGTGAGATTTATCTTGAAGCTGGTGTGAAATTGATGAAAAAGTATTAAGTTTATTT 828
B.b-KC583 GGTGAGATTTATCTTGAAGCTGGTGTGAAATTGATGAAAAAGTATTAAGTTTATTT 1020
B.b-CIP57.17 GGTGAGATTTATCTTGAAGCTGGTGTGAAATTGATGAAAAAGTATTAAGTTTATTT 828

B.b-USM-LMMB-005 GATGTTGGTGCTAATCAAATCAATATCTTGTATTGATCACATGAGTGTGGAGCATAT 888
B.b-USM-LMMB-006 GATGTTGGTGCTAATCAAATCAATATCTTGTATTGATCACATGAGTGTGGAGCATAT 888
B.b-USM-LMMB-007 GATGTTGGTGCTAATCAAATCAATATCTTGTATTGATCACATGAGTGTGGAGCATAT 888
B.b-KC583 GATGTTGGTGCTAATCAAATCAATATCTTGTATTGATCACATGAGTGTGGAGCATAT 1080
B.b-CIP57.17 GATGTTGGTGCTAATCAAATCAATATCTTGTATTGATCACATGAGTGTGGAGCATAT 888

B.b-USM-LMMB-005 ATCCGCAATACTTTAAAAGTAGATAAAAAATGAAAGTCGGCAAGATGCGTTATTTGATATT 948
B.b-USM-LMMB-006 ATCCGCAATACTTTAAAAGTAGATAAAAAATGAAAGTCGGCAAGATGCGTTATTTGATATT 948
B.b-USM-LMMB-007 ATCCGCAATACTTTAAAAGTAGATAAAAAATGAAAGTCGGCAAGATGCGTTATTTGATATT 948
B.b-KC583 ATCCGCAATACTTTAAAAGTAGATAAAAAATGAAAGTCGGCAAGATGCGTTATTTGATATT 1140
B.b-CIP57.17 ATCCGCAATACTTTAAAAGTAGATAAAAAATGAAAGTCGGCAAGATGCGTTATTTGATATT 948

B.b-USM-LMMB-005 TATCGGGTGATGCGTCCAGGAGAACCACCAACAATAGATACAGCGGAAGCTATGTTCCAC 1008
B.b-USM-LMMB-006 TATCGGGTGATGCGTCCAGGAGAACCACCAACAATAGATACAGCGGAAGCTATGTTCCAC 1008
B.b-USM-LMMB-007 TATCGGGTGATGCGTCCAGGAGAACCACCAACAATAGATACAGCGGAAGCTATGTTCCAC 1008
B.b-KC583 TATCGGGTGATGCGTCCAGGAGAACCACCAACAATAGATACAGCGGAAGCTATGTTCCAC 1200
B.b-CIP57.17 TATCGGGTGATGCGTCCAGGAGAACCACCAACAATAGATACAGCGGAAGCTATGTTCCAC 1008

B.b-USM-LMMB-005 TCGTTGTTTTTGAATCTGAGCGTTATGATCTTTCGGCTGTTGGTCTGTTAAGATGAAT 1068
B.b-USM-LMMB-006 TCGTTGTTTTTGAATCTGAGCGTTATGATCTTTCGGCTGTTGGTCTGTTAAGATGAAT 1068
B.b-USM-LMMB-007 TCGTTGTTTTTGAATCTGAGCGTTATGATCTTTCGGCTGTTGGTCTGTTAAGATGAAT 1068
B.b-KC583 TCGTTGTTTTTGAATCTGAGCGTTATGATCTTTCGGCTGTTGGTCTGTTAAGATGAAT 1260
B.b-CIP57.17 TCGTTGTTTTTGAATCTGAGCGTTATGATCTTTCGGCTGTTGGTCTGTTAAGATGAAT 1068

B.b-USM-LMMB-005 TTGCGTATGGGGCTTGATTGCCCTGATACGGTTCGTGTTTTGCGTCAAGAAGATATTATT 1128
B.b-USM-LMMB-006 TTGCGTATGGGGCTTGATTGCCCTGATACGGTTCGTGTTTTGCGTCAAGAAGATATTATT 1128
B.b-USM-LMMB-007 TTGCGTATGGGGCTTGATTGCCCTGATACGGTTCGTGTTTTGCGTCAAGAAGATATTATT 1128
B.b-KC583 TTGCGTATGGGGCTTGATTGCCCTGATACGGTTCGTGTTTTGCGTCAAGAAGATATTATT 1320
B.b-CIP57.17 TTGCGTATGGGGCTTGATTGCCCTGATACGGTTCGTGTTTTGCGTCAAGAAGATATTATT 1128

B.b-USM-LMMB-005 GGTGTTGTTAAGATGCTGGTTGAATTGCGCGATGGCCGTGGTGAATTGATGATATCGAC 1188
B.b-USM-LMMB-006 GGTGTTGTTAAGATGCTGGTTGAATTGCGCGATGGCCGTGGTGAATTGATGATATCGAC 1188
B.b-USM-LMMB-007 GGTGTTGTTAAGATGCTGGTTGAATTGCGCGATGGCCGTGGTGAATTGATGATATCGAC 1188
B.b-KC583 GGTGTTGTTAAGATGCTGGTTGAATTGCGCGATGGCCGTGGTGAATTGATGATATCGAC 1380
B.b-CIP57.17 GGTGTTGTTAAGATGCTGGTTGAATTGCGCGATGGCCGTGGTGAATTGATGATATCGAC 1188

B.b-USM-LMMB-005 AATCTTGGTAAATCGTCTGTTGATCAGTTGGGAAATTGATGGAAAAATCAATATCGGGTT 1248
B.b-USM-LMMB-006 AATCTTGGTAAATCGTCTGTTGATCAGTTGGGAAATTGATGGAAAAATCAATATCGGGTT 1248
B.b-USM-LMMB-007 AATCTTGGTAAATCGTCTGTTGATCAGTTGGGAAATTGATGGAAAAATCAATATCGGGTT 1248
B.b-KC583 AATCTTGGTAAATCGTCTGTTGATCAGTTGGGAAATTGATGGAAAAATCAATATCGGGTT 1440
B.b-CIP57.17 AATCTTGGTAAATCGTCTGTTGATCAGTTGGGAAATTGATGGAAAAATCAATATCGGGTT 1248

B.b-USM-LMMB-005 GGTTTGCTTCGTATGGAGCGTGCATAAAGGAACGCATGTCTTCAGTTGAAATTGATACT 1308
 B.b-USM-LMMB-006 GGTTTGCTTCGTATGGAGCGTGCATAAAGGAACGCATGTCTTCAGTTGAAATTGATACT 1308
 B.b-USM-LMMB-007 GGTTTGCTTCGTATGGAGCGTGCATAAAGGAACGCATGTCTTCAGTTGAAATTGATACT 1308
 B.b-KC583 GGTTTGCTTCGTATGGAGCGTGCATAAAGGAACGCATGTCTTCAGTTGAAATTGATACT 1500
 B.b-CIP57.17 GGTTTGCTTCGTATGGAGCGTGCATAAAGGAACGCATGTCTTCAGTTGAAATTGATACT 1308

 B.b-USM-LMMB-005 GTTATGCCACAAGATTTGATTAATGCGAAACCAGCTGCGGCAGCTGTTCCGAGTTTTTTT 1368
 B.b-USM-LMMB-006 GTTATGCCACAAGATTTGATTAATGCGAAACCAGCTGCGGCAGCTGTTCCGAGTTTTTTT 1368
 B.b-USM-LMMB-007 GTTATGCCACAAGATTTGATTAATGCGAAACCAGCTGCGGCAGCTGTTCCGAGTTTTTTT 1368
 B.b-KC583 GTTATGCCACAAGATTTGATTAATGCGAAACCAGCTGCGGCAGCTGTTCCGAGTTTTTTT 1560
 B.b-CIP57.17 GTTATGCCACAAGATTTGATTAATGCGAAACCAGCTGCGGCAGCTGTTCCGAGTTTTTTT 1368

 B.b-USM-LMMB-005 GGGTCTTCGCAATTATCGCAGTTTATGGATCAAACAAATCCATTATCAGAAATTAATCAT 1428
 B.b-USM-LMMB-006 GGGTCTTCGCAATTATCGCAGTTTATGGATCAAACAAATCCATTATCAGAAATTAATCAT 1428
 B.b-USM-LMMB-007 GGGTCTTCGCAATTATCGCAGTTTATGGATCAAACAAATCCATTATCAGAAATTAATCAT 1428
 B.b-KC583 GGGTCTTCGCAATTATCGCAGTTTATGGATCAAACAAATCCATTATCAGAAATTAATCAT 1620
 B.b-CIP57.17 GGGTCTTCGCAATTATCGCAGTTTATGGATCAAACAAATCCATTATCAGAAATTAATCAT 1428

 B.b-USM-LMMB-005 AAACGTCGTCCTTCTGCTCTTGGGCCAGGTGGTTTAACTCGTGAGCGTGCAGGTTTTGAA 1488
 B.b-USM-LMMB-006 AAACGTCGTCCTTCTGCTCTTGGGCCAGGTGGTTTAACTCGTGAGCGTGCAGGTTTTGAA 1488
 B.b-USM-LMMB-007 AAACGTCGTCCTTCTGCTCTTGGGCCAGGTGGTTTAACTCGTGAGCGTGCAGGTTTTGAA 1488
 B.b-KC583 AAACGTCGTCCTTCTGCTCTTGGGCCAGGTGGTTTAACTCGTGAGCGTGCAGGTTTTGAA 1680
 B.b-CIP57.17 AAACGTCGTCCTTCTGCTCTTGGGCCAGGTGGTTTAACTCGTGAGCGTGCAGGTTTTGAA 1488

 B.b-USM-LMMB-005 GTGCGCGATGTGCATCCTACGCATTATGGTCGTATTTGTCCGATTGAACGCCTGAAGGT 1548
 B.b-USM-LMMB-006 GTGCGCGATGTGCATCCTACGCATTATGGTCGTATTTGTCCGATTGAACGCCTGAAGGT 1548
 B.b-USM-LMMB-007 GTGCGCGATGTGCATCCTACGCATTATGGTCGTATTTGTCCGATTGAACGCCTGAAGGT 1548
 B.b-KC583 GTGCGCGATGTGCATCCTACGCATTATGGTCGTATTTGTCCGATTGAACGCCTGAAGGT 1740
 B.b-CIP57.17 GTGCGCGATGTGCATCCTACGCATTATGGTCGTATTTGTCCGATTGAACGCCTGAAGGT 1548

 B.b-USM-LMMB-005 CCAAATATTGGATTGATTAATTTCTTTAGCGACTTTTGC GCGAGTTAATAAATATGGTTTC 1608
 B.b-USM-LMMB-006 CCAAATATTGGATTGATTAATTTCTTTAGCGACTTTTGC GCGAGTTAATAAATATGGTTTC 1608
 B.b-USM-LMMB-007 CCAAATATTGGATTGATTAATTTCTTTAGCGACTTTTGC GCGAGTTAATAAATATGGTTTC 1608
 B.b-KC583 CCAAATATTGGATTGATTAATTTCTTTAGCGACTTTTGC GCGAGTTAATAAATATGGTTTC 1800
 B.b-CIP57.17 CCAAATATTGGATTGATTAATTTCTTTAGCGACTTTTGC GCGAGTTAATAAATATGGTTTC 1608

 B.b-USM-LMMB-005 ATTGAGAGTCCATATCGCAAAATTACCGATGGTAAAGTGACGACTGAGGTTGTTTATCTT 1668
 B.b-USM-LMMB-006 ATTGAGAGTCCATATCGCAAAATTACCGATGGTAAAGTGACGACTGAGGTTGTTTATCTT 1668
 B.b-USM-LMMB-007 ATTGAGAGTCCATATCGCAAAATTACCGATGGTAAAGTGACGACTGAGGTTGTTTATCTT 1668
 B.b-KC583 ATTGAGAGTCCATATCGCAAAATTACCGATGGTAAAGTGACGACTGAGGTTGTTTATCTT 1860
 B.b-CIP57.17 ATTGAGAGTCCATATCGCAAAATTACCGATGGTAAAGTGACGACTGAGGTTGTTTATCTT 1668

 B.b-USM-LMMB-005 TCTGCTATGGAAGAAGCAAAACATTTATGTAGCTCAAGCCAAATTTCTTCACTAGATTCAGAA 1728
 B.b-USM-LMMB-006 TCTGCTATGGAAGAAGCAAAACATTTATGTAGCTCAAGCCAAATTTCTTCACTAGATTCAGAA 1728
 B.b-USM-LMMB-007 TCTGCTATGGAAGAAGCAAAACATTTATGTAGCTCAAGCCAAATTTCTTCACTAGATTCAGAA 1728
 B.b-KC583 TCTGCTATGGAAGAAGCAAAACATTTATGTAGCTCAAGCCAAATTTCTTCACTAGATTCAGAA 1920
 B.b-CIP57.17 TCTGCTATGGAAGAAGCAAAACATTTATGTAGCTCAAGCCAAATTTCTTCACTAGATTCAGAA 1728

 B.b-USM-LMMB-005 GGACGTTTTCACAGAAGAGTTTGTAGTTTGTCTCATGCAGGTGAAGTTTTGATGGTGCCA 1788
 B.b-USM-LMMB-006 GGACGTTTTCACAGAAGAGTTTGTAGTTTGTCTCATGCAGGTGAAGTTTTGATGGTGCCA 1788
 B.b-USM-LMMB-007 GGACGTTTTCACAGAAGAGTTTGTAGTTTGTCTCATGCAGGTGAAGTTTTGATGGTGCCA 1788
 B.b-KC583 GGACGTTTTCACAGAAGAGTTTGTAGTTTGTCTCATGCAGGTGAAGTTTTGATGGTGCCA 1980
 B.b-CIP57.17 GGACGTTTTCACAGAAGAGTTTGTAGTTTGTCTCATGCAGGTGAAGTTTTGATGGTGCCA 1788

 B.b-USM-LMMB-005 CGTGATCACATAGATTTAATGGATGTTTCAACAAAACAGTTGGTTTCTGTAGCTGCTTCT 1848
 B.b-USM-LMMB-006 CGTGATCACATAGATTTAATGGATGTTTCAACAAAACAGTTGGTTTCTGTAGCTGCTTCT 1848
 B.b-USM-LMMB-007 CGTGATCACATAGATTTAATGGATGTTTCAACAAAACAGTTGGTTTCTGTAGCTGCTTCT 1848
 B.b-KC583 CGTGATCACATAGATTTAATGGATGTTTCAACAAAACAGTTGGTTTCTGTAGCTGCTTCT 2040
 B.b-CIP57.17 CGTGATCACATAGATTTAATGGATGTTTCAACAAAACAGTTGGTTTCTGTAGCTGCTTCT 1848

 B.b-USM-LMMB-005 CTTATTCCATTTTTGGAAAAATGATGATGCGAATCGTGCGTTAATGGGATCAAACATGCAA 1908
 B.b-USM-LMMB-006 CTTATTCCATTTTTGGAAAAATGATGATGCGAATCGTGCGTTAATGGGATCAAACATGCAA 1908
 B.b-USM-LMMB-007 CTTATTCCATTTTTGGAAAAATGATGATGCGAATCGTGCGTTAATGGGATCAAACATGCAA 1908
 B.b-KC583 CTTATTCCATTTTTGGAAAAATGATGATGCGAATCGTGCGTTAATGGGATCAAACATGCAA 2100
 B.b-CIP57.17 CTTATTCCATTTTTGGAAAAATGATGATGCGAATCGTGCGTTAATGGGATCAAACATGCAA 1908

```

B.b-USM-LMMB-005 CGTCAAGCAGTTCCATTGATCCGTTCTGAAGCACCAATTTGTTGGTACAGGTATGGAGGCA 1968
B.b-USM-LMMB-006 CGTCAAGCAGTTCCATTGATCCGTTCTGAAGCACCAATTTGTTGGTACAGGTATGGAGGCA 1968
B.b-USM-LMMB-007 CGTCAAGCAGTTCCATTGATCCGTTCTGAAGCACCAATTTGTTGGTACAGGTATGGAGGCA 1968
B.b-KC583 CGTCAAGCAGTTCCATTGATCCGTTCTGAAGCACCAATTTGTTGGTACAGGTATGGAGGCA 2160
B.b-CIP57.17 CGTCAAGCAGTTCCATTGATCCGTTCTGAAGCACCAATTTGTTGGTACAGGTATGGAGGCA 1968
*****

B.b-USM-LMMB-005 ATAGTGGCTCGTGATTGAGGTGCTGCTATTAGTGCAAAACGTGGTGGTATTGTTGATCAA 2028
B.b-USM-LMMB-006 ATAGTGGCTCGTGATTGAGGTGCTGCTATTAGTGCAAAACGTGGTGGTATTGTTGATCAA 2028
B.b-USM-LMMB-007 ATAGTGGCTCGTGATTGAGGTGCTGCTATTAGTGCAAAACGTGGTGGTATTGTTGATCAA 2028
B.b-KC583 ATAGTGGCTCGTGATTGAGGTGCTGCTATTAGTGCAAAACGTGGTGGTATTGTTGATCAA 2220
B.b-CIP57.17 ATAGTGGCTCGTGATTGAGGTGCTGCTATTAGTGCAAAACGTGGTGGTATTGTTGATCAA 2028
*****

B.b-USM-LMMB-005 GTTGATGCAACACGTATTGTTATTGCTGCAACAGAAGATTTAGATCCTTCAAATCTGGT 2088
B.b-USM-LMMB-006 GTTGATGCAACACGTATTGTTATTGCTGCAACAGAAGATTTAGATCCTTCAAATCTGGT 2088
B.b-USM-LMMB-007 GTTGATGCAACACGTATTGTTATTGCTGCAACAGAAGATTTAGATCCTTCAAATCTGGT 2088
B.b-KC583 GTTGATGCAACACGTATTGTTATTGCTGCAACAGAAGATTTAGATCCTTCAAATCTGGT 2280
B.b-CIP57.17 GTTGATGCAACACGTATTGTTATTGCTGCAACAGAAGATTTAGATCCTTCAAATCTGGT 2088
*****

B.b-USM-LMMB-005 GTTGATATTTATCGCTTGCAAAAATTTGAGCGTTCCAATCAATCTACATGTATTAATCAG 2148
B.b-USM-LMMB-006 GTTGATATTTATCGCTTGCAAAAATTTGAGCGTTCCAATCAATCTACATGTATTAATCAG 2148
B.b-USM-LMMB-007 GTTGATATTTATCGCTTGCAAAAATTTGAGCGTTCCAATCAATCTACATGTATTAATCAG 2148
B.b-KC583 GTTGATATTTATCGCTTGCAAAAATTTGAGCGTTCCAATCAATCTACATGTATTAATCAG 2340
B.b-CIP57.17 GTTGATATTTATCGCTTGCAAAAATTTGAGCGTTCCAATCAATCTACATGTATTAATCAG 2148
*****

B.b-USM-LMMB-005 CGTCCTCTTTGTACATGTTGGTGACCGGATAGAAAAGGGTGATATCATTTGCTGATGGTCCA 2208
B.b-USM-LMMB-006 CGTCCTCTTTGTACATGTTGGTGACCGGATAGAAAAGGGTGATATCATTTGCTGATGGTCCA 2208
B.b-USM-LMMB-007 CGTCCTCTTTGTACATGTTGGTGACCGGATAGAAAAGGGTGATATCATTTGCTGATGGTCCA 2208
B.b-KC583 CGTCCTCTTTGTACATGTTGGTGACCGGATAGAAAAGGGTGATATCATTTGCTGATGGTCCA 2400
B.b-CIP57.17 CGTCCTCTTTGTACATGTTGGTGACCGGATAGAAAAGGGTGATATCATTTGCTGATGGTCCA 2208
*****

B.b-USM-LMMB-005 TCAACTGATCTTGGTGATTTAGCTCTTGGGCGGAATGTTCTTGTAGCATTTATGCCTTGG 2268
B.b-USM-LMMB-006 TCAACTGATCTTGGTGATTTAGCTCTTGGGCGGAATGTTCTTGTAGCATTTATGCCTTGG 2268
B.b-USM-LMMB-007 TCAACTGATCTTGGTGATTTAGCTCTTGGGCGGAATGTTCTTGTAGCATTTATGCCTTGG 2268
B.b-KC583 TCAACTGATCTTGGTGATTTAGCTCTTGGGCGGAATGTTCTTGTAGCATTTATGCCTTGG 2460
B.b-CIP57.17 TCAACTGATCTTGGTGATTTAGCTCTTGGGCGGAATGTTCTTGTAGCATTTATGCCTTGG 2268
*****

B.b-USM-LMMB-005 AATGGGTACAATTACGAAGACTCTATTTTGGCTTTCTGAGCGTATCGTTGCTGATGATGTA 2328
B.b-USM-LMMB-006 AATGGGTACAATTACGAAGACTCTATTTTGGCTTTCTGAGCGTATCGTTGCTGATGATGTA 2328
B.b-USM-LMMB-007 AATGGGTACAATTACGAAGACTCTATTTTGGCTTTCTGAGCGTATCGTTGCTGATGATGTA 2328
B.b-KC583 AATGGGTACAATTACGAAGACTCTATTTTGGCTTTCTGAGCGTATCGTTGCTGATGATGTA 2520
B.b-CIP57.17 AATGGGTACAATTACGAAGACTCTATTTTGGCTTTCTGAGCGTATCGTTGCTGATGATGTA 2328
*****

B.b-USM-LMMB-005 TTTACTTCGATTCATATTGAAGAATTTGAAGTTGCTGCACGTGATATGAAACTTGGGCCG 2388
B.b-USM-LMMB-006 TTTACTTCGATTCATATTGAAGAATTTGAAGTTGCTGCACGTGATATGAAACTTGGGCCG 2388
B.b-USM-LMMB-007 TTTACTTCGATTCATATTGAAGAATTTGAAGTTGCTGCACGTGATATGAAACTTGGGCCG 2388
B.b-KC583 TTTACTTCGATTCATATTGAAGAATTTGAAGTTGCTGCACGTGATATGAAACTTGGGCCG 2580
B.b-CIP57.17 TTTACTTCGATTCATATTGAAGAATTTGAAGTTGCTGCACGTGATATGAAACTTGGGCCG 2388
*****

B.b-USM-LMMB-005 GAAGAGATTACTCGTGATATTCTTAATGTTGCAGAAGAGGCATTAAGGAATCTTGATGAA 2448
B.b-USM-LMMB-006 GAAGAGATTACTCGTGATATTCTTAATGTTGCAGAAGAGGCATTAAGGAATCTTGATGAA 2448
B.b-USM-LMMB-007 GAAGAGATTACTCGTGATATTCTTAATGTTGCAGAAGAGGCATTAAGGAATCTTGATGAA 2448
B.b-KC583 GAAGAGATTACTCGTGATATTCTTAATGTTGCAGAAGAGGCATTAAGGAATCTTGATGAA 2640
B.b-CIP57.17 GAAGAGATTACTCGTGATATTCTTAATGTTGCAGAAGAGGCATTAAGGAATCTTGATGAA 2448
*****

B.b-USM-LMMB-005 GCTGGTATTGCTATATTGGTGCTGAAGTTCAACCT----- 2484
B.b-USM-LMMB-006 GCTGGTATTGCTATATTGGTGCTGAAGTTCAACCT----- 2484
B.b-USM-LMMB-007 GCTGGTATTGCTATATTGGTGCTGAAGTTCAACCT----- 2484
B.b-KC583 GCTGGTATTGCTATATTGGTGCTGAAGTTCAACCTGGTGATATTTTGGTGGTAAATTT 2700
B.b-CIP57.17 GCTGGTATTGCTATATTGGTGCTGAAGTTCAACCT----- 2484
*****

```

Figura 25. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas de *rpoB* de *B. bacilliformis* KC 583 (ID: 4683812) y las aisladas, utilizando el programa ClustalW 2.1. No encontrándose diferencias entre ellas.

5.10.2 Secuencias aminoacídicas de RpoB: Mediante el análisis de las secuencias aminoacídicas de la subunidad β de la RNA polimerasa de las cepas de *B. bacilliformis* analizadas, no se encontró ninguna diferencia entre ellas en la región determinante de resistencia a rifampicina (RRDR). En relación con la secuencia de *E. coli* K-12 se encontró una diferencia muy cercana al RRDR en el aminoácido 499 de S por A (posición 513 para *B. bacilliformis*). El aminoácido en posición 531 (Serina) reportado en la literatura, es el más cambiante para cepas resistentes a rifampicina, en *B. quintana* es idéntico para *B. bacilliformis* como se muestra en la Figura 26.

B.b-USM-LMMB-005	KVLFAARVIPYRGSWLDIEFDAKDIVYARIDRRRKIPVTSFLMALGMDASDILSTFYNKV	176
B.b-KC583	KVLFAARVIPYRGSWLDIEFDAKDIVYARIDRRRKIPVTSFLMALGMDASDILSTFYNKV	240
B.b-USM-LMMB-006	KVLFAARVIPYRGSWLDIEFDAKDIVYARIDRRRKIPVTSFLMALGMDASDILSTFYNKV	176
B.b-USM-LMMB-007	KVLFAARVIPYRGSWLDIEFDAKDIVYARIDRRRKIPVTSFLMALGMDASDILSTFYNKV	176
B.b-CIP57.17	KVLFAARVIPYRGSWLDIEFDAKDIVYARIDRRRKIPVTSFLMALGMDASDILSTFYNKV	176
B.quintana Toulouse	KFLFAARVIPYRGSWLDIEFDAKDIIYARIDRRRKIPITSLLMALGMDASDILSTFYNKV	240
E.c-str.K-12-MG1655	KVLYNARIIPYRGSWLDIEFDPKDNLFVRIDRRRKLPAITILRALNYTTEQILDLFEEKV	228
	: **.*.....**.** :.:*****:*_* :_*_* . :.:**.*_*:*	
B.b-USM-LMMB-005	TYERVESGWRIPYSVDRFKGVKLVSDLVDAESGEVVAEAGKKLTARTAKLLVEKGLKAIR	236
B.b-KC583	TYERVESGWRIPYSVDRFKGVKLVSDLVDAESGEVVAEAGKKLTARTAKLLVEKGLKAIR	300
B.b-USM-LMMB-006	TYERVESGWRIPYSVDRFKGVKLVSDLVDAESGEVVAEAGKKLTARTAKLLVEKGLKAIR	236
B.b-USM-LMMB-007	TYERVESGWRIPYSVDRFKGVKLVSDLVDAESGEVVAEAGKKLTARTAKLLVEKGLKAIR	236
B.b-CIP57.17	TYERVESGWRIPYSVDRFKGVKLVSDLVDAESGEVVAEAGKKLTARTAKLLVEKGLKAIR	236
B.quintana Toulouse	TYERDGDGWRIPYSVGRFKGVKLISDLVDADSGEVVAEAGKKLTVRAAKALAEKGLKAVK	300
E.c-str.K-12-MG1655	IFEIRDNKLQMELVPERLRFGETASFDEIAN--GKVYVEKGRITARHIRQLEKDDVKLIE	286
	:* . :.: *:* . * : *_*_*_*:*. * :_* :.:*_* :.	
B.b-USM-LMMB-005	VSEDELLGSYLADDIVNYETGEIYLEAGDEIDEKVLKVLFDVGANQINILDIDHMSVGAY	296
B.b-KC583	VSEDELLGSYLADDIVNYETGEIYLEAGDEIDEKVLKVLFDVGANQINILDIDHMSVGAY	360
B.b-USM-LMMB-006	VSEDELLGSYLADDIVNYETGEIYLEAGDEIDEKVLKVLFDVGANQINILDIDHMSVGAY	296
B.b-USM-LMMB-007	VSEDELLGSYLADDIVNYETGEIYLEAGDEIDEKVLKVLFDVGANQINILDIDHMSVGAY	296
B.b-CIP57.17	VSEDELLGSYLADDIVNYETGEIYLEAGDEIDEKVLKVLFDVGANQINILDIDHMSVGAY	296
B.quintana Toulouse	ITEDDLLGSYLAEDIVNYQTGEIYLEAGDEIDEKALKILFDVSADQINILDIDHMNIGAY	360
E.c-str.K-12-MG1655	VPVEYIAGKVVAKDYIDESTGELICAA NMELSLDLLAKLSQSGHKRIETLFTNDLDHGPKY	346
	:. : : * . :.*_* :.: .***: * . * :. . * * : . :.*_* :. :. . *_*	
B.b-USM-LMMB-005	IRNTLKVDKNESRQDALFDIYRVMRPGEPPPTIDTAEAMFHSLFFDSERYDLSAVGRVKMN	356
B.b-KC583	IRNTLKVDKNESRQDALFDIYRVMRPGEPPPTIDTAEAMFHSLFFDSERYDLSAVGRVKMN	420
B.b-USM-LMMB-006	IRNTLKVDKNESRQDALFDIYRVMRPGEPPPTIDTAEAMFHSLFFDSERYDLSAVGRVKMN	356
B.b-USM-LMMB-007	IRNTLKVDKNESRQDALFDIYRVMRPGEPPPTIDTAEAMFHSLFFDSERYDLSAVGRVKMN	356
B.b-CIP57.17	IRNTLKVDKNESRQDALFDIYRVMRPGEPPPTIDTAEAMFHSLFFDSERYDLSAVGRVKMN	356
B.quintana Toulouse	IRNTLKVDKNESRQDALFDIYRVMRPGEPPPTMDTAAAMFHSLFFDPERYDLSAVGRVKMN	420
E.c-str.K-12-MG1655	ISETLRVDP TNDRLSALVEIYRMMRPGEPPPTREAAESLFENLFFS EDRYDLSAVGRMKFN	406
	:**** :.:. :.*_*:***.*.....**.*_* :_* :_*_*_*_* . :*****:*_*	

5.11 Análisis *in silico* del gen *rpID* de la proteína ribosomal L4

5.11.1 Secuencias nucleotídicas de *rpID* ribosomal: Mediante el análisis de las secuencias nucleotídicas del gen *rpID* de las cepas de *B. bacilliformis* se encontró cuatro mutaciones puntuales en el aislado USM-LMMB-005 de los cuales una produjo cambios en el codón teniendo como resultado una Alanina por Triptofano (codón 13). También se observa en el codón 6 un cambio, pero se debe a que los *primers* empleados fueron los de *B. quintana* que también amplifica para *B. bacilliformis* como se observa en la Figura 27.

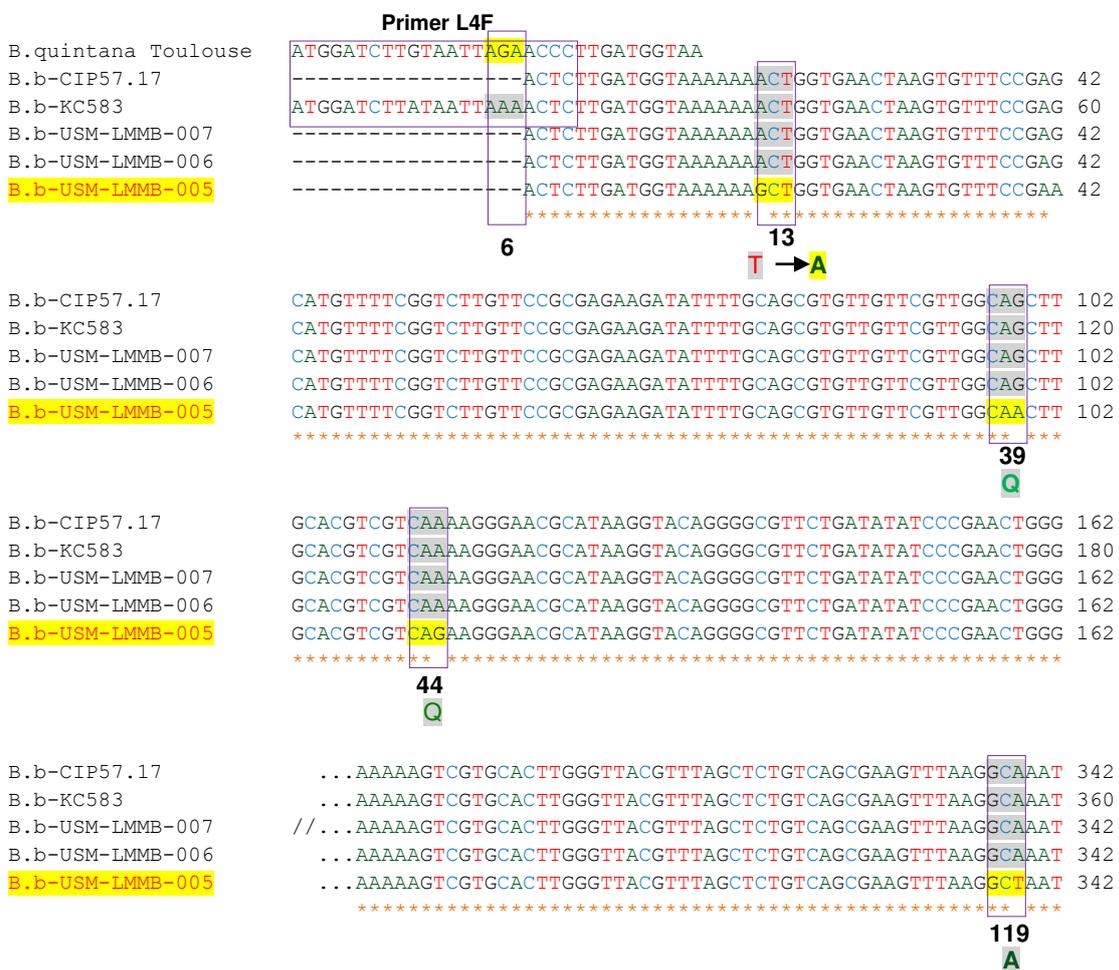


Figura 27. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas del gen *rpID* de la cepa *B. bacilliformis* KC583 (ID: 4683931) y las aisladas, utilizando el programa ClustalW 2.1. Se indica las mutaciones para la cepa USM-LMMB-005 resaltadas con color amarillo. La numeración en negra corresponde al codón traducido de *B. bacilliformis*.

5.12 Análisis *in silico* del gen *rRNA* 16S

5.12.1 Secuencias del gen *rRNA* 16S: Mediante el análisis de las secuencias del gen *rRNA* 16S de las cepas de *B. bacilliformis* comparadas en el presente estudio, no presentaron ninguna diferencia entre ellas siendo conservado el gen para las cepas estudiadas; se compararon con la secuencia *rRNA* 16S de *B. henselae* en donde estudios *in vitro* han encontrado una mutación en la posición 1408 de G (cepas resistentes) por A (nativa con fenotipo sensible), como se muestra en la Figura 29.

```

B.b-USM-LMMB-005 -----
B.b-KC583 -----TTTGATCCTGGCTCAGAACGACCGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGC 47
B.b-USM-LMMB-006 -----
B.b-USM-LMMB-007 -----
B.b-CIP57.17 -----
B.henselae Houston-1 TTCAATATGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGACCGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGC 60

B.b-USM-LMMB-005 -----GAGTGAGCGGCAGACGGGTGAGTAAACGCGTGGGAATCTAC 40
B.b-KC583 AAGTCGAGCGCAGCTCTTTTGGAGTGAGCGGCAGACGGGTGAGTAAACGCGTGGGAATCTAC 107
B.b-USM-LMMB-006 -----GAGTGAGCGGCAGACGGGTGAGTAAACGCGTGGGAATCTAC 40
B.b-USM-LMMB-007 -----GAGTGAGCGGCAGACGGGTGAGTAAACGCGTGGGAATCTAC 40
B.b-CIP57.17 -----GAGTGAGCGGCAGACGGGTGAGTAAACGCGTGGGAATCTAC 40
B.henselae Houston-1 AAGTCGAGCGCAGCTCTTTTGGAGTGAGCGGCAGAACGCGGTGAGTAAACGCGTGGGAATCTAC 120
                        *****
                        *****

B.b-USM-LMMB-005 CCATCTCTACGGAAATAACACAGAGAAATTTGTGCTAATACCGTATACGTCCTTCGGGAGA 100
B.b-KC583 CCATCTCTACGGAAATAACACAGAGAAATTTGTGCTAATACCGTATACGTCCTTCGGGAGA 167
B.b-USM-LMMB-006 CCATCTCTACGGAAATAACACAGAGAAATTTGTGCTAATACCGTATACGTCCTTCGGGAGA 100
B.b-USM-LMMB-007 CCATCTCTACGGAAATAACACAGAGAAATTTGTGCTAATACCGTATACGTCCTTCGGGAGA 100
B.b-CIP57.17 CCATCTCTACGGAAATAACACAGAGAAATTTGTGCTAATACCGTATACGTCCTTCGGGAGA 100
B.henselae Houston-1 CCATCTCTACGGAAATAACACAGAGAAATTTGTGCTAATACCGTATACGTCCTTCGGGAGA 180
                        *****
                        *****

B.b-USM-LMMB-005 AAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCCC 160
B.b-KC583 AAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCCC 227
B.b-USM-LMMB-006 AAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCCC 160
B.b-USM-LMMB-007 AAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCCC 160
B.b-CIP57.17 AAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCCC 160
B.henselae Houston-1 AAGATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGGCTC 240
                        *****
                        *****

B.b-USM-LMMB-005 ACCAAGGCACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACA 220
B.b-KC583 ACCAAGGCACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACA 287
B.b-USM-LMMB-006 ACCAAGGCACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACA 220
B.b-USM-LMMB-007 ACCAAGGCACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACA 220
B.b-CIP57.17 ACCAAGGCACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACA 220
B.henselae Houston-1 ACCAAGGCACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACA 300
                        *****
                        *****

B.b-USM-LMMB-005 CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCCTGA 280
B.b-KC583 CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCCTGA 347
B.b-USM-LMMB-006 CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCCTGA 280
B.b-USM-LMMB-007 CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCCTGA 280
B.b-CIP57.17 CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCCTGA 280
B.henselae Houston-1 CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCCTGA 360
                        *****
                        *****

```

B.b-USM-LMMB-005 TCCAGCCATGCCGCGTAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCACCGGTGAA 340
B.b-KC583 TCCAGCCATGCCGCGTAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCACCGGTGAA 407
B.b-USM-LMMB-006 TCCAGCCATGCCGCGTAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCACCGGTGAA 340
B.b-USM-LMMB-007 TCCAGCCATGCCGCGTAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCACCGGTGAA 340
B.b-CIP57.17 TCCAGCCATGCCGCGTAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCACCGGTGAA 340
B.henselae Houston-1 TCCAGCCATGCCGCGTAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCACCGGTGAA 420

B.b-USM-LMMB-005 GATAATGACGGTAGCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA 400
B.b-KC583 GATAATGACGGTAGCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA 467
B.b-USM-LMMB-006 GATAATGACGGTAGCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA 400
B.b-USM-LMMB-007 GATAATGACGGTAGCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA 400
B.b-CIP57.17 GATAATGACGGTAGCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA 400
B.henselae Houston-1 GATAATGACGGTAGCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA 480

B.b-USM-LMMB-005 ACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCATGTAGGCCGATATTT 460
B.b-KC583 ACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCATGTAGGCCGATATTT 527
B.b-USM-LMMB-006 ACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCATGTAGGCCGATATTT 460
B.b-USM-LMMB-007 ACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCATGTAGGCCGATATTT 460
B.b-CIP57.17 ACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCATGTAGGCCGATATTT 460
B.henselae Houston-1 ACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCATGTAGGCCGATATTT 540

B.b-USM-LMMB-005 AAGTCAGAGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCTTGGAACTGCCTTTGATACTGGATGCTCG 520
B.b-KC583 AAGTCAGAGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCTTGGAACTGCCTTTGATACTGGATGCTCG 587
B.b-USM-LMMB-006 AAGTCAGAGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCTTGGAACTGCCTTTGATACTGGATGCTCG 520
B.b-USM-LMMB-007 AAGTCAGAGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCTTGGAACTGCCTTTGATACTGGATGCTCG 520
B.b-CIP57.17 AAGTCAGAGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCTTGGAACTGCCTTTGATACTGGATGCTCG 520
B.henselae Houston-1 AAGTCAGAGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCTTGGAACTGCCTTTGATACTGGATGCTCG 600

B.b-USM-LMMB-005 AGTATGGAAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTG TAGAGGTAAAATTCGTAGATATTCGGAGG 580
B.b-KC583 AGTATGGAAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTG TAGAGGTAAAATTCGTAGATATTCGGAGG 647
B.b-USM-LMMB-006 AGTATGGAAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTG TAGAGGTAAAATTCGTAGATATTCGGAGG 580
B.b-USM-LMMB-007 AGTATGGAAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTG TAGAGGTAAAATTCGTAGATATTCGGAGG 580
B.b-CIP57.17 AGTATGGAAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTG TAGAGGTAAAATTCGTAGATATTCGGAGG 580
B.henselae Houston-1 AGTATGGAAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTG TAGAGGTAAAATTCGTAGATATTCGGAGG 660
*** *****

B.b-USM-LMMB-005 AACACCAGTGCCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGG 640
B.b-KC583 AACACCAGTGCCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGG 707
B.b-USM-LMMB-006 AACACCAGTGCCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGG 640
B.b-USM-LMMB-007 AACACCAGTGCCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGG 640
B.b-CIP57.17 AACACCAGTGCCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGG 640
B.henselae Houston-1 AACACCAGTGCCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGG 720

B.b-USM-LMMB-005 GGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAATGTTAGCCGTC 700
B.b-KC583 GGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAATGTTAGCCGTC 767
B.b-USM-LMMB-006 GGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAATGTTAGCCGTC 700
B.b-USM-LMMB-007 GGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAATGTTAGCCGTC 700
B.b-CIP57.17 GGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAATGTTAGCCGTC 700
B.henselae Houston-1 GGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAATGTTAGCCGTC 780

B.b-USM-LMMB-005 GGGCAGTTTACTGCTCGGTGGCGCAGCTAACGCGTTAAACATTCCGCCTGGGGAGTACGG 760
 B.b-KC583 GGGCAGTTTACTGCTCGGTGGCGCAGCTAACGCGTTAAACATTCCGCCTGGGGAGTACGG 827
 B.b-USM-LMMB-006 GGGCAGTTTACTGCTCGGTGGCGCAGCTAACGCGTTAAACATTCCGCCTGGGGAGTACGG 760
 B.b-USM-LMMB-007 GGGCAGTTTACTGCTCGGTGGCGCAGCTAACGCGTTAAACATTCCGCCTGGGGAGTACGG 760
 B.b-CIP57.17 GGGCAGTTTACTGCTCGGTGGCGCAGCTAACGCGTTAAACATTCCGCCTGGGGAGTACGG 760
 B.henselae Houston-1 GGGCGGTTTACTGCTCGGTGGCGCAGCTAACGCGTTAAACATTCCGCCTGGGGAGTACGG 840

B.b-USM-LMMB-005 TCGCAAGATTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGT 820
 B.b-KC583 TCGCAAGATTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGT 887
 B.b-USM-LMMB-006 TCGCAAGATTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGT 820
 B.b-USM-LMMB-007 TCGCAAGATTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGT 820
 B.b-CIP57.17 TCGCAAGATTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGT 820
 B.henselae Houston-1 TCGCAAGATTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGT 900

B.b-USM-LMMB-005 TTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGAGAGTGG 880
 B.b-KC583 TTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGAGAGTGG 947
 B.b-USM-LMMB-006 TTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGAGAGTGG 880
 B.b-USM-LMMB-007 TTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGAGAGTGG 880
 B.b-CIP57.17 TTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGAGAGTGG 880
 B.henselae TTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGAGAGTGG 960

B.b-USM-LMMB-005 AGACACTTTCTTCAGTTAGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTC 940
 B.b-KC583 AGACACTTTCTTCAGTTAGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTC 1007
 B.b-USM-LMMB-006 AGACACTTTCTTCAGTTAGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTC 940
 B.b-USM-LMMB-007 AGACACTTTCTTCAGTTAGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTC 940
 B.b-CIP57.17 AGACACTTTCTTCAGTTAGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTC 940
 B.henselae Houston-1 AGACACCCCTCCTTCAGTTAGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTC 1020

B.b-USM-LMMB-005 GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAG 1000
 B.b-KC583 GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAG 1067
 B.b-USM-LMMB-006 GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAG 1000
 B.b-USM-LMMB-007 GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAG 1000
 B.b-CIP57.17 GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAG 1000
 B.henselae Houston-1 GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAG 1080

B.b-USM-LMMB-005 CATTTCAGTTGGGCACCTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGA 1060
 B.b-KC583 CATTTCAGTTGGGCACCTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGA 1127
 B.b-USM-LMMB-006 CATTTCAGTTGGGCACCTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGA 1060
 B.b-USM-LMMB-007 CATTTCAGTTGGGCACCTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGA 1060
 B.b-CIP57.17 CATTTCAGTTGGGCACCTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGA 1060
 B.henselae Houston-1 CATTTCAGTTGGGCACCTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGA 1140

B.b-USM-LMMB-005 CGTCAAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAG 1120
 B.b-KC583 CGTCAAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAG 1187
 B.b-USM-LMMB-006 CGTCAAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAG 1120
 B.b-USM-LMMB-007 CGTCAAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAG 1120
 B.b-CIP57.17 CGTCAAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAG 1120
 B.henselae Houston-1 CGTCAAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAG 1200

```

B.b-USM-LMMB-005      TGGGCAGCGAAACCGCAAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCAC 1180
B.b-KC583             TGGGCAGCGAAACCGCAAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCAC 1247
B.b-USM-LMMB-006     TGGGCAGCGAAACCGCAAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCAC 1180
B.b-USM-LMMB-007     TGGGCAGCGAAACCGCAAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCAC 1180
B.b-CIP57.17         TGGGCAGCGAAACCGCAAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCAC 1180
B.henselae Houston-1 TGGGCAGCGAGACCGCGAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCAC 1260
*****

```

```

B.b-USM-LMMB-005      TCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGT 1240
B.b-KC583             TCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGT 1307
B.b-USM-LMMB-006     TCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGT 1240
B.b-USM-LMMB-007     TCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGT 1240
B.b-CIP57.17         TCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGT 1240
B.henselae Houston-1 TCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGT 1320
*****

```

Región altamente conservada

```

B.b-USM-LMMB-005      GAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCA1343CACCATGGGAGTGGT1340TTTTACCGG 1300
B.b-KC583             GAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCA1343CACCATGGGAGTGGT1340TTTTACCGG 1367
B.b-USM-LMMB-006     GAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCA1343CACCATGGGAGTGGT1340TTTTACCGG 1300
B.b-USM-LMMB-007     GAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCA1343CACCATGGGAGTGGT1340TTTTACCGG 1300
B.b-CIP57.17         GAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCA1343CACCATGGGAGTGGT1340TTTTACCGG 1300
B.henselae Houston-1 GAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCA1343CACCATGGGAGTGGT1340TTTTACCGG 1380
E.c-str.K-12-MG1655  GAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCA1343CACCATGGGAGTGGT1340TTTTACCGG 1420
*****

```

```

B.b-USM-LMMB-005      AAGGTGCTGTGCTAACCGCAAGGAAGCAGGCAACCACGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTGA 1360
B.b-KC583             AAGGTGCTGTGCTAACCGCAAGGAAGCAGGCAACCACGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTGA 1427
B.b-USM-LMMB-006     AAGGTGCTGTGCTAACCGCAAGGAAGCAGGCAACCACGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTGA 1360
B.b-USM-LMMB-007     AAGGTGCTGTGCTAACCGCAAGGAAGCAGGCAACCACGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTGA 1360
B.b-CIP57.17         AAGGTGCTGTGCTAACCGCAAGGAAGCAGGCAACCACGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTGA 1360
B.henselae Houston-1 AAGGTGCTGTGCTAACCGCAAGGGGGCAGGCAACCACGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTGA 1440
*****

```

```

B.b-USM-LMMB-005      AGTCG----- 1365
B.b-KC583             AGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCT----- 1472
B.b-USM-LMMB-006     AGTCG----- 1365
B.b-USM-LMMB-007     AGTCG----- 1365
B.b-CIP57.17         AGTCG----- 1365
B.henselae Houston-1 AGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGTGGCTGGATCACCTCCTTTCT 1492

```

Figura 29. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas del gen *rRNA* 16S de la cepa *B. bacilliformis* KC583 (NR_074203.1) y las de aisladas, comparadas con el gen *rRNA* 16S *B. henselae* (NR_074335.1) y *E. coli* K-12 (NR_102804.1), utilizando el programa ClustalW 2.1. Se indica una región altamente conservada comprendida en el recuadro rojo y dentro de esta región el nucleótido A en posición 1408 resaltado en color amarillo, que cuando cambia a G tienen fenotipo resistente a gentamicina. La numeración en la parte inferior corresponde a *E. coli* K-12 y en la parte superior su equivalente para *B. bacilliformis*.

5.13 Modelamiento por homología de las regiones determinantes de resistencia antimicrobiana en *B. bacilliformis*.

Luego de analizar las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones determinantes de resistencia a antimicrobianos de las cepas aisladas, se procedió a realizar el modelamiento molecular de las proteínas estudiadas para localizar, en la estructura terciaria, los aminoácidos involucrados con resistencia antimicrobiana y observar si existe diferencia a nivel de estructura, para ello se empleó el servidor online SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>). En las Figuras 30, 31, 32, 33 y 34 se muestran los resultados obtenidos del modelamiento molecular.

En la estructura terciaria del QRDR de GyrA de *B. bacilliformis* se pudo apreciar un cambio en la posición donde existe una diferencia aminoacídica de Ala por Ser, cuando se compara con *E. coli* K-12, el cambio es resaltado en el círculo rojo, sugiriendo una débil interacción entre las quinolonas. Como se observa en la Figura 30.

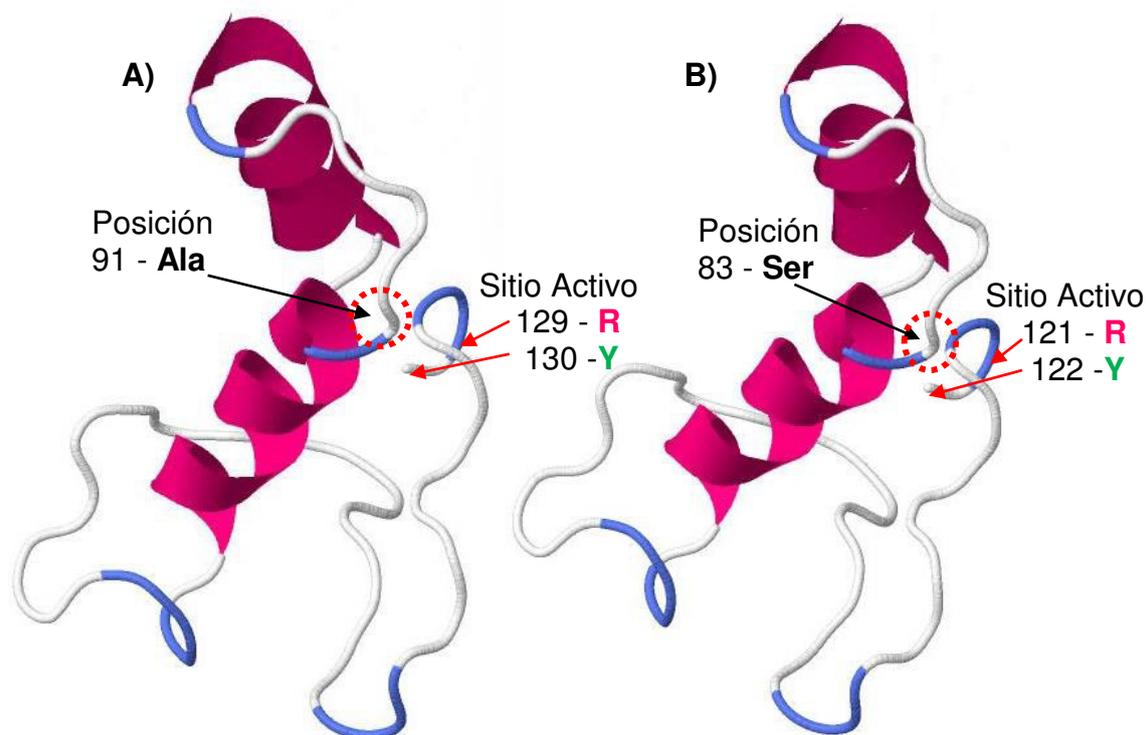


Figura 30.- Modelamiento de la estructura terciaria del QRDR de GyrA por homología con GyrA de *E. coli* K-12 (PDB: 2Y3P). En A, se muestra la región del QRDR de *B. bacilliformis*, y en B, el QRDR de *E. coli* K-12 MG1655. Las flechas de color negro indican las posiciones donde existe diferencias aminoacídicas de *B. bacilliformis* y *E. coli* K-12, observando un cambio en la posición 91 para *B. bacilliformis* resaltada en un círculo rojo, y las flechas rojas indican las posiciones correspondientes al sitio activo.

En la estructura terciaria del QRDR de GyrB de *B. bacilliformis* no se pudo apreciar cambios en las posición donde existe una diferencia aminoacídica de Arg por Lys, cuando se compara con *E. coli* K-12, como se observa en la Figura 31.

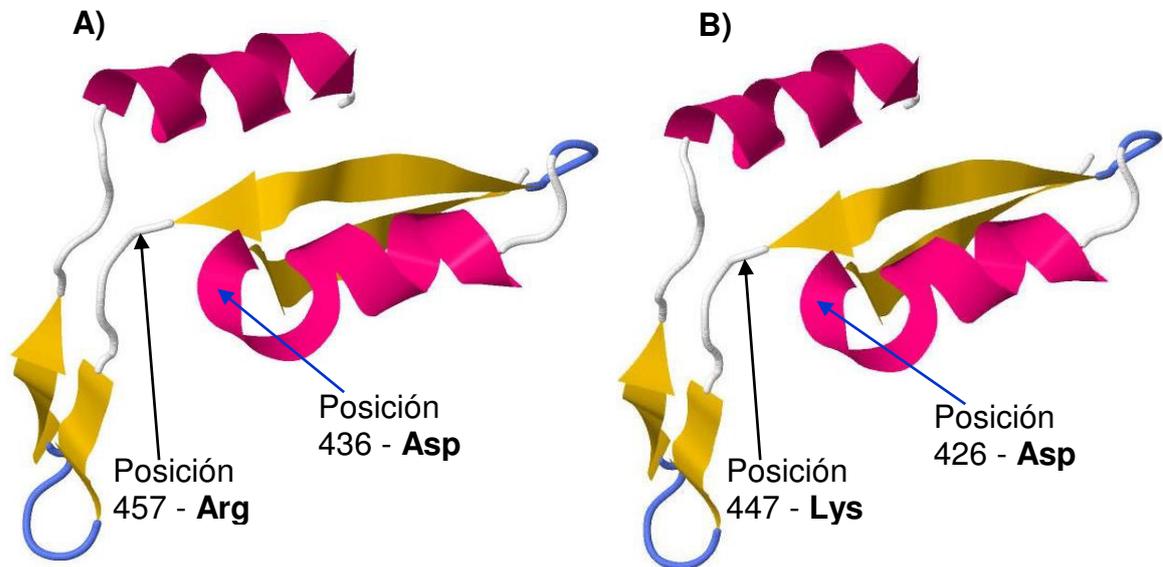


Figura 31.- Modelamiento de la estructura terciaria del QRDR de GyrB por homología con GyrB de *E. coli* K-12 (PDB: 3NUH). En A, se muestra la región del QRDR de *B. bacilliformis*, y en B, el QRDR de *E. coli* K-12. Las flechas de color negro indican las diferencias aminoacídicas de *B. bacilliformis* y *E. coli* K-12 MG1655, sin cambio en la posición 457 para *B. bacilliformis* y la flecha azul indica la localización del aminoácido Asp en donde se han reportado mutaciones para el caso de cepas resistentes a quinolonas.

En la estructura terciaria del QRDR de ParC de *B. bacilliformis* se pudo apreciar dos cambios en la estructura terciaria en las posiciones donde existe una diferencia aminoacídica de Ala por Ser, cuando se compara con *E. coli* K-12; los cambios son resaltados en círculo rojo, existiendo una débil interacción entre las quinolonas, como se observa en la Figura 32.

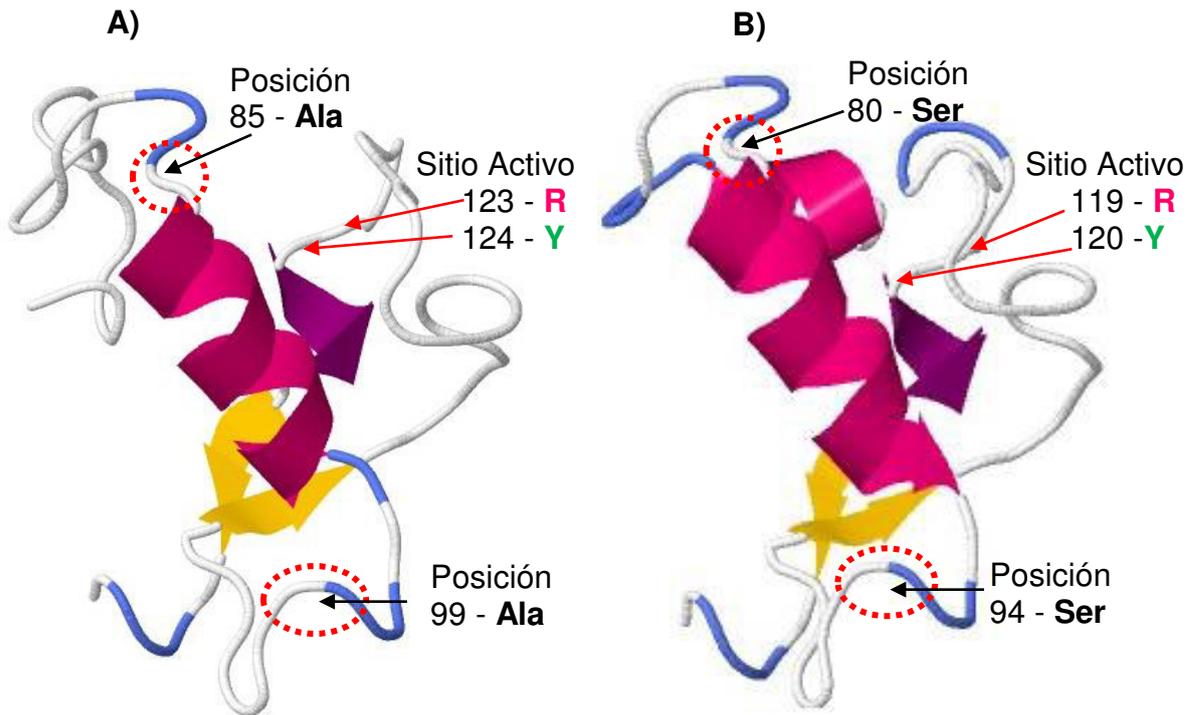


Figura 32.- Modelamiento de la estructura terciaria del QRDR de ParC por homología con ParC de *E. coli* (PDB: 1ZVU). En A, se muestra la región del QRDR de *B. bacilliformis*, y en B, el QRDR de *E. coli* K-12 MG1655. Las flechas de color negro indican la posición donde existe diferencias aminoacídicas de *B. bacilliformis* y *E. coli* K-12, observando un cambio en las posiciones para *B. bacilliformis* resaltadas en un círculo rojo, las flechas rojas indican las posiciones correspondientes al sitio activo.

En la estructura terciaria del QRDR de ParE de *B. bacilliformis* se pudo apreciar un cambio en la estructura terciaria en la posición donde existe una diferencia aminoacídica de Ala por Ser, cuando se compara con *E. coli* K-12; el cambio es resaltado en círculo rojo, sugiriendo una débil interacción entre las quinolonas, como se observa en la Figura 33.

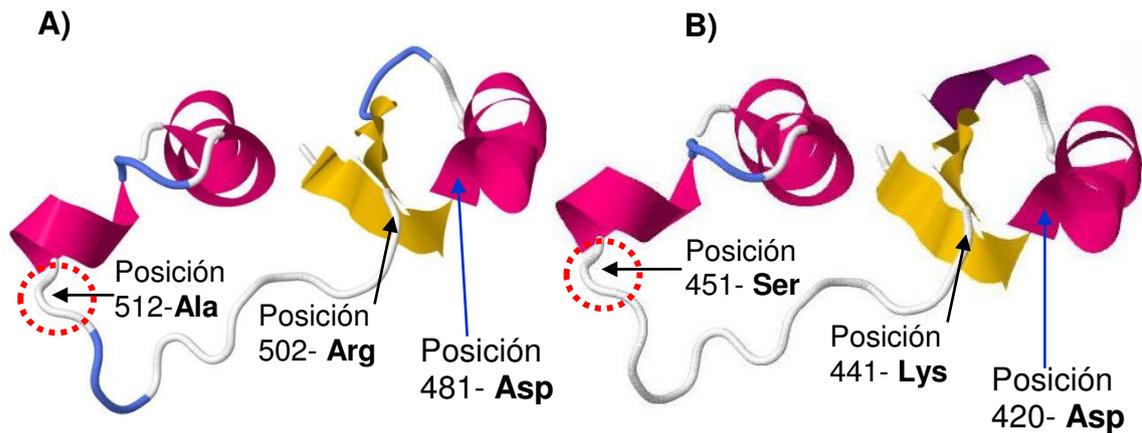


Figura 33.- Modelamiento de la estructura terciaria del QRDR de ParE por homología con ParE de *Acinetobacter baumannii* (PDB: 2XKK). En A, se muestra la región del QRDR de *B. bacilliformis*, y en B, la QRDR de *E. coli* K-12 MG1655. Las flechas de color negro indican la posición donde existe diferencias aminoacídicas de *B. bacilliformis* y *E. coli* K-12, observando un cambio en la posición para *B. bacilliformis*, resaltado en un círculo rojo, flecha azul indica la localización del aminoácido Asp en donde se han reportado cepas resistentes a quinolonas cuando ha mutado este aminoácido.

En la estructura terciaria del ERDR de L4 de *B. bacilliformis* se pudo apreciar un cambio en la posición donde existe una diferencia aminoacídica de Ala por Ser, cuando es comparado con *S. pneumoniae* R6 y *E. coli* K-12, estas últimas presentan Ser en esa posición, el cambio es resaltado en círculo rojo, como se observa en la Figura 34.

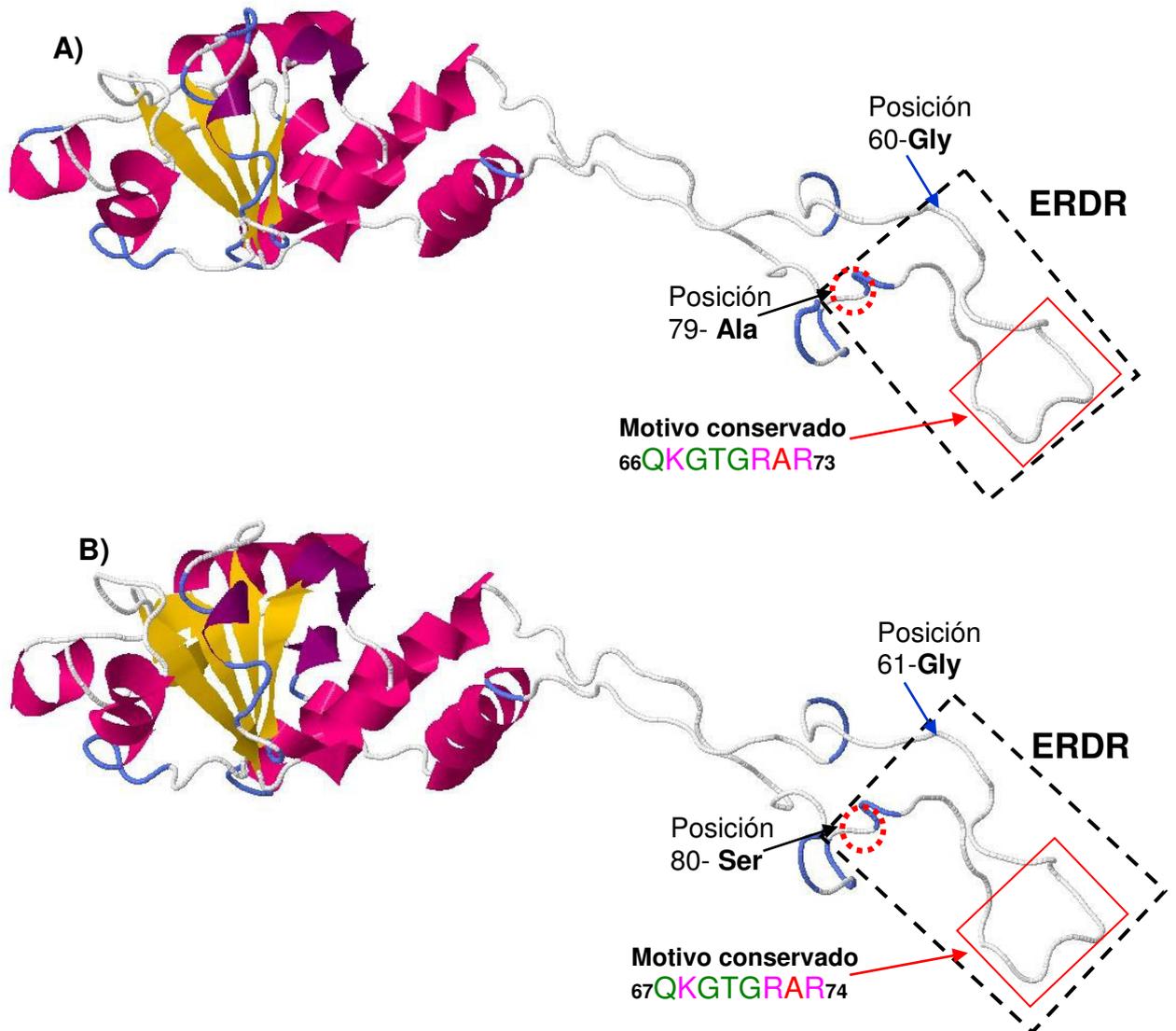


Figura 34.- Modelamiento de la estructura terciaria de la proteína L4 ribosomal por homología con L4 de *Escherichia coli* K-12 (PDB: 4GAU). En A, la proteína de *B. bacilliformis* y su ERDR (cuadro delineado de color negro), en B, la proteína de *S. pneumoniae* R6 y su ERDR. Las flechas de color negro indican la posición donde existe diferencia de *B. bacilliformis* y *S. pneumoniae* R6, observando un cambio en la posición resaltado en un círculo rojo para *B. bacilliformis*, la flecha azul indica la localización donde inicia el ERDR, luego se observa un motivo conservado de 8 aminoácidos (QKGTGRAR) dentro del ERDR en las especies alineadas en la Figura 28.

5.14 Modelamiento de la estructura secundaria de la región conservada del *rRNA 16S*

Luego del alineamiento en la Figura 29, se observó una región conservada de nucleótidos para *B. bacilliformis*, *B. henselae* y *E. coli* K-12 dentro de la cual se encuentra el nucleótido A1408 (numeración correspondiente a *E. coli*) que ha sido reportado en cepas resistentes a Gentamicina cuando cambia a G, el mismo cambio fue observado en cepas con resistencia al mismo antibiótico en *B. henselae*. A esta región se le realizó su modelo mediante el servidor RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>), como se observa en la Figura 35.

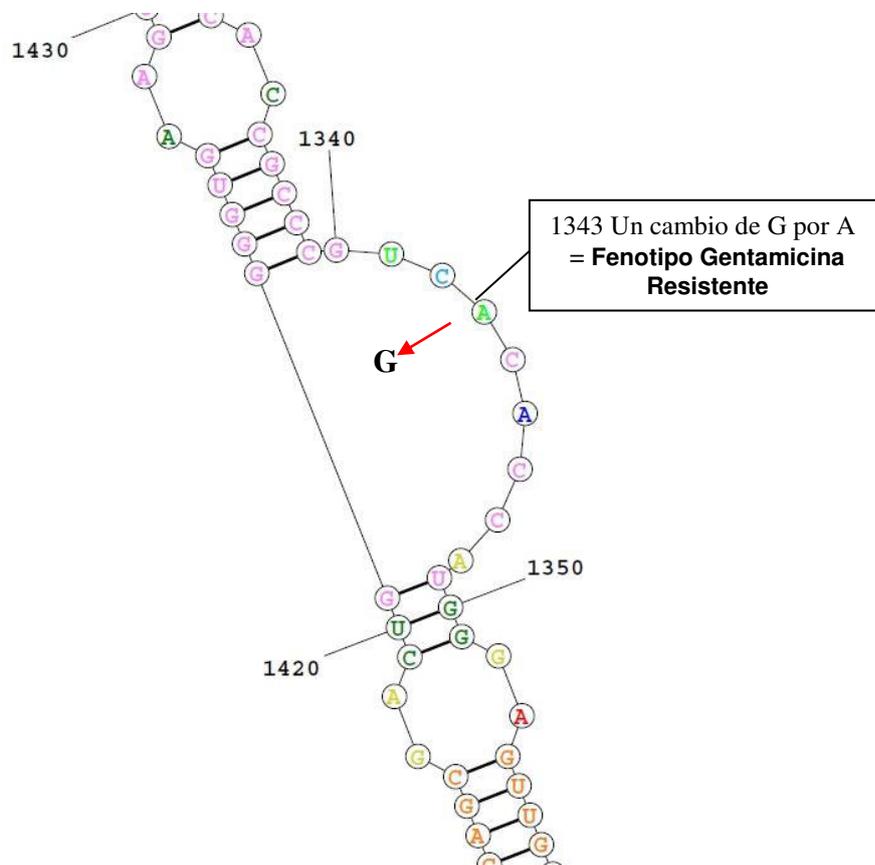


Figura 35.- Modelo de la estructura secundaria del rRNA 16S de la secuencia altamente conservada de *B. bacilliformis*, *E. coli*, y *B. henselae* en donde en esta última se ha obtenido mutantes resistentes a gentamicina mediante mutación en la posición 1408 de A por G. La numeración que indica la figura corresponde la *B. bacilliformis*

5.15 Análisis del perfil de hidrofobicidad de las QRDR de GyrA, ParC y ParE de *B. bacilliformis*

Luego de analizar los modelamientos y observar cambios en la estructura terciaria de las proteínas estudiadas, se procedió a realizar el perfil de hidrofobicidad de las regiones determinantes de resistencia para las proteínas GyrA, ParC y ParE de *B. bacilliformis* comparándolas con las de *E. coli* K-12, mediante el método de Kyte y Doolittle (1982) para predecir el carácter hidrofóbico de la región en estudio y que ocurre cuando existen los cambios de Ser por Ala, para ello se empleó el servidor online ProScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) de la Web ExPASy Bioinformatics Resource Portal.

Principio de la Escala: el carácter de hidrofobicidad es la propiedad de una cadena lateral a ser menos soluble en agua que en un disolvente apolar, luego de varios ensayos Kyte & Doolittle derivaron la siguiente escala de valores a los aminoácidos en la Tabla 13:

Tabla 13. Escala de valores de Kyte & Doolittle (1982)

G	-0.4	Q	-3.5	S	-0.8	Y	-1.3
A	1.8	K	-3.9	T	-0.7	W	-0.9
V	4.2	H	-3.2	D	-3.5	C	2.5
L	3.8	R	-4.5	E	-3.5	M	1.9
I	4.5	F	2.8	N	-3.5	P	-1.6

En el análisis de hidrofobicidad para el QRDR de GyrA, la presencia de Ala (posición 91 en *B. bacilliformis*), representado en el cuadrado de color amarillo incrementa la hidrofobicidad con respecto a Ser (posición 83 para *E. coli* K-12), en círculo rojo, como se observa en la Figura 36.

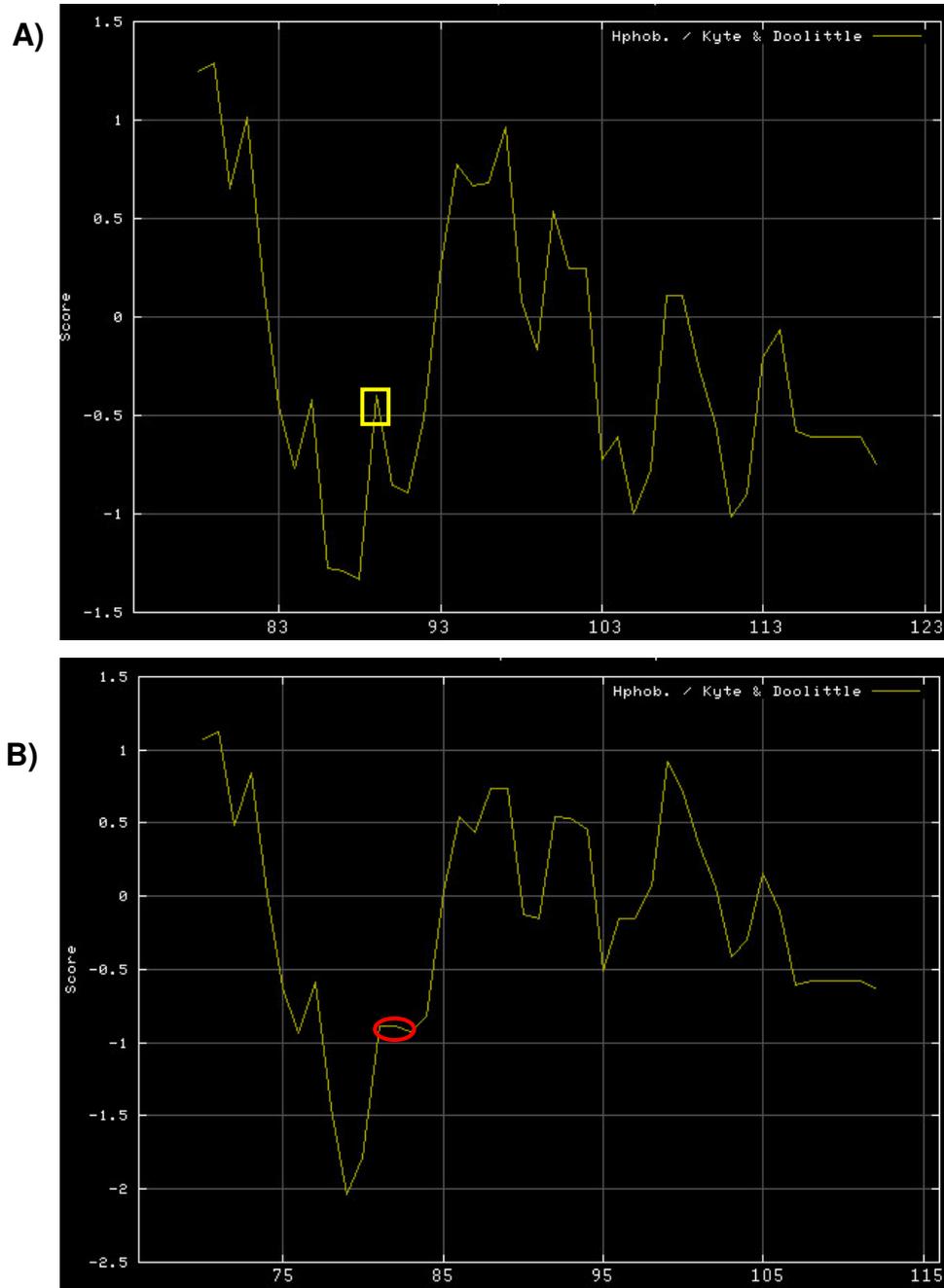


Figura 36.- Perfil de hidrofobicidad de la región QRDR de GyrA en A) perfil de *B. bacilliformis* y en B) perfil de *E. coli* K-12. Nótese el efecto que ocurre en el perfil de hidrofobicidad mediante un cambio de Ser por Ala. Los ejes representan lo siguiente, eje Y: Valor de la escala de Kyte & Doolittle y eje X: posición del aminoácido dentro de la QRDR.

En el análisis de hidrofobicidad para el QRDR de ParC, la presencia de Ala (posición 85, 99 y 127 en *B. bacilliformis*), representados en el cuadrado de color amarillo incrementan la hidrofobicidad con respecto a Ser (posición 80, 94 y 123 para *E. coli* K-12) en círculo rojo, como se observa en la Figura 37.

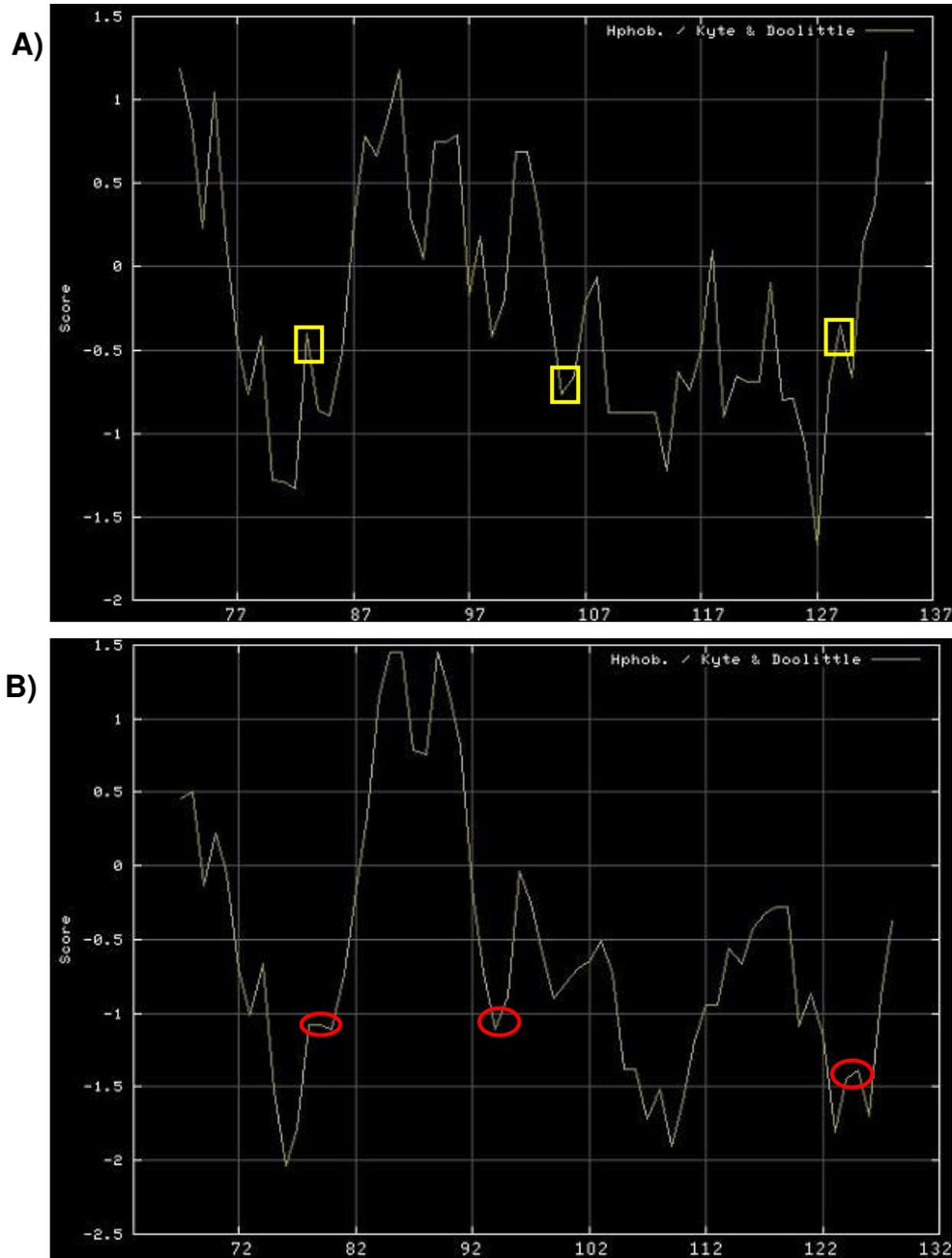


Figura 37.- Perfil de Hidrofobicidad de la región QRDR de ParC en A) perfil de *B. bacilliformis* y en B) perfil de *E. coli* K-12. Nótese el efecto que ocurre en el perfil de hidrofobicidad mediante cambios de Ser por Ala. Los ejes representan lo siguiente, Y: Valor de la escala de Kyte & Doolittle y eje X: posición del aminoácido dentro de la QRDR.

En el análisis de hidrofobicidad para el QRDR de ParE, la presencia de Ala (posición 85, 99 y 127 en *B. bacilliformis*), representados en el cuadrado de color amarillo incrementan la hidrofobicidad con respecto a Ser (posición 80, 94 y 123 para *E. coli* K-12) en círculo rojo; el cambio de Arg por Lys (en triángulo celeste) no altera en nada la hidrofobicidad como se observa en la Figura 38.

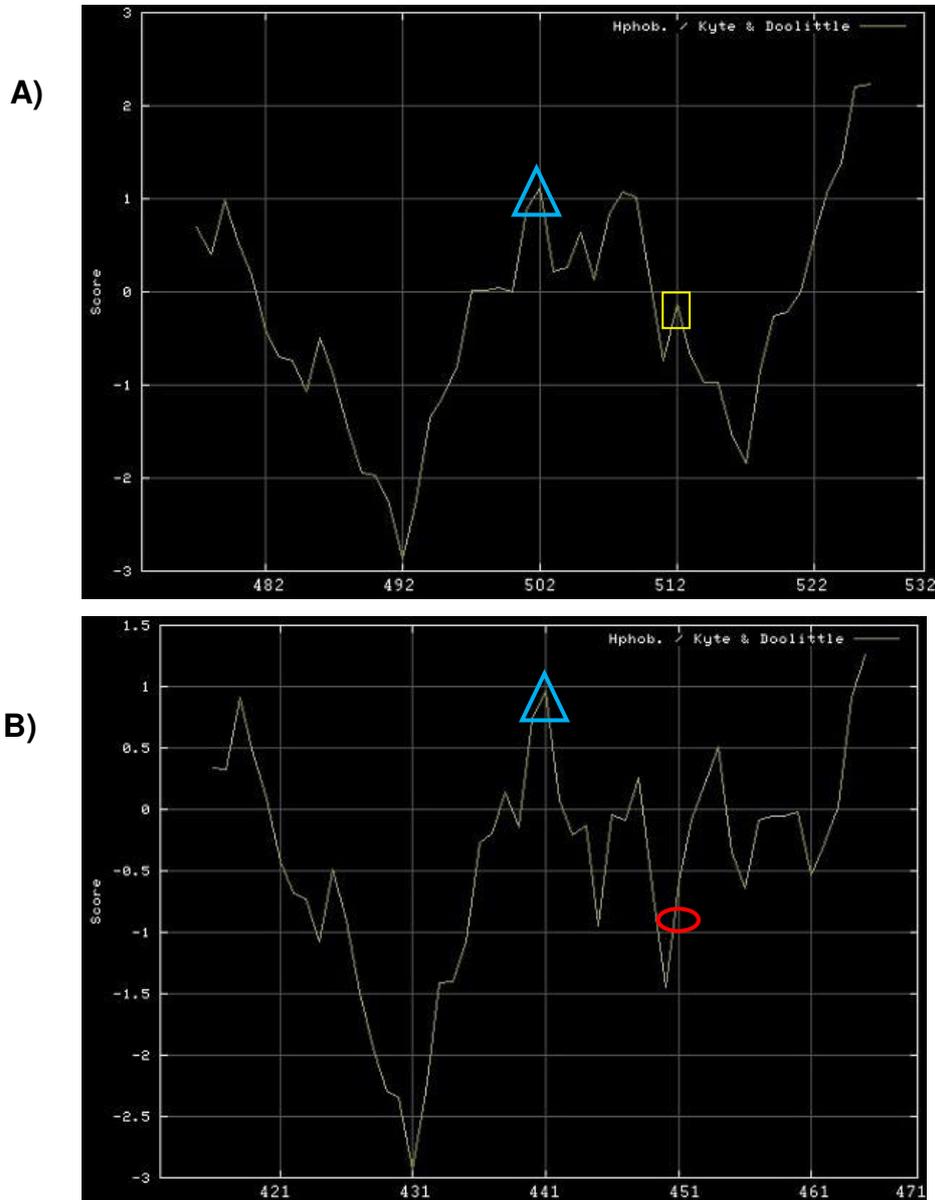


Figura 38.- Perfil de hidrofobicidad de la región QRDR de ParE en A) perfil de *B. bacilliformis* y en B) perfil de *E. coli* K-12. Nótese el efecto que ocurre en el perfil de hidrofobicidad mediante un cambio de **Ser** por **Ala** y sin cambios en donde existe **Arg** por **Lys**. Los ejes representan lo siguiente, eje **Y**: Valor de la escala de Kyte & Doolittle y eje **X**: posición del aminoácido dentro de la QRDR.

6. DISCUSIÓN

6.1 Desarrollo de una prueba de difusión por disco (Kirby-Bauer), CIM (prueba épsilon) y análisis de la susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de *Bartonella bacilliformis*

Se ha estandarizado el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana mediante difusión en disco con los antimicrobianos mencionados en la Tabla 11, resultando que el tiempo de incubación óptima para hacer la lectura es de seis días, concordando con los resultados obtenidos por Sobraques *et al.* (1999) y Quispe (2009). En cuanto al ajuste de la concentración del inóculo bacteriano a la turbidez equivalente a la escala 0.5, 1 y 2 de McFarland, no existieron diferencias en tamaño del diámetro del halo de inhibición en los días evaluados como se muestra en las Tablas 9 y 10, pero sí hubieron diferencias en relación al día de lectura, puesto que para las escalas 1 y 2 se pudo evidenciar la presencia de halos a partir del quinto día, concordando con Pendle *et al.* (2006), quien trabajó con las tres escalas mencionadas para *B. henselae*, mencionando en sus resultados que para inóculos más altos requieren menos días de incubación. El día óptimo fue el sexto día en comparación con los inóculos a escala 0.5 ya que en ese día comenzó a definirse para las cepas de *B. bacilliformis*.

En el ensayo de la concentración inhibitoria mínima por E-test, sólo se estandarizó para el antibiótico ciprofloxacina, el cual mostró diferencias de tamaño de la elipse cuando se trabajó con el inóculo ajustado a escala 2 de McFarland obteniendo un valor de 0.032g/ml a partir del quinto día. Para los inóculos a escala 0.5 y 1 se mantuvieron los valores de 0.023 g/ml a partir del quinto hasta el décimo segundo día, como se muestra en la Tabla 9. Esto nos indica que a escalas superiores a 1 las lecturas de las elipses varían hasta en una concentración motivo por el cual no podemos emplear un antibiograma con escala 2 McFarland para *Bartonella bacilliformis*, pero sí para otra *Bartonella* como es el caso de *Bartonella henselae* en donde se ha realizado una prueba de susceptibilidad antimicrobiana por E-test a escala 2 de McFarland y los resultados han podido ser leídos e interpretados después de 5 días (Tsuneoka *et al.*, 2010).

En nuestro ensayo se desarrolló y estandarizó las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para ser leídas e interpretadas al sexto día, con inóculos ajustados a escala 1 de McFarland, obteniendo buenos resultados y lecturas que comenzaban a definirse a partir del quinto día y que se mantenían estables hasta el décimo segundo día. Estos resultados del CIM para ciprofloxacina que oscilan entre 0.19 – 0.023 µg/ml, de las cepas aisladas concuerdan con valores reportados por Angelakis *et al.* (2008), Döbecker *et al.* (2006) y Sobraques *et al.* (1999). Nuestros resultados brindarían ventajas al personal que labora en el sector salud, al ayudar en el desarrollo de una prueba de susceptibilidad en donde se pueda llegar a obtener los resultados del perfil de susceptibilidad en un corto tiempo, sin embargo el autor Angelakis (2008) recomienda 12 días de incubación para el reporte de la CIM.

B. bacilliformis son sensibles a la mayoría de antibióticos *in vitro*, como lo reporta Biswas *et al.* (2010) y que los resultados *in vitro* no son en algunos casos correlativos con los *in vivo* (Rolain *et al.*, 2004). Estudios han demostrado que *in vitro* la mayoría de antibióticos empleados para las *Bartonellas* son bacteriostáticos y pocos son bactericidas como los aminoglucósidos que presentan una mayor efectividad *in vitro* (Döbecker *et al.*, 2006; Maurin y Raoult, 2001; Rolain *et al.*, 2000; Ives *et al.*, 2000; Ives *et al.*, 1997; Musso *et al.*, 1995). Esto nos demuestra que al brindar un tratamiento con antibióticos bacteriostáticos, el agente causal puede llegar a persistir en el paciente y presentarse fallas en el tratamiento. Quispe (2009) pudo aislar una cepa de *B. bacilliformis* de un paciente que terminó su tratamiento con ciprofloxacina a la cual le encontró susceptibilidad disminuida a la ciprofloxacina, por eso es necesario la evaluación del paciente hasta meses después del término de su tratamiento. En el caso de las cepas aisladas en el presente estudio fueron de pacientes que no habían comenzado el tratamiento y se encontraban en fase aguda de la enfermedad. Para el aislado USM-LMMB-005 se volvió a muestrear al término del tratamiento cuyo cultivo resultó negativo, al paciente se le había tratado con el antibiótico ceftriaxona

Con relación a la susceptibilidad, las cepas de aislados clínicos fueron sensibles a los antibióticos ensayados: Ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, rifampicina, ceftriaxona, amoxicilina, cloranfenicol que son los recomendados por el MINSA (2006), los resultados fueron evidenciados fenotípicamente por los ensayos de susceptibilidad como se muestra en la Tabla 11 y genotípicamente por secuenciamiento de los genes asociados a dicha resistencia, sin encontrar mutaciones, deleciones o inserciones en dichos genes.

6.2 Análisis *in silico* de genes relacionados con resistencia antimicrobiana estudiados en los aislados de *Bartonella bacilliformis*

Las quinolonas inhiben la replicación del DNA por unión a las enzimas DNA girasa y topoisomerasa IV (John *et al.*, 2009; Serra, 2008; Hiroshi y Katsumata, 2006). Ambas enzimas presentan estructura y organización parecida (tetrámeros constituidos por dos subunidades A y B para girasa y C y E para topoisomerasa, A y C contienen el centro activo para apertura y cierre del DNA mientras que B y E presentan actividad ATPasa. En la presente investigación se ha amplificado fracciones de los genes que codifican las subunidades de la girasa y la topoisomerasa, dentro de las fracciones se encuentran comprendidas las regiones determinantes de resistencia para lo cual se han diseñado *primers* para los genes *gyrA*, *gyrB* y *parE*, y para *parC* fueron obtenidos de literatura tal como se menciona en la Tabla 4.

En relación a la subunidad A de la DNA girasa (GyrA), la mayoría de mutaciones descritas hasta la fecha han sido reportadas entre los aminoácidos que comprenden la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR). Para *Escherichia coli* la QRDR está comprendida entre los aminoácidos 67 y 116 (Serra, 2008; Hopkins *et al.*, 2005). Sobre la base de estas posiciones se ha determinado por alineamiento de secuencias aminoacídicas, que la región del QRDR de GyrA para *Bartonella bacilliformis* está comprendida entre los aminoácidos 74 al 124 (Figura 18), siendo el primer reporte para *B. bacilliformis*.

Dentro de esta QRDR se encontró un cambio de Ser por Ala al comparar con *E. coli* en la posición 83 (numeración de *E. coli* K-12 MG1655), en donde se ha reportado para esta última, cepas resistentes al ácido nalidíxico mediante esta mutación (Hopkins *et al.*, 2005). En 20 cepas de *Bartonella* spp. aisladas de Australia se ha reportado esta mutación natural de Ser por Ala con diferentes valores de CIM, lo que el autor refiere como la susceptibilidad a fluoroquinolonas por heterogeneidad (Angelakis *et al.*, 2009; Angelakis *et al.*, 2008). En ensayos *in vitro* se han obtenido cepas de *Bartonella bacilliformis* resistentes a ciprofloxacina, las que tenían una mutación de Asp por Gly en el aminoácido 87, lo que sería doble mutación: una natural en la posición 83 Ser por Ala y otra en la posición 87 de Asp por Gly, cuyo fenotipo resulta en alto nivel de resistencia a todas las quinolonas (Biswas *et al.*, 2007). En las cepas de *B. bacilliformis* aisladas en este estudio, se encontró el mismo cambio de Ser por Ala en la posición 83 con relación a *E. coli*. Lo mismo encontró Quispe (2009) al evaluar cepas de aislados clínicos de *Bartonella bacilliformis*, y mutaciones fuera de la QRDR en las posiciones 19 y 154 (numeración correspondiente a *E. coli* K-12 MG1655), de Arg con relación a *B. bacilliformis* KC583. En el aislado USM-LMMB-007 (Figura 18) de este estudio encontramos la misma mutación de Arg en posición 19 (posición 27 en *B. bacilliformis*), que si bien no está relacionada con resistencia, nos evidencia la adquisición de mutaciones en el gen, las que podrían acumularse y generar un fenotipo resistente.

En relación a la subunidad B de la DNA girasa (GyrB), la mayoría de mutaciones descritas hasta la fecha han sido reportadas en los aminoácidos 426 (Asp por Asn) y 447 (Lys por Glu), correspondiente a la QRDR en *E. coli* (Yoshida *et al.*, 1991). En nuestra investigación se determinó que la QRDR de *Bartonella bacilliformis* está comprendida entre los aminoácidos 428 y 486, como se muestra en la Figura 20. No se ha encontrado ninguna diferencia en esta región entre las secuencias de las cepas aisladas, puesto que el aminoácido 436 en *B. bacilliformis* es Asp al igual que el aminoácido equivalente en *E. coli* K-12 MG1655 (426). Por el contrario, sí encontramos diferencia en el aminoácido 457 (Arg) de *B. bacilliformis* equivalente al aminoácido 447 (Lys) de *E. coli* K-12 MG1655. Si bien se han reportado mutaciones en el aminoácido 447 de Lys por Glu en cepas de *E. coli* resistentes a ciprofloxacina, en *B. bacilliformis* la

diferencia es por una Arg, cuyo cambio no influyó en la susceptibilidad. La cepa de *B. bacilliformis* USM-LMMB-005 presentó 4 mutaciones en la secuencia de nucleótidos (Figura 20), de las cuales, tres de ellas no produjeron cambios en el aminoácido respectivo. Sin embargo, la cuarta mutación que se encuentra lejos de la QRDR sí lo produjo teniendo como resultado una Leu por Phe (592). Si bien este cambio no alteró en nada la susceptibilidad de la bacteria, una de las tres mutaciones silenciosas en el codón 478 (Figura 20) de la cepa de *B. bacilliformis* USM-LMMB-005, se encuentra dentro de la QRDR, esto nos evidencia la adquisición de mutaciones a nivel nucleotídico tanto dentro como fuera de la región determinante de resistencia a quinolonas.

De acuerdo con nuestros resultados, la QRDR de la proteína ParC (subunidad A de la topoisomerasa IV) de *Bartonella bacilliformis* comprendería desde el aminoácido 67 al 118 (Figura 22). El análisis de la QRDR de ParC revela que todas las cepas de *B. bacilliformis* presentan sustituciones de Ser por Ala en los aminoácidos 85 y 99 (numeración equivalente a 80 y 94 en *E. coli*) en comparación a ParC de *E. coli* K-12 (Figura 22). Las mutaciones en los aminoácidos 78, 80 y 84 de la QRDR de ParC de *E. coli* K-12 MG1655, son las más descritas y relacionadas a la resistencia a quinolonas (Serra, 2008; Hopkins *et al.* 2005). En las posiciones 119 (Arg) y 120 (Tyr) que corresponden al sitio activo de esta enzima, no se encontraron sustituciones aminoacídicas. Además, las posiciones 123 y 129 cercanas al sitio activo, también presentan cambios de Ser por Ala. Estas sustituciones dentro de la QRDR también han sido encontradas en *Bartonella* spp. y otras bacterias intracelulares como *Tropheryma whipplei* en la que se ha reportado heterogeneidad de la susceptibilidad frente a las fluoroquinolonas (Angelakis *et al.*, 2009, Angelakis *et al.*, 2008; Masselot *et al.*, 2003). Varios estudios describen que las mutaciones de Ser por Ala en dichas posiciones están asociadas a la resistencia natural a las fluoroquinolonas (del Valle *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2001; Cambau *et al.*, 1994). Estos resultados explicarían la resistencia al ácido nalidíxico en todas las cepas de *B. bacilliformis* aisladas en el presente estudio (Tabla 11). Es importante señalar que a pesar de encontrar las mutaciones para la resistencia a la quinolona ácido nalidíxico, posiblemente otras mutaciones en el gen *parC* de estas bacterias o en otros genes deberían ser necesarias para que ocurra la resistencia a las

fluoroquinolonas (como por ejemplo a la Ciprofloxacina). Actualmente, la Cip parece ser efectiva en el tratamiento recomendado por el MINSA, sin embargo existe adquisición de resistencia por mutaciones acumuladas en estos genes. Por tanto, como fue recomendado en otros estudios (Del Valle *et al.*, 2010; Angelakis *et al.*, 2008) se debe evitar el uso de Cip como monoterapia en el tratamiento de esta enfermedad.

Los resultados de este estudio sugieren que la QRDR de ParE (subunidad B de la DNA topoisomerasa IV) de *B. bacilliformis* está comprendida entre los aminoácidos 473 y 530, como se muestra en la Figura 24. La mayoría de mutaciones descritas en la QRDR de ParE de *E. coli* K-12 MG1655, que es homóloga es GyrB (Ruiz *et al.*, 1997), están entre los aminoácidos 412 y 469. El análisis de las secuencias aminoacídicas de ParE de *B. bacilliformis* no reveló cambios entre las secuencias, sin embargo, dentro de la QRDR se presentaron dos sustituciones aminoacídicas en las posiciones 441 (Lys por Arg) y 451 (Ser por Ala) en comparación con *E. coli* K-12 MG1655. La posición 420, resaltada en amarillo (Figura 23), se encontró sin cambios. Los cambios tanto en la posición 420 como 441 y sus equivalentes en *B. bacilliformis* (481 y 502, respectivamente), son las más citadas en cepas resistentes a quinolonas en *E. coli* (Jiménez *et al.*, 2009; Sorlozano *et al.*, 2007; Hopkins *et al.*, 2005). También se han reportado cambios en los aminoácidos 416 (Leu por Phe), 445 (Leu por His) y 458 (Ser por Ala). Estas mutaciones ya descritas (Jiménez *et al.*, 2009; Sorlozano *et al.*, 2007; Hopkins *et al.*, 2005) no fueron encontradas en las secuencias de *B. bacilliformis* del presente estudio. Las mutaciones en otras posiciones podrían ser importantes para la resistencia o disminución de la susceptibilidad, como lo es el cambio en el aminoácido 451, que en *E. coli* K-12 es una Ser y su equivalente en *B. bacilliformis* es Ala. Las sustituciones del mismo tipo (Ser por Ala) reportadas en el aminoácido 458, confieren resistencia en cepas de *E. coli* productoras de β lactamasas de espectro extendido (Sorlozano *et al.*, 2007). De las cepas de *B. bacilliformis* aisladas, la cepa USM-LMMB-005 presentó mutaciones puntuales en el nucleótido de la tercera posición (Figura 23), las que no produjeron cambios en el aminoácido respectivo (328 y 458). El aminoácido 458 se encuentra cercano a la QRDR de ParE, por lo que es probable que los cambios nucleotídicos adicionales a éstos puedan contribuir a generar resistencia, como la demuestra esta cepa,

USM-LMMB-005 procedente de la localidad de Sondorillo, en la que se reportaron fallas al tratamiento con Cip. Es posible que en las cepas de *B. bacilliformis* circulantes en esta localidad se acumulen mutaciones en las secuencias de estos genes asociados a la resistencia a Cip. En esta localidad, se trata a los pacientes con la Enfermedad de Carrión con ceftriaxona en vez de Cip.

Para el gen de la RNA polimerasa subunidad β (*rpoB*) en donde el antibiótico rifampicina actúa inhibiendo la RNA polimerasa dependiente de DNA, se ha obtenido *in vitro* cepas de *Bartonella bacilliformis* resistentes a rifampicina (Biswas *et al.*, 2007) y cepas de *Bartonella quintana* (Biswas *et al.*, 2009a), después de tres pasajes, obteniendo una mutación en la posición 531 (Ser por Phe) dentro de la región determinante de resistencia a rifampicina (RRDR) que está comprendida entre los aminoácidos 507 al 533 en *E. coli*. Sobre las bases de estas posiciones se ha determinado por alineamiento de secuencias aminoacídicas, que la región de la RRDR de RpoB para *B. bacilliformis* está comprendida entre los aminoácidos 521 al 547 (Figura 26). En nuestro análisis de las cepas aisladas no se encontraron diferencias entre ellas dentro de la RRDR como se muestra en la Figura 26 ni a nivel nucleotídico como se observa en la Figura 25, las cepas fueron sensibles al antibiótico rifampicina, por lo tanto la posición 531 numeración correspondiente a *E. coli* K-12 MG1655 cuyo equivalente en *B. bacilliformis* es 545, sigue siendo Ser. Esta región de la RRDR es altamente conservada como lo muestra el alineamiento, pero observamos en posición 499 un cambio (Ser por Ala) en comparación con *E. coli*, cercano a la RRDR. Es importante mencionarlo, ya que reportes del mismo cambio de aminoácidos para genes como *gyrA* y *parC* le brindan a la bacteria una resistencia intrínseca a ciertos grupos de antibióticos como las quinolonas.

El análisis para el gen *rpID* ribosomal cuyo producto es la proteína L4, y que también se encuentra involucrada en resistencia a antibióticos de tipo macrólidos, mostrado en la Figura 28 con otras Bartonelas como *B. henselae* y *B. quintana* se muestra un motivo altamente conservado ⁶⁷QKGTGRAR₇₄ y que también se encuentra presente en *S. pneumoniae* y *E. coli* enmarcada en el cuadrado morado. La numeración corresponde a *S. pneumoniae* que es comúnmente usada cuando se comparan proteínas ribosomales (Vester y Douthwaite, 2001; Tait-

Kamradt *et al.*, 2000). Se ha detectado, mediante trabajos *in vitro*, mutaciones e inserciones para las bacterias mencionadas, en el caso de *B. henselae* (Biswas *et al.*, 2006) después de 10, 12 y 16 pasajes (subcultivos) con antibiótico eritromicina. El autor ha encontrado mutaciones en las posiciones 71 (Gly por Arg) y 75 (His por Tyr), numeración correspondiente a *S. pneumoniae*. En cambio para *B. quintana* Meghari *et al.* (2006), empleando células de cultivo y luego de 16 subcultivos, obtuvo mutantes resistentes a eritromicina. El autor en sus resultados menciona una inserción de 9 aminoácidos **GRARHSSAR** después de la posición 71 Arg y antes de la posición 72 Ala empleando la numeración de *S.pneumoniae*. Cabe resaltar que Meghari *et al.* (2006) ha tenido un error en relación a la numeración de 71 Arg y 72 Ala corresponderían a los aminoácidos 79 y 80 respectivamente según nuestro alineamiento, que concuerda con Tait-Kamradt *et al.* (2000), quienes han encontrado mutaciones en la posición 69 (Gly por Cys) y dos inserciones entre los aminoácidos 67Q y 68K dentro de la región altamente conservada ₆₃**KPWRQKGTGRAR**₇₄. Se considera importante corregir este error de numeración ya que trabajos como los de Quispe (2009), Biswas *et al.* (2008), Biswas y Rolain (2010), vienen citando la numeración equivocada, cuando la numeración correcta debe ser la que proponemos líneas arriba.

Con relación a *E. coli* se han obtenido cepas resistentes a eritromicina con un cambio en el aminoácido 63 (Lys por Gly), numeración correspondiente a *E. coli* (Chittum y Champney, 1994), posteriormente en el 2007 otras nuevas mutaciones e inserciones han sido reportadas comprendidas, entre el motivo altamente conservado: Q62K, K63E, G66C, R, D e inserciones en las posiciones: G56 (de 6aa: **EVTGSG**), K63(de4aa: **TWRQ**) y S72(de 6aa: **RARSGS**) el número de aminoácidos insertados son idénticos a los aminoácidos anteriores desde la posición de inserción, este mismo caso se ha reportado en cepas de *S. pneumoniae* y *B. quintana*. Con estos datos analizados de las bacterias mencionadas, hemos obtenido una región en *B. bacilliformis* la cual la llamaremos en adelante **ERDR** “región determinante de resistencia a eritromicina”, como lo mostramos en la Figura 28 mediante el alineamiento de secuencias aminoacídicas y que está comprendida entre los aminoácidos 60 al 78 de *Bartonella bacilliformis*.

Quispe (2009), en su investigación reporta para un aislado de *Bartonella bacilliformis* procedente de la sierra de la Libertad que en el aminoácido 13 presenta una mutación (Thr por Ala) y en nuestra investigación también se encontró para la cepa USM-LMMB-005 la misma mutación (Figura 27). Además de esta mutación, la misma cepa presentó otras tres, las cuales no produjeron cambios en el aminoácido respectivo como lo muestra la Figura 28. Estas mutaciones nos indicarían la existencia de cepas circulantes con mutaciones, que si bien son lejanas al **ERDR**, el acúmulo de las mismas a la larga llevaría a brindarle resistencia a eritromicina, este antibiótico es usado en la fase crónica de la Enfermedad de Carrión. Quispe (2009) también reporta que sus cepas aisladas presentan otra mutación con relación a la cepa de *B. bacilliformis* KC583 en la posición 6 numeración correspondiente a *B. bacilliformis*, un cambio de Lys por Arg, en nuestro análisis de alineamientos encontramos que este cambio no es propio de las cepas sino se debe al uso de *primers* diseñados para *B. quintana* Meghari *et al.* (2006), los cuales también hemos empleado en nuestra investigación si bien amplifican para *B. bacilliformis*, el primer *forward* presenta un cambio dentro del codón 6 (Figura 27), que en una mala lectura del cromatograma se interpretaría como mutación y que produce este cambio de aminoácido de Lys por Arg. Es de suma importancia mencionarlo y corregirlo mediante esta investigación, por si otros autores desean usar los mismos *primers*, lo otro es no considerar en el análisis de las secuencias de los *primers*

El análisis para el gen *rRNA* 16S blanco de aminoglucósidos (Maurin y Raoult, 2001; Biswas *et al.*, 2009b) no presentó cambios en relación con la cepa *B. bacilliformis* KC583, si bien todas las cepas ensayadas fueron sensibles a gentamicina, un aminoglucósido, es importante resaltar los trabajos *in vitro* en donde han obtenido cepas de *Bartonella henselae* resistentes a gentamicina (Biswas *et al.*, 2009b), luego de 9 subcultivos (18 semanas). Se encontró una mutación en posición 1408 (Adenina por Guanina); la numeración corresponde a *E. coli* K-12 MG1655, esta mutación como lo reporta el autor es muy frecuente en aislados clínicos. En la Figura 29 mostramos una región altamente conservada comprendida entre las posiciones 1373 al 1423 (numeración de *E. coli* K-12 MG1655), dentro de la cual se encuentra la posición 1408 reportada en resistencia a gentamicina. Todas las cepas aisladas fueron sensibles a

gentamicina, y al evaluar genótipicamente su blanco no encontramos mutación alguna en la posición 1408. El análisis del gen *rRNA 16S* nos permitió confirmar la especie de *B. bacilliformis* mediante el análisis del secuenciamiento y alineamiento con la cepa de *B. bacilliformis* KC583, del mismo modo los amplificadores del gen *lalB* como se muestra en la Figura 8 nos confirmaban que se trataba del agente causal de la Enfermedad de Carrión.

6.3 Modelamiento y análisis del perfil de hidrofobicidad de las regiones determinantes de resistencia antimicrobiana en los aislados de *Bartonella bacilliformis*.

Saenz *et al.* (2003) menciona que cambios de Ser por Ala, Leu o Val dan como resultado la pérdida de un grupo hidroxilo de la Ser y por tanto la capacidad de formar puentes de hidrógeno, estos cambios son importantes en la interacción de la quinolona con el complejo girasa-DNA. En la estructura terciaria del QRDR de GyrA (Figura 30), ParC (Figura 32), ParE (Figura 33) y L4 (Figura 34) de *B. bacilliformis* realizada por modelamiento (Guex y Peitsch, 1997; Schewede *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2006), se pudo apreciar un cambio en la posición donde existe una diferencia aminoacídica de Ser por Ala. Cuando es comparado con *E. coli* K-12, el cambio, resaltado en el círculo rojo, sugiere una débil interacción entre las quinolonas, para el caso de GyrA, ParC y ParE. En caso de la eritromicina el cambio es en el último aminoácido de la ERDR que no afectaría en la interacción con la droga. Los cambios observados de Ser por Ala, podrían estar alterando los patrones de hidrofobicidad que se relacionan con la estructura de la proteína.

Con relación a los perfiles de hidrofobicidad mediante el método de Kyte y Doolittle (1982) de las QRDR de GyrA (Figura 36), ParC (Figura 37) y ParE (Figura 36), la sustitución de una Ser por Ala aumenta el perfil de hidrofobicidad como se observa en las figuras mencionadas y tenemos que para *B. bacilliformis* muestra mayor hidrofobicidad con relación a *E. coli* K-12 MG1655 en las posiciones donde existe este cambio de Ser por Ala, que son las posiciones 83 para GyrA y 80, 94 para ParC pertenecientes a la QRDR y en ParC dos posiciones fuera de esta región son en las 123 y 129 muy cercanos al sitio activo como se puede ver en la Figura 22. Similares reportes menciona Del Valle *et al.*

(2010) al realizar este tipo de análisis en relación al gen *gyrA* de *E. coli* y *B. bacilliformis* mencionando que alteraciones en la hidrofobicidad aumentarían los niveles asociados a la resistencia o a la disminución de la susceptibilidad, comprobando mediante este análisis la resistencia a una quinolona (ácido nalidíxico) para *B. bacilliformis*. También notamos en las evaluaciones del perfil de hidrofobicidad, que los cambios de un aminoácido por otro (pertenecientes al mismo grupo) no alteran la hidrofobicidad, como se puede observar en la Figura 38 de ParE, donde existe un cambio en la posición 441 de Lys por Arg ambos con carga positiva.

7. CONCLUSIONES

- Se desarrolló un antibiograma para *Bartonella bacilliformis* cuya lectura óptima se obtiene usando un inóculo ajustado a escala 1 de McFarland y con un tiempo de incubación de seis días.
- Las cepas de *B. bacilliformis* ensayadas fueron sensibles a los antibióticos que recomienda el Ministerio de Salud para la Enfermedad de Carrión.
- *Bartonella bacilliformis* presenta resistencia natural a la quinolona ácido nalidíxico.
- Las regiones determinantes de resistencia a las quinolonas (**QRDR**) para los genes: gyrA, gyrB, parC y parE en *Bartonella bacilliformis*, comprenden los aminoácidos 74 a 124, 428 a 426, 67 a 118, y 473 a 530 respectivamente.
- Las regiones determinantes de resistencia a Rifampicina (**RRDR**) para el gen rpoB en *Bartonella bacilliformis*, comprenden los aminoácidos 521 a 547.
- Las regiones determinantes de resistencia para eritromicina (**ERDR**) para el gen rplD en *Bartonella bacilliformis*, comprende los aminoácidos 60 a 79, siendo el primer reporte de una ERDR para este gen en *Bartonella bacilliformis*.
- En la secuencia del QRDR de ParC, la presencia de Alanina por Serina, determina la resistencia al ácido nalidíxico pero no a otras quinolonas.
- Se observó cambios en la estructura secundarias de las proteínas GyrA, ParC y ParE en las posición donde existe la diferencia de Ser por Ala sugiriendo una débil interacción entre la droga (quinolonas) y su blanco.
- El cambio con relación a *E. coli* K-12 MG1655 de Ser por Ala en ParC de *B. bacilliformis* determina la resistencia al Nal pero no a la Cip.
- Cambios de Ser por Ala incrementan la hidrofobicidad de la proteína por lo tanto la resistencia a la droga.

8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda tomar muestras en otras zonas endémicas con el objetivo de tener mayor número de cepas de *B. bacilliformis* para analizar cepas resistentes a los antimicrobianos.
- Se recomienda el uso de ceftriaxona, cuando existan fallas en el tratamiento con ciprofloxacina.
- Se recomienda evaluar otros genes relacionados a la resistencia como: *rpsL*, *rpsG2* (relacionados a tetraciclina y aminoglucósidos); los genes *rplV*, *rRNA 23S* (relacionados a macrólidos); *hexapeptide repeat containing transferase* (relacionado a cloranfenicol al igual que el *rRNA23S*) y el gen *folA* (relacionado a Trimetroprima).

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amano Y; Rumbea J; Knobloch J; Olson J; Kron M. 1997. Bartonellosis in Ecuador: serosurvey and current status of cutaneous verrucous disease. *Am J Trop Med Hyg* Aug; 57(2):174-9.
2. Anaya E; Mendoza G; García L; Fernández Y. 2008. Prueba de Elisa Indirecta del Lisado Total de *Bartonella bacilliformis* para el Diagnóstico Rápido de la Enfermedad de Carrión. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*; 25(2): 243-46.
3. Andre R; Korves C; Fernandez R; Carbajal F; Laughlin L; Watts D. 1998. Host Feeding behavior of *Lutzomyia verrucarum* in and around the house of bartonellosis patients in Perú. *Am J Trop Med Hyg*; 59:212.
4. 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.* Jun; 61(6):1252-5.
5. Angelakis E; Raoult D; Rolain JM. 2009. Molecular characterization of resistance to fluoroquinolones in Bartonella henselae and Bartonella quintana. *J Antimicrob Chemother.* Jun; 63(6):1288-9.
6. Arnold K; Bordoli L; Kopp J; Schwede T. 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*, 22,195-201.
7. Biswas S; Raoult D; Rolain JM. 2006. Molecular characterization of resistance to macrolides in *Bartonella henselae*. *Antimicrob Agents Chemother.* Sep;50(9):3192-3
8. Biswas S; Raoult D; Rolain JM. 2007. Molecular mechanisms of resistance to antibiotics in *Bartonella bacilliformis*. *J Antimicrob Chemother.* Jun;59 (6):1065-70.
9. Biswas S; Raoult D; Rolain JM. 2008. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. *Int J Antimicrob Agents.* Sep; 32(3):207-20.
10. Biswas S; Raoult D; Rolain JM. 2009a. Molecular characterization of resistance to rifampin in *Bartonella quintana*. *Clin Microbiol Infect.* Dec; 15 Suppl 2:100-1.

11. Biswas S; Raoult D; Rolain JM. 2009b. Molecular mechanism of gentamicin resistance in *Bartonella henselae*. *Clin Microbiol Infect.* Dec; 15 Suppl 2:98-9.
12. Biswas S; Rolain JM. 2010. *Bartonella* infection: treatment and drug resistance. *Future Microbiol.* Nov; 5(11):1719-31.
13. Burstein Z; Mayta P. 2007. En defensa de la denominación como “Enfermedad de Carrion” para la Bartonelosis Humana producida por la *Bartonella bacilliformis*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 24(2): 103-106.
14. Cáceres A. 1993. Distribución geográfica de la *Lutzomyia verrucarum*, vector de la Bartonelosis humana en el Perú. *Rev Inst Med TropSao Paulo*; 35(6): 485-90.
15. Cambau E; Sougakoff W; Besson M; Truffot-Pernot C; Grosset J; Jarlier V. 1994. Selection of a *gyrA* mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to fluoroquinolones during treatment with ofloxacin. *J Infect Dis.* Nov; 170(5):1351.
16. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. M100-S21 Vol. 31 N°. 1. Wayne, Pennsylvania, USA.
17. Coleman S.A; M.F. Minnick. 2003. Differential expression of the invasion-associated locus B (*ialB*) gene of *Bartonella bacilliformis* in response to environmental cues. *Microb Pathog.* 34(4):179-186.
18. Colichon H C.F; De Bedon. 1973. Carrion's disease: useful nutrients for the growth of *Bartonella bacilliformis*. *Rev Latinoam Microbiol.* 15(2):75-79.
19. Chittum HS; Champney WS. 1994. Ribosomal protein gene sequence changes in erythromycin-resistant mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* Oct; 176(20):6192-8.
20. Davies J; Wright G. 1997. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol.* 5(6), 234–240.
21. Del Valle LJ; Flores L; Vargas M; Garcia-de-la-Guarda R; Quispe RL; Ibanez ZB; Alvarado D; Ramírez P; Ruiz Joaquim. 2010. *Bartonella bacilliformis*, endemic pathogen of the Andean region, is intrinsically resistant to quinolones. *Int J Infect Dis.* Jun; 14(6):e506-10.

22. Dirección General de Epidemiología DGE. Red Nacional de Epidemiología. 2013. Sala situacional para el Análisis de Situación de Salud. Enfermedad de Carrión.
23. Dörbecker C; Sander A; Oberle K; Schulin-Casonato T. 2006. *In vitro* susceptibility of Bartonella species to 17 antimicrobial compounds: comparison of Etest and agar dilution. J Antimicrob Chemother. Oct;58(4):784-8
24. Ellis B; Rotz L; Leake J; Samalvides F; Bernable J; Ventura G; Padilla C; Villaseca P; Beati L; Regnery R; Childs J; Olson J; Carrillo C. 1999. An outbreak of acute bartonellosis (Oroya fever) in the Urubamba region of Peru. Am J Trop Med Hyg;61:344-349.
25. Flores L. 2008. Estudios moleculares en *Bartonella bacilliformis* para el control de la Enfermedad de Carrión. Tesis para optar el grado académico de Magíster en Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
26. Guerrero J, 2009. Comunicación verbal sobre fallas en el tratamiento de la Bartonelosis. Centro de Salud de Huancabamba – Piura.
27. Guex N; Peitsch, M.C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. Electrophoresis 18: 2714-2723.
28. Hall, TA.1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
29. 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
30. Herrer A. 1990. Epidemiología de la verruga peruana. Lima: UNMSM.
31. Hiroshi Y; Katsumata R. 2006. Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development. J Bioscience Biotechnology and Biochemistry. May; 70(5): 1060-75.
32. Hopkins KL; Davies RH; Threlfall EJ. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in Escherichia coli and Salmonella: recent developments. Int J Antimicrob Agents. May; 25(5): 358-73.

33. Ives TJ; Manzewitsch P; Regnery RL; Butts JD; Kebede M. 1997. *In vitro* susceptibilities of *Bartonella henselae*, *B. quintana*, *B. elizabethae*, *Rickettsia rickettsii*, *R. conorii*, *R. akari*, and *R. prowazekii* to macrolide antibiotics as determined by immunofluorescent-antibody analysis of infected Vero cell monolayers. *Antimicrob Agents Chemother.* Mar; 41 (3):578-82.
34. Ives TJ; Marston EL; Regnery RL; Butts JD; Majerus TC. 2000 *In vitro* susceptibilities of *Rickettsia* and *Bartonella* spp. to 14-hydroxy-clarithromycin as determined by immunofluorescent antibody analysis of infected vero cell monolayers. *J Antimicrob Chemother.* Mar; 45(3):305-10.
35. Jiménez A; Jimenez A; Arrabal M; Nogueras M. 2009. Resistencias a quinolonas en aislados clínicos de *Escherichia coli* productores de betalactamasas de espectro extendido. *Higiene y Sanidad Ambiental.* 9: 449-466.
36. John W; Skinner D; Bonev B. 2009. *Molecular Mechanisms of Antibiotic: The Need for Novel Antimicrobial Therapies.* WILEY-VCH ISBN: 978-3-527-32206-0.
37. Kyte J; Doolittle RF. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 157(1):105-32.
38. Knobloch J. 1988. Analysis and preparation of *Bartonella bacilliformis* antigens. *Am J Trop Med Hyg;* 39:173-178.
39. Maguiña C. 1993. *Bartonellosis humana en el Perú – estudio de 145 casos de Bartonellosis en el Hospital Nacional Cayetano Heredia.* (Tesis doctoral).
40. Maguiña C; Gotuzzo E. 2000. Bartonellosis. *New and Old. Infect Dis Clin North Am;* 14(1): 1-22.
41. Maguiña C; Garcia PJ; Gotuzzo E; Cordero L; Spach DH. 2001. Bartonellosis (Carrion's disease) in the modern era. *Clin Infect Dis;* 33(6): 772-9.
42. Maguiña C; Ugarte-Gil C; Breña P; Ordaya E; Ventosilla P; Huarcaya E; Henríquez C. 2008. Actualización de la enfermedad de Carrion. *Update of Carrion's disease. Rev Med Hered* 19 (1): 36-41.

43. Mallqui V; Speelmon EC; Verástegui M; Maguiña C; Pinell P; Lavarello R; Delgado J; Kosek M; Romero S; Arana Y; Gilamn RH. 2000. Sonicated diagnostic immunoblot for bartonellosis. *Clin Diagn Lab Immun*; Jan; 7(1): 1-5.
44. Masselot F; Boulos A; Maurin M; Rolain JM; Raoult D. 2003 Molecular evaluation of antibiotic susceptibility: *Tropheryma whipplei* paradigm. *Antimicrob Agents Chemother*. May;47(5):1658-64
45. Maurin M; Gasquet S; Ducco C; Raoult D. 1995. MICs of 28 antibiotic compounds for 14 *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. Nov; 39(11):2387-91.
46. Maurin M; Birtles R; Roul D. 1997. Current Knowledge of *Bartonella* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*;16:487-506.
47. Maurin M; Raoult D. 2001. Use of aminoglycosides in treatment of infections due to intracellular bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. Nov; 45(11):2977-86.
48. Meghari S; Rolain JM; Grau GE; Platt E; Barrassi L; Mège JL; Raoult D. 2006. Antiangiogenic effect of erythromycin: an in vitro model of *Bartonella quintana* infection. *J Infect Dis*. Feb 1;193(3):380-6
49. Mingeot-Leclercq MP. 1999. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother*. 43(4), 727–737.
50. Minnick MF; Wilson ZR; Smitherman LS; Samuels DS. 2003. *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant *Bartonella bacilliformis* strains obtained in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 47(1): 383-6.
51. Minnick MF, Battisti JM. 2009. Pestilence, persistence and pathogenicity: infection strategies of *Bartonella*. *Future Microbiol*. 4(6):743-58
52. MINSA.1998. Doctrina, normas y procedimientos para el control de la Bartonelosis o enfermedad de Carrión en el Perú. Lima.
53. MINSA. 2006. Norma Técnica N° 048-MINSA/DGSP-V.01. “Atención de la Bartonelosis o Enfermedad de Carrión en el Perú”.
54. MINSA. 2009. Dirección general de epidemiología. Dirección ejecutiva de vigilancia epidemiológica. Sala de Situación de Salud Perú. Semana Epidemiológica N° 32 (Del 09 al 15 de Agosto)

55. Mitchell S; Minnick M. 1995. Characterization of a Two-Gene Locus from *Bartonella bacilliformis* Associated with the Ability To Invade Human Erythrocytes. INFECTION AND IMMUNITY, Apr, pp. 1552–1562.
56. Musso D; Drancourt M; Raoult D. 1995. Lack of bactericidal effect of antibiotics except aminoglycosides on *Bartonella (Rochalimaea) henselae*. J Antimicrob Chemother. Jul; 36 (1):101-8.
57. Pachas P. 2000. Epidemiología de la Bartonelosis en el Perú. Módulos Técnicos–Serie Documentos Monográficos. Lima, PE: Oficina General de Epidemiología/Instituto Nacional de Salud.
58. Pachas P. 2001. Enfermedad de Carrión (Bartonelosis) en el Perú. Módulos Técnicos–Serie. Lima: Oficina General de Epidemiología/Instituto Nacional de Salud.
59. Pfister P. 2003. The molecular basis for A-site mutations conferring aminoglycoside resistance: relationship between ribosomal susceptibility and x-ray crystal structures. ChemBioChem. 4(10), 1078–1088.
60. Pendle S; Ginn A; Iredell J. 2006. Antimicrobial susceptibility of *Bartonella henselae* using Etest methodology. J Antimicrob Chemother. Apr; 57 (4):761-3.
61. Perez-Martinez L; Blanco JR; Oteo JA. 2010. Treatment of human infections caused by *Bartonella* spp. Rev Esp Quimioter. Sep; 23(3):109-14.
62. Perilla M; Ajello G; Bopp Ch; Elliott J; Facklam R; Knapp J; Popovic T; Wells J. 2003. Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World. CDC and WHO
63. Quispe R. 2009. Caracterización Molecular de los Genes Asociados a la Resistencia Antimicrobiana en *Bartonella bacilliformis*. Tesis de Pre-Grado. Facultad de Ciencias Biológicas. E.A.P. Microbiología y Parasitología - Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
64. Rchet MI. 1999. Effect of mutations in the A site of 16S *rRNA* on aminoglycoside antibiotic-ribosome interaction. J. Mol. Biol. 286(1), 33–43.
65. Restrepo M; Robledo M; Bedoya E. 2002. “Enfermedades Infecciosas”, 5^{Ed}, Editorial Corporaciones para las Investigaciones Biológicas. Medellín-Colombia.

66. Rodríguez JC; Ruíz M; Climent A; Royo G. 2001. *In vitro* activity of four fluoroquinolones against *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Antimicrob Agents. Mar; 17(3):229-31.
67. Rolain JM; Maurin M; Raoult D. 2000. Bactericidal effect of antibiotics on *Bartonella* and *Brucella* spp.: clinical implications. J Antimicrob Chemother. Nov;46(5):811-4.
68. 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. Jun;48 (6):1921-33.
69. Ruiz J; Casellas S; Jimenez de Anta MT; Vila J. 1997. The region of the *parE* gene, homologous to the quinolone-resistant determining region of the *gyrB* gene, is not linked with the acquisition of quinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. J Antimicrob Chemother. Jun; 39(6):839-40.
70. Saenz Y; Zarazaga M; Brinas L; Ruiz-Larrea F; Torres C. 2003. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. J Antimicrob Chemother. Apr; 51(4):1001-5.
71. Serra A. 2008. Quinolonas. Facultad de Medicina UBA. Separata 2008-Vol 16 N° 3.
72. Schwede T; Kopp J; Guex N; Peitsch MC. 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. Nucleic Acids Research 31: 3381-3385.
73. Sobraques M; Maurin M; Birtles RJ; Raoult D. 1999. *In vitro* susceptibilities of four *Bartonella bacilliformis* strains to 30 antibiotic compounds. Antimicrob Agents Chemother. Aug;43 (8):2090-2.
74. Sorlozano A; Gutierrez J; Jimenez A; de Dios Luna J; Martinez JL. 2007. Contribution of a new mutation in *parE* to quinolone resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. J Clin Microbiol. Aug; 45(8):2740-2.
75. Tait-Kamradt A; Davies T; Cronan M; Jacobs MR; Appelbaum PC; Sutcliffe J. 2000. Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected *in vitro* by macrolide passage. Antimicrob Agents Chemother. Aug; 44(8):2118-25.

76. Tamura K; Peterson D; Peterson N; Stecher G; Nei M; Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* Oct; 28(10):2731-9.
77. 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.
78. 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.
79. Telenti A; Imboden P; Marchesi F, Lowrie D; Cole S; Colston MJ; Matter L; Schopfer K; Bodmer T. 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet.* 341(8846):647-50.
80. Thompson J; D.G. Higgins; Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* Nov 11;22 (22):4673-80.
81. Tsuneoka H; Yanagihara M; Nojima J; Ichihara K. 2010. Antimicrobial susceptibility by Etest of *Bartonella henselae* isolated from cats and human in Japan. *J Infect Chemother.* Dec;16 (6):446-8.
82. Vega C; Ariza R. 2008. Bartonelosis: espectro clínico actual de un viejo patógeno. *Med Int Mex* 24(3): 217-23.
83. Vester B; Douthwaite S. 2001. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother.* Jan; 45(1):1-12.
84. Walsh C. 2003. "Where will new antibiotics come from?" *Nat Rev Micro* 1(1): 65 - 70
85. Yam WC; Tam CM; Leung CC. 2004 Direct detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens by PCR-DNA sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 42(10), 4438–4443.
86. 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.* Aug; 35(8):1647-50.

9. ANEXOS

Anexo 01: Localidades en donde se ha muestreado a pacientes con la Enfermedad de Carrión.

A) En el centro de salud Sondorillo - Huancabamba- Piura



B) En el centro de salud Cajacay – Ancash.



Anexo 02: Toma de muestra de sangre periférica a paciente con sintomatología de la Enfermedad de Carrión en fase crónica en la Localidad de Sondor-Huancabamba.



Anexo 03: Miembro inferior de un paciente (Mujer) mayor de 60 años con sintomatología de la Enfermedad de Carrión en fase crónica, en la Localidad de Sondorillo- Huancabamba. Nótese las verrugas rojizas.



Anexo 04: Siembra en placa y medio bifásico en el laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de las muestras de sangre de pacientes.



Anexo 05: Ficha elaborada para pacientes con la enfermedad de Carrión.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

FICHA CLÍNICA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CARRIÓN

Datos del Paciente:

Nombre: Código:.....

Edad:..... Sexo: F M

Provincia:..... Distrito:.....

Muestra:

Fecha de la toma de muestra:

Tipo de muestra:

Sangre: ...

Suero.

Datos clínicos:

A) ¿Hace cuánto tiempo presentó la Enfermedad de Carrión?

.....

B) Presentó las fases:

Hemática: si no

Verrucosa: si no

Ambas:

Actualmente está haciendo la fase:

c) Diagnóstico de laboratorio:

Frotis sanguíneo: positivo... negativo...

Cultivo: positivo... negativo...

(En caso de cultivo positivo: se aisló la cepa de *B. bacilliformis* código:
.....)

D) Tratamiento:

Ciprofloxacina

Rifampicina

Eritromicina

Doxiciclina

Gentamicina

Cloramfenicol

• Otros:

• ¿Cuánto tiempo tomó los antibióticos?:
.....

• Reaccionó positivamente (¿se curó?):

• Reaccionó negativamente (¿no se curó?):

• ¿Qué antibióticos tomó después de la resistencia al antibiótico?
.....
.....

¿Se curó?

¿No se curó?

Anexo 06: **CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRA PARA PERSONAS MAYORES DE EDAD**

Fecha: / /

La Enfermedad de Carrión o Bartonelosis humana es una enfermedad que se presenta en las regiones andinas del Perú. Es causada por una bacteria llamada *Bartonella bacilliformis* que ingresa a la sangre por la picadura del mosquito conocido como “manta blanca” o “titira”. La bacteria entra a los glóbulos rojos y los destruye, poniendo en riesgo la salud y la vida de las personas infectadas. Para controlar esta enfermedad, además de las acciones que viene tomando el Ministerio de Salud, sería ideal contar con una vacuna, con pruebas rápidas de diagnóstico de laboratorio y con un tratamiento antibiótico basado en estudios que permitan conocer si la bacteria muere o no frente a un antibiótico. Si la bacteria no muere con un antibiótico se dice que es “resistente” a éste. Existen evidencias de que esta bacteria está adquiriendo resistencia a algunos de los antibióticos recomendados, pero para conocer mejor esta situación nosotros consideramos necesario realizar estudios con bartonelas recientemente aisladas de pacientes.

Por estas razones, estamos haciendo una investigación sobre la resistencia a los antibióticos de aislados clínicos de *Bartonella bacilliformis* titulada “Análisis de la secuencia de genes asociados a la resistencia a antimicrobianos de aislados de *Bartonella bacilliformis* procedentes de zonas endémicas del Perú”, el cual permitirá conocer mejor la resistencia de esta bacteria a los antibióticos y desarrollar en el futuro un método de detección rápida de dicha resistencia.

Se invita a usted a participar en este estudio porque se le ha diagnosticado clínicamente Bartonelosis humana. Si decide participar, solamente tendrá que hacer 2 cosas: 1) Llenar una ficha clínica con sus datos personales, estado de salud y antibióticos que ha tomado; y 2) permitirnos obtener una muestra de sangre periférica que se colectará en 1 tubo estéril tipo vacutainer. En total, el volumen de sangre a colectar será solamente de 4ml.

A cambio de su colaboración se le proporcionará los resultados de la confirmación del diagnóstico de Enfermedad de Carrión hecho por hemocultivo y por un método molecular: PCR. Asimismo, se determinará la resistencia o no a los antibióticos de la bartonela con la que usted se ha infectado. Estos resultados serán conocidos solamente por el equipo de investigadores, su médico y usted. Ninguna publicación divulgará su nombre ni sus datos personales.

Usted puede hacernos todas las preguntas que desee y aceptar o no esta invitación; si acepta, le pedimos que firme este consentimiento indicando que ha recibido la información necesaria respecto a este estudio y que está dispuesto a participar en él.

HE DECIDIDO PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO Y SE ME HA OTORGADO UNA COPIA DE ESTE CONSENTIMIENTO.

Firma

.....

Nombre del participante

D.N.I:

Telf.:

Firma

.....

Nombre del personal que recaba
la autorización

D.N.I:

Telf.:

Anexo 07: **CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRA PARA PERSONAS MENORES DE EDAD**

Fecha: / /

La Enfermedad de Carrión o Bartonelosis humana es una enfermedad que se presenta en las regiones andinas del Perú. Es causada por una bacteria llamada *Bartonella bacilliformis* que ingresa a la sangre por la picadura del mosquito conocido como “manta blanca” o “titira”. La bacteria entra a los glóbulos rojos y los destruye, poniendo en riesgo la salud y la vida de las personas infectadas. Para controlar esta enfermedad, además de las acciones que viene tomando el Ministerio de Salud, sería ideal contar con una vacuna, con pruebas rápidas de diagnóstico de laboratorio y con un tratamiento antibiótico basado en estudios que permitan conocer si la bacteria muere o no frente a un antibiótico. Si la bacteria no muere con un antibiótico se dice que es “resistente” a éste. Existen evidencias de que esta bacteria está adquiriendo resistencia a algunos de los antibióticos recomendados, pero para conocer mejor esta situación nosotros consideramos necesario realizar estudios con bartonelas recientemente aisladas de pacientes.

Por estas razones, estamos haciendo una investigación sobre la resistencia a los antibióticos de aislados clínicos de *Bartonella bacilliformis* titulada “Análisis de la secuencia de genes asociados a la resistencia a antimicrobianos de aislados de *Bartonella bacilliformis* procedentes de zonas endémicas del Perú”, el cual permitirá conocer mejor la resistencia de esta bacteria a los antibióticos y desarrollar en el futuro un método de detección rápida de dicha resistencia.

Se invita a que su hijo o hija participe en este estudio porque se le ha diagnosticado clínicamente bartonelosis. Si decide participar, solamente tendrá que hacer 2 cosas: 1) Llenar una ficha clínica con sus datos personales, estado de salud y antibióticos que ha tomado; y 2) permitirnos obtener una muestra de sangre periférica que se colectará en 1 tubo estéril tipo vacutainer. En total, el volumen de sangre a colectar será solamente de 4ml.

A cambio de su colaboración se le proporcionará los resultados de la confirmación del diagnóstico de Enfermedad de Carrión hecho por hemocultivo y por un método molecular: PCR. Asimismo, se determinará la resistencia o no a los antibióticos de la bartonela con la que su hijo o hija se ha infectado. Estos resultados serán conocidos solamente por el equipo de investigadores, su médico y usted. Ninguna publicación divulgará su nombre ni sus datos personales.

Usted puede hacernos todas las preguntas que desee y aceptar o no esta invitación; si acepta, le pedimos que firme este consentimiento indicando que ha recibido la información necesaria respecto a este estudio y que está dispuesto a participar en él.

HE DECIDIDO PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO Y SE ME HA OTORGADO UNA COPIA DE ESTE CONSENTIMIENTO.

Firma

Firma

.....
Nombre del padre/madre/apoderado
del participante
D.N.I:
Telf.:

.....
Nombre del personal que recaba
la autorización
D.N.I:
Telf.:

Anexo 08: **PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.**

Parte de los resultados se publicó como trabajo original en la Revista Peruana de Biología:

Espinoza-Culupú A., R. Quispe-Gaspar, M. Jaramillo, M. Icho, A. Eca, P. Ramírez, D. Alvarado, J.C. Guerrero, F. Vargas-Vásquez, O. Córdova, R. García-de-la-Guarda. 2014. Molecular characterization of quinolones resistance determining region (QRDR) of *Bartonella bacilliformis* topoisomerasa IV in clinical isolates. Revista peruana de biología 21(1): 089-098 (Mayo 2014),
doi: [http:// doi.org/10.15381/rpb.v21i1.8251](http://doi.org/10.15381/rpb.v21i1.8251)

TRABAJOS ORIGINALES

Caracterización molecular de la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) de la topoisomerasa IV de *Bartonella bacilliformis* en aislados clínicos

Molecular characterization of quinolones resistance determining region (QRDR) of *Bartonella bacilliformis* topoisomerasa IV in clinical isolates

Abraham Espinoza-Culupú¹, Ruth Quispe-Gaspar¹, Michael Jaramillo¹, Melisa Icho¹, Anika Eca¹, Pablo Ramírez¹, Débora Alvarado¹, Juan Carlos Guerrero², Franklin Vargas-Vásquez³, Ofelia Córdova⁴, Ruth García-de-la-Guarda^{1*}

¹ Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología – Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. Apartado postal 110058, Lima-11, Perú.

² Establecimiento de Salud I-4 Huancabamba, Piura, Perú.

³ Instituto de Investigación en Microbiología y Parasitología Tropical - Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

⁴ Laboratorio de Biología Celular y Molecular - Dpto. de Ciencias - Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo, Perú.

*Autor para correspondencia R. García-de-la-Guarda: rgarciad@unmsm.edu.pe

Email A. Espinoza: aespinozac20@gmail.com

Email R. Quispe: ruty_lilly@yahoo.es

Email M. Jaramillo: maycol776@yahoo.es

Email M. Icho: m.bionicro@gmail.com

Email A. Eca: anikaeca@gmail.com

Email P. Ramírez: pramirez@unmsm.edu.pe

Email D. Alvarado: dalvaradoi@unmsm.edu.pe

Email J.C. Guerrero: guerreroruizjc@hotmail.com

Email F. Vargas-Vásquez: frvargasv@yahoo.es

Email O. Córdova: omacop@hotmail.com

Resumen

Bartonella bacilliformis es el agente etiológico de la Enfermedad de Carrion, endémica del Perú. Pocas investigaciones han sido realizadas acerca de los genes asociados a la resistencia antimicrobiana en aislados clínicos de este patógeno. Estos genes no están caracterizados molecularmente, ni se conoce la región asociada a dicha resistencia. Por ello, el objetivo del este trabajo fue caracterizar molecularmente la región determinante de la resistencia a las quinolonas (QRDR) en la topoisomerasa IV, que está codificada por los genes *parC* y *parE*, así como también desarrollar una prueba de susceptibilidad antimicrobiana para *B. bacilliformis*. Las muestras sanguíneas de 65 pacientes procedentes de La Libertad, Cusco, Ancash y Piura, se sembraron en placas de agar sangre e incubaron a 30 °C con 5% CO₂. Luego se procedió a: (1) determinar la susceptibilidad antimicrobiana y (2) extraer el DNA genómico, amplificar los genes mencionados, secuenciarlos y analizarlos mediante herramientas bioinformáticas. Se obtuvieron 6 cultivos positivos. Los aislados fueron sensibles a la ciprofloxacina (excepto uno procedente de Quillabamba-Cusco, que presentó susceptibilidad disminuida) y resistentes al ácido nalidixico. Del análisis de las secuencias aminoacídicas de ParC y ParE de *B. bacilliformis* se concluye que presentan diferencias aminoacídicas en comparación con las secuencias de las proteínas respectivas de *E. coli* K12 MG1655, que probablemente confieran resistencia al ácido nalidixico pero no a la ciprofloxacina. Se determinó que las QRDR de las proteínas ParC y ParE de *B. bacilliformis* están comprendidas entre los aminoácidos 67 al 118 y 473 al 530, respectivamente. El antibiograma y la concentración mínima inhibitoria se evalúan mejor usando inóculos a escala 1 de McFarland y a los 6 días de incubación.

Palabras clave: Susceptibilidad antimicrobiana; *Bartonella bacilliformis*; ParC; ParE; quinolonas.

Abstract

Bartonella bacilliformis is the etiologic agent of Carrion's disease, which is endemic to Peru. Studies on antimicrobial resistance genes from clinical isolates of this pathogen are scarce, and the molecular characteristics of these genes and their region resistance-associated are currently unknown. In this work we made the molecular characterization of the quinolone-resistance, and establish the region (QRDR) for the topoisomerase IV, which is encoded by the *parC* and *parE* genes, as well as develop an antimicrobial susceptibility test for *B. bacilliformis*. 65 Blood samples from La Libertad, Cusco, Ancash and Piura were processed on Blood Agar plates and incubated at 30 °C, 5% CO₂. The antimicrobial susceptibility was determined, then the genomic DNA extracted, aforementioned genes amplified, their sequence determined and it analyzed using bioinformatics tools. Six positive cultures were obtained. The isolates were susceptible to Ciprofloxacin (except one strain from Quillabamba – Cusco, which showed decreased susceptibility) and were resistant to Nalidixic Acid. From the sequence analysis of *B. bacilliformis* ParC and ParE there have been shown amino acid differences compared to the respective protein sequences from *E. coli* K12 MG1655, which is likely to confer resistance to Nalidixic Acid but not to Ciprofloxacin. It was determined that *B. bacilliformis* ParC and ParE proteins QRDRs are comprised between amino acids 67 to 118 and 473 to 530, respectively. The antibiogram and the minimal inhibitory concentration are best assessed using the #1 McFarland standards after a 6-day incubation period.

Keywords: antimicrobial susceptibility; *Bartonella bacilliformis*; ParC; ParE; quinolones.

Citación:

Espinoza-Culupú A., R. Quispe-Gaspar, M. Jaramillo, M. Icho, A. Eca, P. Ramírez, D. Alvarado, J.C. Guerrero, F. Vargas-Vásquez, O. Córdova, R. García-de-la-Guarda. 2014. Molecular characterization of quinolones resistance determining region (QRDR) of *Bartonella bacilliformis* topoisomerasa IV in clinical isolates. Revista peruana de biología 21(1): 089-098 (Mayo 2014), doi: <http://doi.org/10.15381/rpb.v21i1.8251>

Presentado: 18/01/2014
Aceptado: 30/04/2014
Publicado online: 26/05/2014

Journal home page: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/index>

© Los autores. Este artículo es publicado por la Revista Peruana de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citadas. Para uso comercial, por favor póngase en contacto con editor.revperubiol@gmail.com.

Introducción

Bartonella bacilliformis es el agente etiológico de la Enfermedad de Carrión, endémica de los valles interandinos del Perú. Esta enfermedad es de notificación obligatoria en el Perú y sus tasas de incidencia por regiones han variado a lo largo de décadas, con un número elevado de casos en Amazonas, Ancash y Piura en los últimos años (DGE, 2013). Se han usado diferentes antibióticos para el tratamiento de infecciones con *B. bacilliformis*, tales como eritromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, rifampicina, entre otros (MINSA 2006, Rolain et al. 2004). El tratamiento con estos antibióticos produce una rápida reducción de la bacteremia, sin embargo, se ha reportado casos en que la bacteremia persiste después de suspender el tratamiento con antibióticos (Rolain et al. 2004, Henríquez et al. 2004, Pérez et al. 2010, Biswas 2010).

Actualmente, la ciprofloxacina (Cip) es considerada como el tratamiento de primera línea en Perú, debido a su buena penetración celular (MINSA 2006, Tarazona et al. 2006). Existen reportes donde se menciona que el 22.6% de los pacientes presentaron bacteremia asintomática crónica después del tratamiento con Cip (Pachas 2000), a pesar que este antibiótico aparentemente es exitoso (Maguiña et al. 2001, Maguiña et al. 2008, Rolain et al. 2004). Además estudios previos han demostrado una susceptibilidad disminuida de *B. bacilliformis* a la Cip, también como a otras fluoroquinolonas (Flores 2008, Dörbecker et al. 2006, Sobraques et al. 1999). Asimismo, se ha determinado que las fluoroquinolonas usadas en monoterapias pueden ser inefectivas porque se han aislado fácilmente *B. bacilliformis* resistentes a Cip *in vitro* (Biswas et al. 2007). Recientemente, se ha determinado que *B. bacilliformis* presenta resistencia constitutiva a la quinolona ácido nalidíxico (Nal) (Del Valle et al. 2010). Asimismo, se ha demostrado que existen aislados de *B. bacilliformis* que están adquiriendo resistencia a rifampicina y eritromicina además de Cip (Minnick et al. 2003, Biswas et al. 2007). Maguiña et al. (2008), afirman que 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.

Actualmente existen pocas investigaciones acerca de la susceptibilidad a antimicrobianos *in vitro* de *B. bacilliformis*. No existe un antibiograma estandarizado para esta bacteria y tampoco se conocen los mecanismos de resistencia ni las secuencias de los genes asociados a dicha resistencia. La base molecular de la resistencia a las quinolonas, como ocurre en otros microorganismos, reside en mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) de los genes *gyrA*, *gyrB* de la topoisomerasa II y los genes *parC* y *parE* de la topoisomerasa IV (Law et al. 2010, Serra 2008, Hopkins et al. 2005).

Por consiguiente, el objetivo del presente estudio fue caracterizar la secuencia de la QRDR de ParC y ParE de aislados clínicos de *B. bacilliformis* de zonas endémicas, así como estandarizar un procedimiento para realizar el antibiograma y la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Material y métodos

Pacientes y muestras.- Se colectaron 65 muestras de sangre venosa en tubos al vacío con anticoagulante EDTA, a personas con síntomas de la Enfermedad de Carrión (DGE 2013), según

su historia clínica, para lo cual nos asistía el personal del centro de salud de la zona, con autorización verbal del Jefe de la Región de Salud respectiva dada después de haberle presentado el proyecto de la investigación.

Los muestreos fueron realizados en las siguientes zonas endémicas de la Enfermedad de Carrión (DGE 2013): a) Sondor (n=8), Sondorrillo (n=12) y Carmen de la Frontera (n=23), Departamento de Piura, b) Urubamba (n=5) y Quillabamba (n=10), Departamento de Cusco, c) Calipuy (n=4), Departamento de La Libertad, y d) Caraz (n= 3), Departamento de Ancash.

Declaración de ética.- El estudio fue aprobado bajo los lineamientos del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Todos los pacientes o adultos responsables firmaban por escrito el consentimiento informado para la toma de muestra y su posterior análisis. Los pacientes fueron informados que la muestra de sangre sería utilizada para fines de investigación y tomaban la decisión si aceptaban o rechazaban la toma de muestra.

Aislamiento de *B. bacilliformis*.- Para el aislamiento de esta bacteria a partir de sangre de pacientes, se emplearon placas de agar Columbia suplementado con 5% de glóbulos rojos de ovino y 2% de suero bovino fetal, así como tubos con medio bifásico compuestos por una fase sólida del mismo medio antes descrito y una fase líquida de caldo infusión cerebro corazón (BHI) (Colichón & De Bedon 1973; Coleman & Minnick 2001). Las placas se sembraron por diseminación con 200 µL de sangre homogeneizada y los tubos con medio bifásico con la adición de 800 a 1000 µL de sangre, siguiendo la metodología de Quispe (2009). Los cultivos se incubaron a 30 °C con 5% de CO₂ a una humedad relativa de 100% (Quispe 2009; Minnick et al. 2003) por seis a ocho días hasta su crecimiento. Los subcultivos y los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron en agar Columbia base (Merck) suplementado con 8% de glóbulos rojos de ovino.

Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana en *Bartonella bacilliformis*.- Se empleó la técnica de Kirby-Bauer (CLSI 2011, Restrepo 2002; Perilla et al. 2003) modificada según lo indicado por Pendle et al. (2006) para los ensayos de difusión en disco, y la prueba Épsilon para la CMI. Los cultivos de *B. bacilliformis* aislados de pacientes y las cepas del Instituto Pasteur de Francia CIP57.17 y CIP57.18, se resuspendieron en un volumen de 3 mL de solución salina fisiológica a pH 7.2 a una concentración celular equivalente a las escalas 0.5, 1 y 2 de McFarland. Se inoculó un volumen de 1.5 mL de las suspensiones bacterianas en las placas, bañando toda la superficie y aspirando el exceso con una micropipeta. Luego se procedió a colocar los discos de antibiótico (Oxoid) e incubar a 30 °C con 5% de CO₂ y a una humedad relativa de 100%. La evaluación del crecimiento e inhibición bacteriana en las placas se realizaron desde el día 5 hasta el 12. Para la susceptibilidad bacteriana se emplearon los siguientes antimicrobianos: discos de Cip (5 µg) y de Nal (30 µg), y tiras de Cip con una gradiente de concentración de 0.02 a 32 µg/ µL (tiras MICE de Oxoid).

Extracción de DNA.- La extracción del DNA genómico de las bartonelas, provenientes de cultivos en placas, se realizó usando el kit Miniprep de Wizard Genomic Purification (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Lavado del paquete celular.- Se hicieron 3 lavados de las células bacterianas con agua de grado molecular para eliminar los restos de medio de cultivo, centrifugando a 13000 rpm por 2 minutos y descartando el sobrenadante.

Lisis celular y acción de la RNasa.- Al sedimento de células bacterianas se le adicionó 600 µL de la solución de lisis e incubó a 80 °C por 5 minutos, luego se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos para adicionarle 3 µL de RNasa (4mg/mL) y se incubó a 37 °C por 1 hora.

Precipitación de proteínas.- Se agregó 200 µL de solución de precipitación de proteínas al lisado tratado con RNasa, se homogeneizó vigorosamente por 20 segundos e incubó por 5 minutos en hielo. Luego se centrifugó a 13000 rpm por 3 minutos colocando el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL.

Precipitación de DNA.- Al tubo de microcentrifuga con sobrenadante, se adicionó 600 µL de isopropanol absoluto mezclando suavemente por inversión, hasta formar una masa visible de DNA, para luego centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos, eliminando el sobrenadante cuidadosamente y escurriendo el tubo en papel absorbente limpio.

Lavado del DNA.- Al microtubo que contenía el sedimento de DNA se adicionó 600 µL de etanol al 70%, se mezcló por inversión varias veces para lavar el sedimento, luego se centrifugó a 13000 rpm por 2 minutos, se eliminó el sobrenadante cuidadosamente y se dejó secar el tubo de 10 a 15 minutos.

Hidratación del DNA.- El DNA fue rehidratado con 100 µL de solución de rehidratación de DNA por incubación a 65 °C por 1 hora, periódicamente se golpeaba el tubo suavemente para mezclar la solución. Finalmente se guardó a -20 °C hasta su uso.

Ensayo de PCR.- La amplificación por PCR del gen *ialB* de *B. bacilliformis* se realizó para confirmar la especie (Mitchell & Minnick 1995, Flores 2008). Posteriormente, se amplificó las regiones QRDR de los genes *parC* y *parE* de la topoisomerasa IV. Los iniciadores usados fueron ParC F: TCTTATGCTAAGTG-TGCACGGA y ParC R: TACCAACAGCAATCCCTGAAGAA (Flores, 2008), ParE F: GAAGTCGCACGAGAGCGCAA y ParE R: AGCGGAACCGTTCTTCCGGT (diseñados en este estudio). El parámetro de ciclaje fue: desnaturalización a 95 °C durante 3 minutos (1 ciclo), seguido de 29 ciclos a 94 °C por 30 segundos, hibridación a 57 °C (*parC*), 58 °C (*ialB*) y 62 °C (*parE*) por 30 segundos, extensión a 72 °C por 30 segundos y extensión final a 72 °C por 7 minutos. La mezcla de reacción en un volumen de 50 µL fue: 1.5 µL de cada iniciador (10 µM), 5 µL de dNTPs (2mM), 5 µL de buffer Kod Hot Start (10X), 3 µL de MgSO₄ (25mM), 1.5 µL de Taq KOD Hot Start (Novagen), 31.5 µL de agua grado molecular y 1 µL de DNA molde.

Para visualizar el DNA y los productos de amplificación, se hicieron electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 0.5X, mezclando las muestras con solución de carga 6X (Novagen). Se utilizó el marcador de tamaño molecular Perfect DNA™ 50 bp Ladder (Novagen). Luego de la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/mL), por 45 segundos, para visualizarlos en el transiluminador UV.

Secuenciación y análisis bioinformático.- Los amplificadores fueron secuenciados por la empresa Macrogen, con secuenciación estándar y por ambas direcciones. El análisis *in silico*

se realizó mediante herramientas bioinformáticas empleando Bioedit (Hall 1999) y MEGA 5.2 (Tamura et al. 2011) para evaluar y obtener la secuencia consenso de los genes. Posteriormente se usó CLUSTALW 2.1 (Thompson et al. 1994) para los alineamientos múltiples y determinar las posibles mutaciones en la secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, comparando nuestras secuencias con las depositadas en la base de datos GenBank para los genes *parC* y *parE* de *B. bacilliformis* KC583 y *E. coli* K-12 MG1655.

Modelamiento por homología del dominio QRDR de ParC y ParE de B. bacilliformis relacionadas a la resistencia antimicrobiana.- Con las secuencias aminoacídicas de *B. bacilliformis* se realizaron los modelamientos para localizar, en la estructura, los aminoácidos involucrados en la resistencia antimicrobiana. Para estos modelamientos se empleó el servidor online SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>). Los modelos fueron obtenidos en formato pdb y las estructuras tridimensionales se visualizaron con Swiss-Pdb Viewer 4.1.0 y Jmol13.

Obtención de las secuencias de genes relacionados a resistencia antimicrobiana en el GenBank.- Se accedió al GenBank para obtener las secuencias de los genes de la topoisomerasa IV de *B. bacilliformis* KC583 *parC* y *parE* (Gene ID: 4684170 y 4684565), y para *E. coli* cepa K-12 MG1655 (Gene ID: 947499 y 947501) para compararlas con nuestras secuencias obtenidas.

Finalmente las secuencias nucleotídicas de los aislados de *B. bacilliformis*, obtenidos en el presente estudio, fueron ingresadas a la base de datos EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>) con los números de acceso siguientes: HG315965, HG315966, HG315967 para el gen *parC* y HG315962, HG315963, HG315964 para el gen *parE*.

Resultados

De los muestreos realizados se obtuvieron seis cultivos positivos (9%) con características culturales compatibles con *B. bacilliformis*. A los cultivos positivos se les codificó con USM-LMMB (Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología), seguido del número del aislado: USM-LMMB-001 (Calipuy - La Libertad); USM-LMMB-002 y USM-LMMB-006 (Quillabamba – Cuzco); USM-LMMB-003 (Urubamba- Cuzco); USM-LMMB-005 (Sondor- Piura); USM-LMMB-007 (Carmen de la frontera – Piura). Los seis cultivos fueron positivos a la amplificación del gen *ialB*, indicando que los cultivos corresponden a *B. bacilliformis*.

Susceptibilidad antimicrobiana en Bartonella bacilliformis.- Se ha estandarizado el procedimiento para realizar el antibiograma y la CIM (mediante la prueba Épsilon) para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *B. bacilliformis*. Se obtuvieron crecimientos uniformes en las placas, siendo el inóculo con el que se visualizaron mejor los halos de inhibición del crecimiento bacteriano, el que estaba a una concentración celular equivalente al tubo N° 1 de la escala de McFarland (Fig. 1, Tabla 1, Fig. 2 y Tabla 2). En cuanto al tiempo de incubación óptimo para hacer la medición del diámetro de dichos halos, éste resultó ser el día 6 después de la siembra de las placas, debido a que fue el menor tiempo en el que se observaron los halos mejor definidos (Tablas 1 y 2).

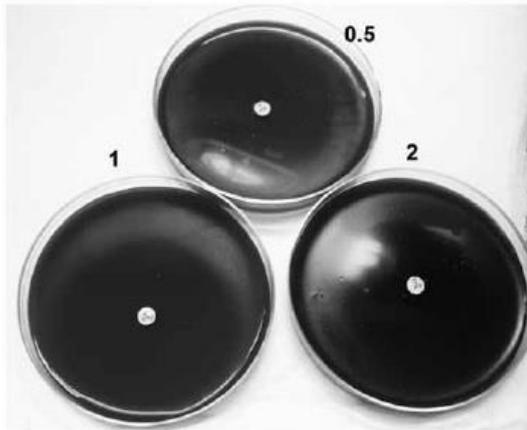


Figura 1.- Estandarización del procedimiento para realizar el antibiograma mediante difusión en agar con disco de Cip (5µg) para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *B. bacilliformis*. Los ensayos se hicieron con la cepa USM-LMMB-005, ajustando los inóculos a los tubos N° 0.5 (placa superior), 1 (placa de la izquierda) y 2 (placa de la derecha) de la escala de McFarland. Las lecturas se hicieron hasta los 12 días.

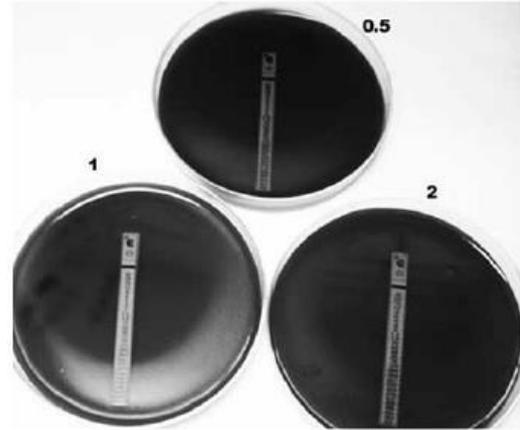


Figura 2.- Estandarización del procedimiento para realizar la CIM mediante la prueba Épsilon con tiras de Cip con una gradiente de concentración de 0.02 a 32 µg/ µL para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *B. bacilliformis*. Los ensayos se hicieron con la cepa USM-LMMB-005, ajustando los inóculos a los tubos N° 0.5 (placa superior), 1 (placa de la izquierda) y 2 (placa de la derecha) de la escala de McFarland. Las lecturas se hicieron hasta los 12 días.

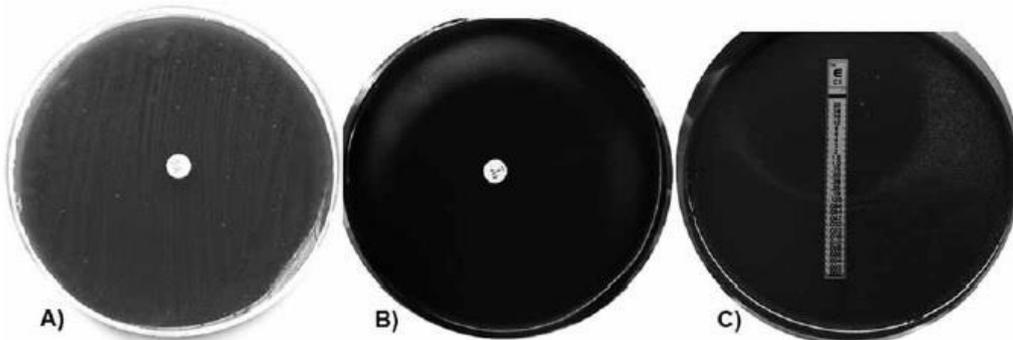


Figura 3.- Susceptibilidad antimicrobiana de *B. bacilliformis* USM-LMMB-005: En A, mediante disco difusión en agar para el ácido nalidixico (6mm, resistente) y en B, para la Cip (52mm, sensible). En C, prueba Épsilon para Cip (0.023 mg/L). Los ensayos se hicieron usando una suspensión celular equivalente a la escala 1 de McFarland, evaluándose hasta los 12 días de incubación.

Tabla 1.- Valores del diámetro en milímetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano de *B. bacilliformis* en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana a la Cip, mediante difusión por disco en agar, con inóculos ajustados a tres tubos de la escala de McFarland y mediciones de los halos en diferentes tiempos de incubación.

Escala McFarland	Tiempo de incubación (días)			
	5	6	7	12
0,5	N.D	52(ED)	52	52
1	52(ED)	52	52	52
2	52(ED)	52	52	52

ND: No definido.
ED: Empezando a definirse el halo.

Tabla 2.- Valores para *B. bacilliformis* de la CIM en mg/L mediante la prueba Épsilon con tiras de Cip, con inóculos ajustados a tres tubos de la escala de McFarland y evaluaciones en diferentes tiempos de incubación.

Escala McFarland	Tiempo de incubación (días)			
	5	6	7	12
0,5	N.D	0.023(ED)	0.023	0.023
1	0.023(ED)	0.023	0.023	0.023
2	0.032(ED)	0.032	0.032	0.032

ND: No definido.
ED: Empezando a definirse el halo.

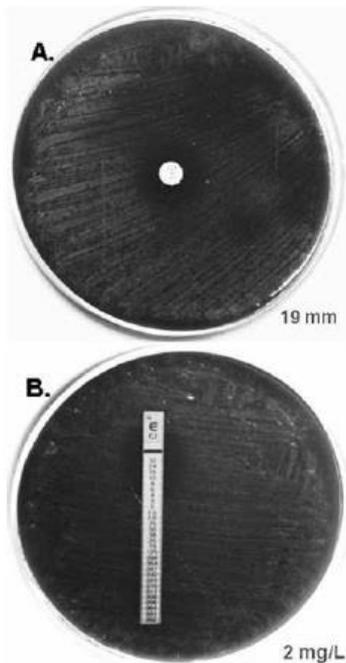


Figura 4. Susceptibilidad disminuida a la ciprofloxacina de la cepa *Bartonella bacilliformis* USM-LMM-002: A. Prueba Épsilon que determinó una CMI de 2 mg/L con tiras de Cip (gradiente de concentración de 0.02 a 32 µg/ µL), B. Halo de inhibición del crecimiento de 19 mm con disco de Cip (5 µg).

Con respecto a la susceptibilidad de los aislados obtenidos, todos mostraron resistencia al Nal (Fig. 3A), y fueron sensibles a Cip (Fig. 3B y 3C), a excepción del aislado USM-LMM-002 procedente de Quillabamba - Cusco, que mostró susceptibilidad disminuida a Cip (Fig. 4).

Amplificación de genes de la topoisomerasa IV de *Bartonella bacilliformis*. - Las amplificaciones de las QRDR de los genes de la topoisomerasa IV se evidenciaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los carriles del 1 al 4 corresponden al amplificado de la QRDR del gen *parC* con un tamaño de 349 pb, y los carriles del 5 al 8 al amplificado de la QRDR del gen *parE* con un tamaño de 1495pb como se muestra en la Fig. 5.

Análisis *in silico* de la subunidad A (ParC) y subunidad B (ParE) de la topoisomerasa IV de *Bartonella bacilliformis*. - El análisis se hizo comparando las secuencias de ParC y ParE de *B. bacilliformis* con las de *E. coli* K12 debido a que en esta bacteria se conocen mejor las QRDR y las sustituciones de aminoácidos en las posiciones que alteran la susceptibilidad a las quinolonas. De esta manera hemos deducido las posiciones equivalentes en *B. bacilliformis*.

Secuencias aminoacídicas de ParC. - En el análisis de las secuencias aminoacídicas de ParC de los aislados de *B. bacilliformis*, se encontró que existen diferencias a nivel de los aminoácidos 80 y 94 (Ser por Ala) dentro de la QRDR, comparando con la QRDR de ParC de *E. coli* K12. Además se encontraron otros cambios muy cercanos al sitio activo en los aminoácidos 123 y 129 también de Ser por Ala. El aislado USM-LMMB-003

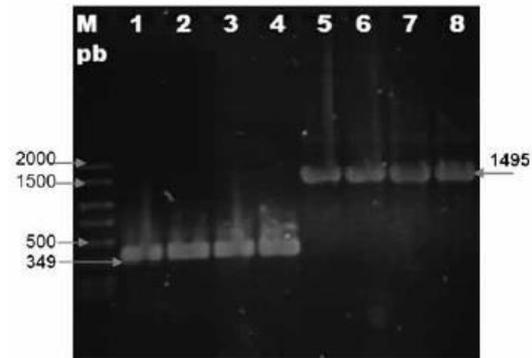


Figura 5.- Amplificados de la QRDR de los genes de la topoisomerasa IV: gen *parC* con tamaño de 349 pb correspondientes a los carriles del 1 al 4 y gen *parE* con tamaño de 1495 pb correspondiente a los carriles del 5 al 8. Se utilizaron las siguientes cepas: CIP57.17, carriles 1 y 5; USM-LMMB-005, carriles 2 y 6; USM-LMMB-006 carriles 3 y 7; USM-LMMB-007, carriles 4 y 8. M1 corresponde al marcador Perfect DNA™ 50 bp Ladder Novagen®.

presentó diferencias aminoacídicas (Tyr por Asp) fuera de la QRDR (color celeste, Fig. 6) en los aminoácidos 124, 149, 164, 167 y 175 (numeración correspondiente a *B. bacilliformis*) incluso en el sitio activo.

Secuencias aminoacídicas de ParE. - En el análisis de las secuencias aminoacídicas de ParE, no se encontró ninguna diferencia dentro de la QRDR entre los aislados, pero sí se encontraron diferencias en relación a *E. coli* K12, en el aminoácido 441 (Lys por Arg), que es el más reportado para cepas con resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli*. También en el aminoácido 451 se puede observar un cambio de Ser por Ala como se muestra en la Fig. 7B. Analizando las secuencias nucleotídicas del gen *parE* de los aislados de *B. bacilliformis*, se encontraron en USM-LMMB-005 dos mutaciones puntuales a nivel nucleotídico, las cuales no produjeron cambios en los aminoácidos 328 y 458 (Fig. 7A).

Modelamiento por homología del dominio QRDR de ParC y ParE de *B. bacilliformis* relacionadas a la resistencia antimicrobiana. - En la estructura terciaria del QRDR de ParC y ParE de *B. bacilliformis* se pudo apreciar cambios en la estructura terciaria en las posiciones donde existe una diferencia aminoacídica de Ser por Ala, cuando se le compara con *E. coli* K12. Estos cambios sugieren una débil interacción con la quinolona, los cambios son resaltados en círculo rojo como se observan en la Figuras 8 y 9

Discusión

La Enfermedad de Carrión aún continúa siendo un problema de salud pública en Perú, a pesar de su importancia actualmente existen pocos estudios sobre la resistencia antimicrobiana de este patógeno. El presente estudio es a nuestro entender el primer trabajo sobre caracterización molecular de genes asociados a la resistencia antimicrobiana de aislados de *B. bacilliformis* de zonas endémicas del Perú. Este trabajo es de gran importancia, porque a pesar que las especies de *Bartonella* son altamente susceptibles a pruebas de antibióticos (Dörbecker et al. 2006), existen reportes

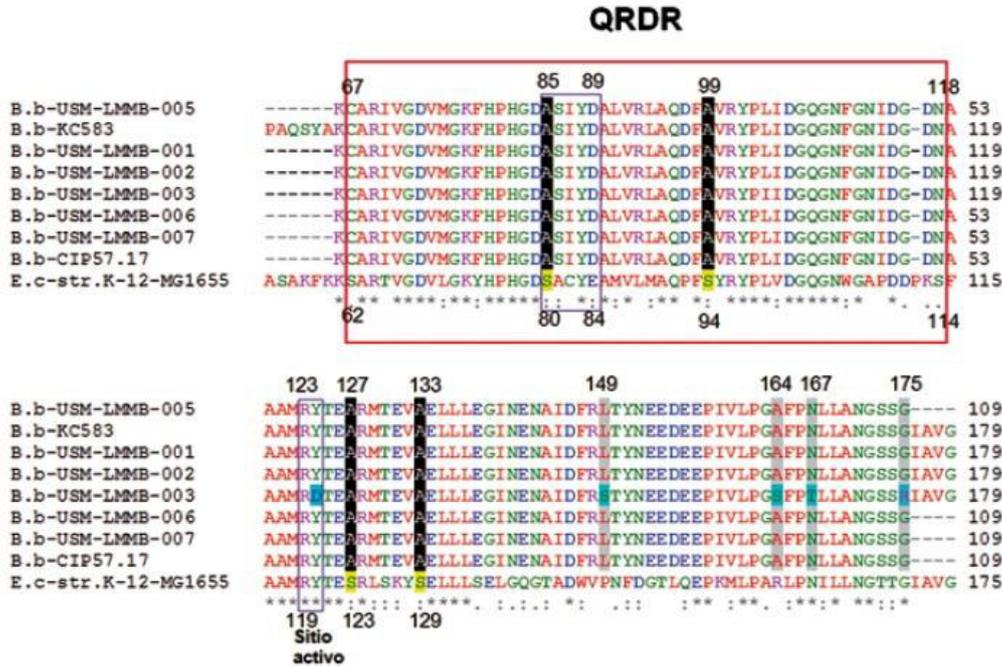


Figura 6.- Alineamiento múltiple de las secuencias aminoácidas de ParC de la cepa de *Bartonella bacilliformis* KC 583 y de las aisladas, comparadas con ParC de *E. coli* K12, utilizando el programa ClustalW 2.1. Las sustituciones aminoácidas (Ser por Ala) están resaltadas en color negro. La numeración en la parte inferior corresponde a las posiciones de los aminoácidos de la proteína ParC de *E. coli* (NP_417491.1) y en la parte superior su equivalente en *B. bacilliformis* (YP_989154.1).

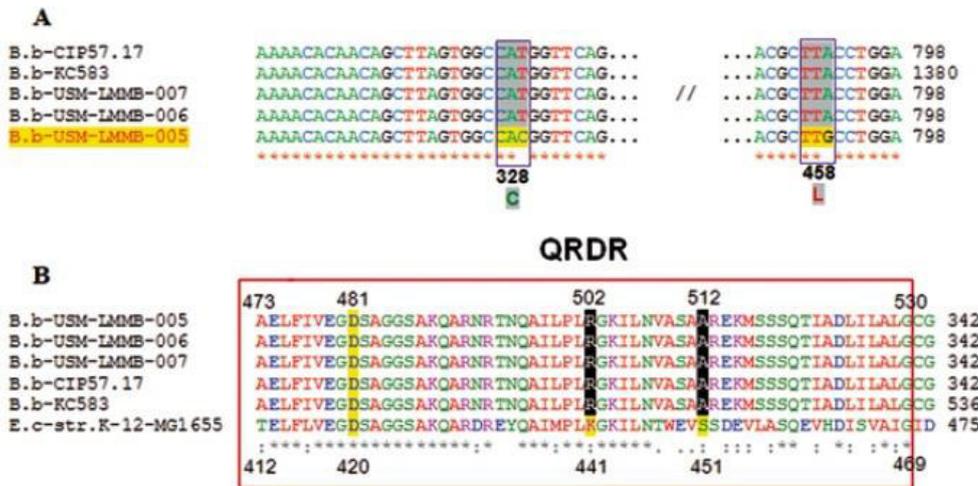


Figura 7.- Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas de los aislados de *Bartonella bacilliformis* y de la cepa KC583. En A, el alineamiento muestra las mutaciones puntuales del aislado USM-LMMB-005 que no produjeron cambios en el aminoácido respectivo y en B, el alineamiento muestra las secuencias aminoácidas de ParE de la cepa de *Bartonella bacilliformis* KC583 y las aisladas, comparadas con ParE de *E. coli* K12, utilizando el programa ClustalW 2.1. Se indica sus respectivos aminoácidos cambiantes (Lys por Arg) resaltado en color negro. La numeración en la parte inferior corresponde a las posiciones de los aminoácidos de la proteína ParE de *E. coli* (NP_417502.1) y en la parte superior su equivalente para *B. bacilliformis* (YP_989184.1).

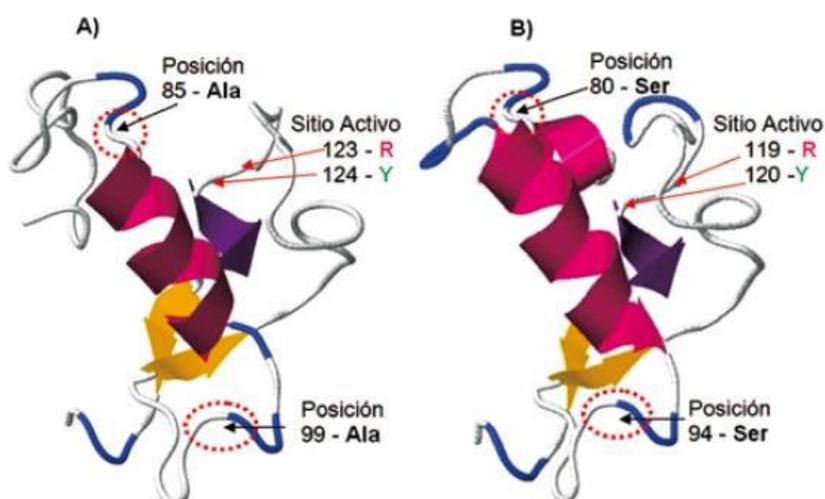


Figura 8.- Estructura tridimensional de la QRDR de ParC de *Bartonella bacilliformis* por homología con ParC de *Escherichia coli* K12 (Protein Data Base (PDB): 1ZVU). En A, se muestra la QRDR de *B. bacilliformis* y en B, la QRDR de *E. coli* K12 MG1655. Las flechas de color negro indican la posición donde existen diferencias aminoacídicas entre *B. bacilliformis* y *E. coli* K12, observando un cambio en la estructura para *B. bacilliformis*, que se resalta en un círculo rojo. Las flechas rojas indican las posiciones correspondientes al sitio activo.

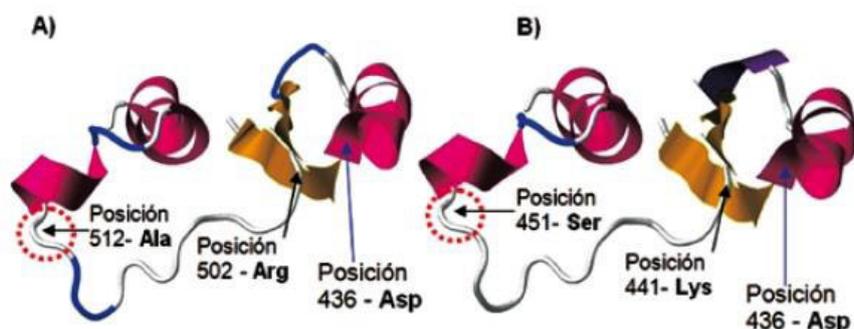


Figura 9.- Estructura tridimensional de la QRDR de ParE de *Bartonella bacilliformis* por homología con ParE de *Acinetobacter baumannii* (PDB: 2XKK). En A, se muestra la región de la QRDR de *B. bacilliformis* y en B, la QRDR de *E. coli* K12 MG1655. Las flechas de color negro indican la posición donde existen diferencias aminoacídicas entre *B. bacilliformis* y *E. coli* K12, observando un cambio en la estructura para *B. bacilliformis*, que se resalta en un círculo rojo. La flecha azul indica la localización del aminoácido Asp, que es importante porque se han reportado cepas resistentes a quinolonas cuando hay mutación en esta posición.

Tabla 3.- Valores obtenidos de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Bartonella bacilliformis* ensayadas para ciprofloxacina y ácido nalidíxico.

CEPAS	E-	KirbyBauer (mm)	
	Cip	Cip	AN
CIP 57.17	0.125	46	6
CIP 57.18	0.015	55	6
USM-LMMB-001	0.125	50	6
USM-LMMB-002	2	19	6
USM-LMMB-003	0.125	50	6
USM-LMMB-005	0.023	52	6
USM-LMMB-006	0.023	50	6
USM-LMMB-007	0.19	78	6

de fallas en la monoterapia para las enfermedades relacionadas a *Bartonella* usando beta-lactámicos, macrólidos, tetraciclina, rifampicina o fluoroquinolonas (Biswas et al. 2007). Los aislados de *B. bacilliformis* presentaron una CIM para Cip que oscilaba entre 0.19 y 0.023 mg/L (Tabla 3), la que concuerda con los valores de CIM descritos en la literatura (Sobraquès et al. 1999, Döbecker et al. 2006, Angelakis et al. 2008). En cuanto a la susceptibilidad mediante Kirby-Bauer, los aislados analizados mostraron resistencia al Nal (primera quinolona) y sensibilidad a la Cip (Fig. 3).

El análisis *in silico* de las secuencias aminoacídicas de ParC y ParE de *B. bacilliformis* se hizo comparando las secuencias de éstas en *E. coli* K12 debido a que en esta bacteria se conocen mejor las QRDR y las sustituciones de aminoácidos que alteran la susceptibilidad a las quinolonas. Mediante esta comparación hemos deducido las posiciones equivalentes de los aminoácidos entre *E. coli* y *B. bacilliformis* tal como lo realizaron Del Valle et al. (2010).

De acuerdo con nuestros resultados, la QRDR de la proteína ParC (subunidad A de la topoisomerasa IV) de *Bartonella bacilliformis* comprendería desde el aminoácido 67 al 118 (Fig. 7). El análisis de la QRDR de ParC revela que todos los aislados de *B. bacilliformis* presentan sustituciones de Ser por Ala en los aminoácidos 85 y 99 (numeración equivalente a 80 y 94 en *E. coli*) en comparación a ParC de *E. coli* K12 (Fig. 6). Las mutaciones en los aminoácidos 78, 80 y 84 de la QRDR de ParC de *E. coli* K12, son las más descritas y relacionadas a la resistencia a quinolonas (Hopkins et al. 2005, Serra 2008). En las posiciones 119 (Arg) y 120 (Tyr) que corresponden al sitio activo de esta enzima, no se encontraron sustituciones aminoacídicas. Además, las posiciones 123 y 129 cercanas al sitio activo, también presentan cambios de Ser por Ala. Estas sustituciones dentro de la QRDR también han sido encontradas en *Bartonella* spp. y otras bacterias intracelulares como *Tropheryma whipplei* en la que se ha reportado heterogeneidad de la susceptibilidad frente a las fluoroquinolonas (Masselot et al. 2003, Angelakis et al. 2008, Angelakis et al. 2009). Varios estudios mencionan que las mutaciones de Ser por Ala en dichas posiciones están asociadas a la resistencia natural a las fluoroquinolonas (Cambau et al. 1994, Rodríguez et al. 2001, Del Valle et al. 2010). Estos estudios explicarían la resistencia al Nal en todos los aislados de *B. bacilliformis* obtenidos en el presente trabajo. Es importante señalar que a pesar de encontrar las mutaciones para la resistencia a la quinolona Nal, posiblemente otras mutaciones en el gen *parC* de estas bacterias o en otros genes deberían ser necesarias para que ocurra la resistencia a las fluoroquinolonas (como por ejemplo a la Cip). Actualmente, la Cip parece ser efectiva en el tratamiento recomendado por el MINSA, sin embargo existe adquisición de resistencia por mutaciones acumuladas en estos genes. Por tanto, como fue recomendado en otros estudios (Angelakis et al. 2008, Del Valle et al. 2010) se debe de evitar el uso de Cip como monoterapia en el tratamiento de esta enfermedad.

Los resultados de este estudio sugieren que la QRDR de ParE (subunidad B de la DNA topoisomerasa IV) de *B. bacilliformis* está comprendida entre los aminoácidos 473 y 530, como se muestra en la Fig. 7. La mayoría de mutaciones descritas en la QRDR de ParE de *E. coli* K12, que es homóloga es GyrB (Ruiz et al. 1987), están entre los aminoácidos 412 y 469. El análisis de las secuencias aminoacídicas de ParE de *B. bacilliformis* no

reveló cambios entre las secuencias, sin embargo, dentro de la QRDR se presentaron dos sustituciones aminoacídicas en las posiciones 441 (Lys por Arg) y 451 (Ser por Ala) en comparación con *E. coli* K12. La posición 420, resaltada en amarillo (Fig. 7), se encontró sin cambios. Los cambios tanto en la posición 420 como 441 y sus equivalentes en *B. bacilliformis* (481 y 502, respectivamente), son las más citadas en cepas resistentes a quinolonas en *E. coli* (Hopkins et al. 2005, Sorlozano et al. 2007, Jiménez et al. 2009). También se han reportado cambios en los aminoácidos 416 (Leu por Phe), 445 (Leu por His) y 458 (Ser por Ala). Estas mutaciones ya descritas (Hopkins et al. 2005, Sorlozano et al. 2007, Jiménez et al. 2009) no fueron encontradas en las secuencias de *B. bacilliformis* del presente estudio. Las mutaciones en otras posiciones podrían ser importantes para la resistencia o disminución de la susceptibilidad, como lo es el cambio en el aminoácido 451, que en *E. coli* K12 es una Ser y su equivalente en *B. bacilliformis* es Ala. Las sustituciones del mismo tipo (Ser por Ala) reportadas en el aminoácido 458, confieren resistencia en cepas de *E. coli* productoras de β lactamasas de espectro extendido (Sorlozano et al. 2007). De los aislados de *B. bacilliformis*, USM-LMMB-005 presentó mutaciones puntuales en el nucleótido de la tercera posición, las que no produjeron cambios en el aminoácido respectivo (328 y 458). El aminoácido 458 se encuentra cercano a la QRDR de ParE, por lo que es probable que los cambios nucleotídicos adicionales a éstos puedan contribuir a generar resistencia. Justamente este aislado, USM-LMMB-005 procedente de la localidad de Sondorillo es donde se reportaron fallas al tratamiento con Cip. Es posible que en las cepas de *B. bacilliformis* circulantes en esta localidad se acumulen mutaciones en las secuencias de estos genes asociados a la resistencia a Cip, lo que podría estar contribuyendo a la resistencia para este grupo de antibióticos; es por ello que en esta localidad se trata a los pacientes con la Enfermedad de Carrión, con ceftriaxona en vez de Cip.

Mediante herramientas bioinformáticas se realizó el modelamiento de la probable estructura tridimensional de la QRDR de las proteínas ParC y ParE de *B. bacilliformis* (Fig. 8 y 9). Para esto, se realizó una comparación con la estructura de la topoisomerasa IV de *Escherichia coli* y *A. baumannii*, mostrando las sustituciones que existen en relación con *E. coli* K12, sin embargo, al evaluar la estructuras terciarias de las QRDR se apreciaron cambios estructurales colocando un círculo punteado de color rojo en éstos, sugiriendo una débil interacción de la quinolona y su blanco, los cambios observados de Ser por Ala, podrían estar alterando los patrones de hidrofobicidad que se relacionan con la estructura de la proteína.

En conclusión, se obtuvieron seis aislados de *B. bacilliformis*, todos fueron resistentes al Nal, sensibles a Cip y uno de ellos, USM-LMMB-002 procedente de Quillabamba – Cusco, presentó susceptibilidad disminuida a la Cip. Se determinó que las QRDR de las proteínas ParC y ParE de *B. bacilliformis* están comprendidas entre los aminoácidos 67 al 118 y 473 al 530, respectivamente. Se sugiere que el cambio con relación a *E. coli* K12 de Ser por Ala en ParC de *B. bacilliformis* determinaría la resistencia al Nal pero no a la Cip. Con respecto al antibiograma y a la CMI (con tiras de la prueba Épsilon) para *B. bacilliformis*, concluimos que los halos de inhibición del crecimiento bacteriano se visualizan mejor cuando las placas Petri se siembran por “inundación” bañándolas con inóculos de 1.5 mL a la escala 1 de McFarland, e incubándolas durante 6 días.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) por el financiamiento al proyecto N° 323-2010-CONCYTEC-OAJ y al VRI-UNMSM Proyecto N° 111001032. A los técnicos de laboratorio Nexar Alvarado, Jesús Paico y Rosa Pintado del Centro de Salud de Huancabamba - Piura. Al Dr. Jorge Cortez y a Teófanos Paredes del Centro de Salud de Calipuy - Stgo. de Chuco, La Libertad; al Dr. Manuel Montoya del Cusco; al Biólogo Paul Pacheco Román del Centro de Salud de Urubamba-Cusco; a la Técnica de laboratorio Flor Céspedes del Centro de Salud de Uchumayo - Quillabamba, Cusco; y a los biólogos José Luis Ramos Coveñas y Martín Nizama Teixeira; todos ellos por brindarnos su apoyo en la toma de muestras. A los Dres. Joaquim Ruiz del Hospital Clinic de Barcelona y Luis Del Valle de la Universitat Politècnica de Catalunya, por su apoyo en la revisión del manuscrito de la tesis de Ruth Quispe, algunos de cuyos resultados están incluidos en el presente artículo. Esta publicación es parte de la tesis para optar al grado de Magíster en Biología Molecular de Abraham Espinoza Culpupú, bajo la asesoría de Ruth García de la Guarda.

Literatura citada

- Angelakis E., S. Biswas, C. Taylor, et al. 2008. Heterogeneity of susceptibility to fluoroquinolones in *Bartonella* isolates from Australia reveals a natural mutation in *gyrA*. *J Antimicrob Chemother.* 61(6):1252-1225. doi: 10.1093/jac/dkn094
- Angelakis E., D. Raoult & J.M. Rolain. 2009. Molecular characterization of resistance to fluoroquinolones in *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana*. *J Antimicrob Chemother.* 63(6):1288-1289. doi: 10.1093/jac/dkp133.
- Biswas S., D. Raoult, & J.M. Rolain. 2007. Molecular mechanisms of resistance to antibiotics in *Bartonella bacilliformis*. *J Antimicrob Chemother.* 59(6):1065-1070. doi: 10.1093/jac/dkm105
- Biswas S. & J.M. Rolain. 2010. *Bartonella* infection: treatment and drug resistance. *Future Microbiol.* 5(11):1719-1731. doi:10.2217/fmb.10.133.
- Cambau E., W. Sougakoff, M. Besson, et al. 1994. Selection of a *gyrA* mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to fluoroquinolones during treatment with ofloxacin. *J Infect Dis.* 170(5):1351.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. M100-S21 Vol. 31 N°. 1. Wayne, Pennsylvania, USA.
- Coleman S.A. & M.F. Minnick. 2003. Differential expression of the invasion-associated locus B (*ialB*) gene of *Bartonella bacilliformis* in response to environmental cues. *Microb Pathog.* 34(4):179-186. [http://dx.doi.org/10.1016/S0882-4010\(03\)00005-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0882-4010(03)00005-6)
- Colichon H. & C.F. De Bedon. 1973. Carrion's disease: useful nutrients for the growth of *Bartonella bacilliformis*. *Rev Latinoam Microbiol.* 15(2):75-79.
- Del Valle L.J., L. Flores, M. Vargas, R. García-de-la-Guarda, et al. 2010. *Bartonella bacilliformis*, endemic pathogen of the Andean region, is intrinsically resistant to quinolones. *Int J Infect Dis.* 14(6):506-510. doi:10.1016/j.ijid.2009.07.025
- DGE (Dirección General de Epidemiología). 2013. Sala situacional para el Análisis de Situación de Salud. Enfermedad de Carrion <http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=14&Itemid=154>
- Dörbecker C., A. Sander, K. Oberle, et al. 2006. In vitro susceptibility of *Bartonella* species to 17 antimicrobial compounds: comparison of E-test and agar dilution. *J Antimicrob Chemother.* 58(4):784-788. doi: 10.1093/jac/dkl341
- Flores L. 2008. Estudios moleculares en *Bartonella bacilliformis* para el control de la Enfermedad de Carrion. Tesis para optar el grado académico de Magíster en Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 156 pp.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>>. [accedido 18/02/13].
- Henriquez C., C. Hinojosa & P. Ventosilla. 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.
- Hiroshi Y. & R. Katsumata. 2006. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Journal of Bioscience Biotechnology and Biochemistry.* 70(5): 1060-1075. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.70.1060>
- Hopkins K.L., R.H. Davies & E.J. Threlfall. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents.* 25(5):358-373. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.02.006
- Jiménez A., A. Jimenez, M. Arrabal, et al. 2009. Resistencias a quinolonas en aislados clínicos de *Escherichia coli* productores de betalactamasas de espectro extendido. *Higiene y Sanidad Ambiental.* 9: 449-466.
- Law DK, M Shuel, S Bekal, et al. 2010. Genetic detection of quinolone resistance in *Haemophilus parainfluenzae*: Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC*. *Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology.* 21:e20-2.
- Maguiña C., P.J. García, E. Gotuzzo, et al. 2001. Bartonellosis (Carrion's disease) in the modern era. *Clinical Infectious Diseases* 33(6): 772-779. doi: 10.1086/322614
- Maguiña C., C. Ugarte-Gil, P. Breña, et al. 2008. Actualización de la Enfermedad de Carrion. Update of Carrion's disease. *Rev Med Hered.* 19 (1): 036-041.
- Masselot F., A. Boulou, M. Maurin, et al. 2003. Molecular evaluation of antibiotic susceptibility: *Tropheryma whipplei* paradigm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(5):1658-1664. doi: 10.1128/AAC.47.5.1658-1664.2003
- Minnick M.F., Z.R. Wilson, L.S. Smitherman, et al. 2003. *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant *Bartonella bacilliformis* strains obtained in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(1): 383-386. doi: 10.1128/AAC.47.1.383-386.2003
- MINSA. 2006. Norma Técnica N° 048-MINSA/DGSP-V.01. "Atención de la Bartonelosis o Enfermedad de Carrion en el Perú". 74 pp.
- Mitchell S.J. & M.F. Minnick. 1995. Characterization of a two-gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes. *Infection and Immunity* 63(4):1552-62.
- Pachas P. 2000. Epidemiología de la Bartonelosis en el Perú. Módulos Técnicos - Serie documentos monográficos. Lima, PE: Oficina General de Epidemiología/Instituto Nacional de Salud. 83 pp.
- Pendle S., A. Ginn & J. Iredell. 2006. Antimicrobial susceptibility of *Bartonella henselae* using Etest methodology. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(4):761-3. doi:10.1093/jac/dki485
- Perez-Martinez L., J.R. Blanco & J.A. Oteo. 2010. Treatment of human infections caused by *Bartonella* spp. *Revista española de quimioterapia* 23(3):109-114.
- Perilla M., G. Ajello, Ch. Bopp, et al. 2003. Manual for the Laboratory Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Pathogens of Public Health Importance in the Developing World. CDC and WHO. 186 pp.
- Quispe R. 2009. Caracterización molecular de los genes asociados a la resistencia antimicrobiana en *Bartonella bacilliformis*. Tesis de Pre-Grado. Facultad de Ciencias Biológicas. E.A.P. Microbiología y Parasitología -Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 65 pp.
- Restrepo M., M. Robledo & E. Bedoya. 2002. "Enfermedades Infecciosas", 5^{ta}, Editorial Corporaciones para las Investigaciones Biológicas. Medellín-Colombia. 506 pp.
- Rodríguez J.C., M. Ruíz, A. Climent, et al. 2001. In vitro activity of four fluoroquinolones against *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17(3):229-231. doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00337-X

- Rolain J.M., P. Brouqui, J.E. Koehler, et al. 2004. Recommendations for treatment of human infections caused by Bartonella species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(6):1921-1933. doi: 10.1128/AAC.48.6.1921-1933.2004
- Ruiz J., S. Casellas, M.T. Jimenez de Anta, et al. 1997. The region of the parE gene, homologous to the quinolone-resistant determining region of the gyrB gene, is not linked with the acquisition of quinolone resistance in Escherichia coli clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(6):839-840.
- Serra A. 2008. Quinolonas. Facultad de Medicina UBA. Separata 2008- Vol 16 N° 3.
- Sobraques M., M. Maurin, R.J. Birdes, et al. 1999. In vitro susceptibilities of four Bartonella bacilliformis strains to 30 antibiotic compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(8):2090-2092.
- Sorlozano A., J. Gutierrez, A. Jimenez, et al. 2007. Contribution of a new mutation in parE to quinolone resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 45(8):2740-2742. doi: 10.1128/JCM.01093-07
- Tarazona A., C. Maguiña, D. López de Guimaraes, et al. 2006. Terapia antibiótica para el Manejo de la Bartonelosis o Enfermedad de Carrion en el Perú. *Rev Perú MedExp Salud Pública* 23(3): 188-200.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, et al. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10):2731-2739. doi: 10.1093/molbev/msr121.
- Thompson J., D.G. Higgins & T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22):4673-80. doi:10.1093/nar/22.22.4673.