

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.biomicro@gmail.com

Email A. Eca: anikaeca@gmail.com

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

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

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

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

Email O. Córdova: omacop@hotmail.com

Resumen

Bartonella bacilliformis es el agente etiológico de la Enfermedad de Carrión, 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 nalidíxico. 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 nalidíxico 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, Perez 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.

Secuenciamiento y análisis bioinformático.- Los amplificadores fueron secuenciados por la empresa MacroGen, con secuenciamiento 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).

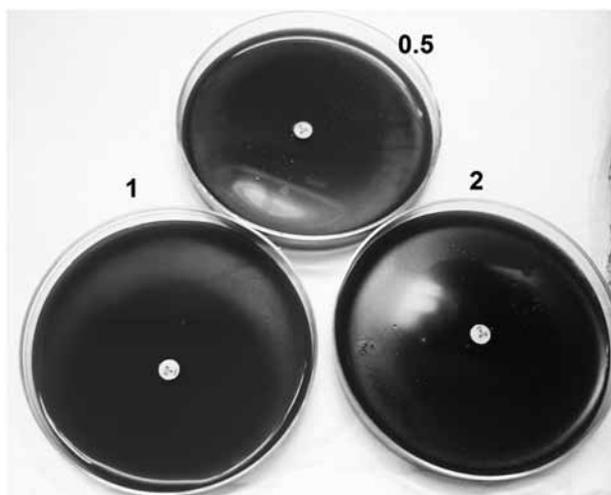


Figura 1.- Estandarización del procedimiento para realizar el antibiograma mediante difusión en agar con disco de Cip (5µg) para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *B. bacilliformis*. Los ensayos se hicieron con la cepa USM-LMMB-005, ajustando los inóculos a los tubos N° 0.5 (placa superior),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

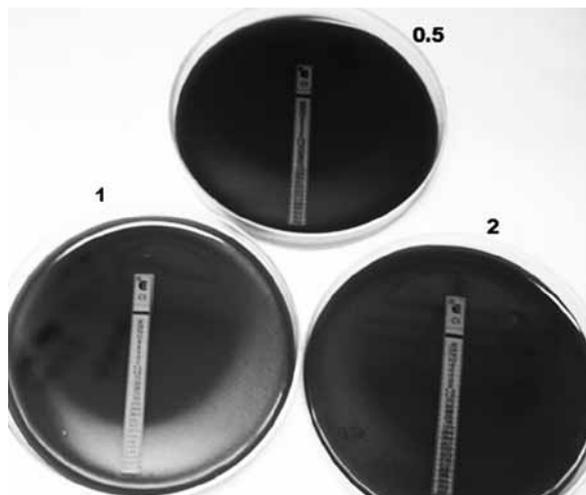


Figura 2.- Estandarización del procedimiento para realizar la CIM mediante la prueba Épsilon con tiras de Cip con una gradiente de concentración de 0.02 a 32 µg/ µL para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *B. bacilliformis*. Los ensayos se hicieron con la cepa USM-LMMB-005, ajustando los 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.

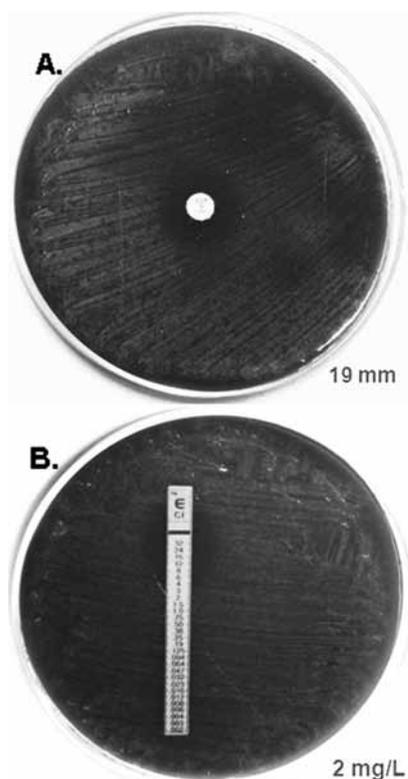


Figura 4. Susceptibilidad disminuida a la ciprofloxacina de la cepa *Bartonella bacilliformis* USM-LMM-002: A. Prueba Épsilon que determinó una CMI de 2 mg/L con tiras de Cip (gradiente de concentración de 0.02 a 32 µg/ µL), B. Halo de inhibición del crecimiento de 19 mm con disco de Cip (5 µg).

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

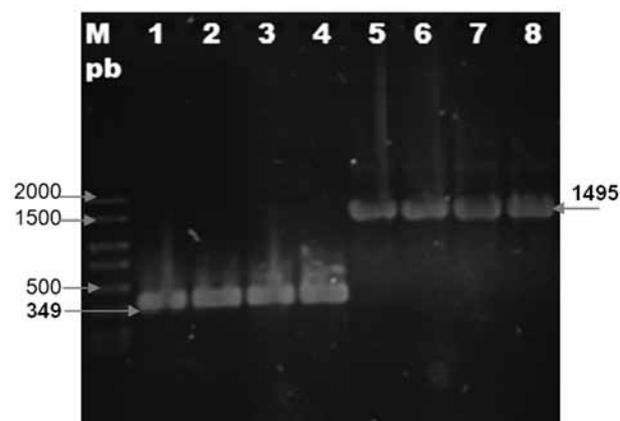


Figura 5.- Amplificados de la QRDR de los genes de la topoisomerasa IV: gen *parC* con tamaño de 349 pb correspondientes a los carriles del 1 al 4 y gen *parE* con tamaño de 1495 pb correspondiente a los carriles del 5 al 8. Se utilizaron las siguientes cepas: CIP57.17, carriles 1 y 5; USM-LMMB-005, 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

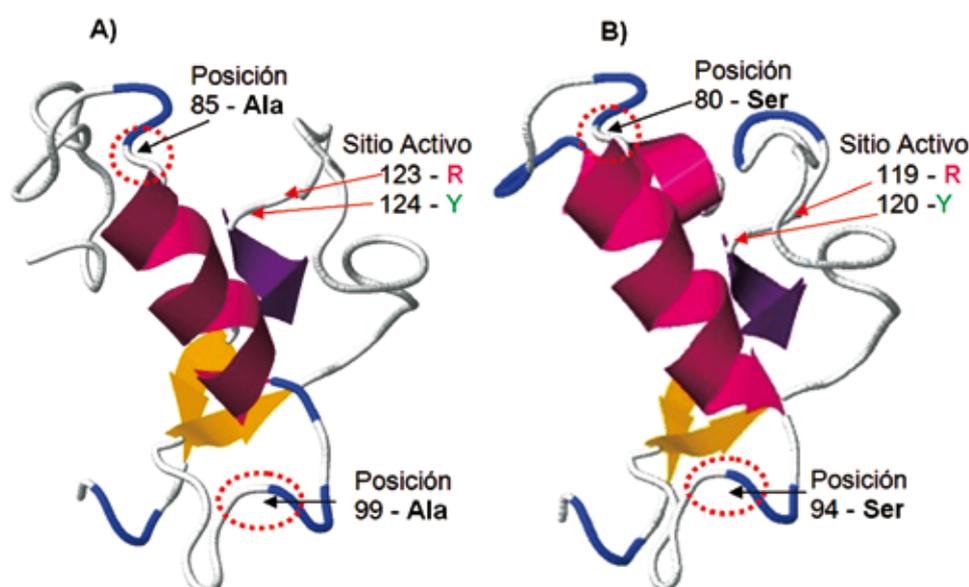


Figura 8.- Estructura tridimensional de la QRDR de ParC de *Bartonella bacilliformis* por homología con ParC de *Escherichia coli* K12 (Protein Data Base (PDB): 1ZVU). En A, se muestra la QRDR de *B. bacilliformis* y en B, la QRDR de *E. coli* K12 MG1655. Las flechas de color negro indican la posición 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.

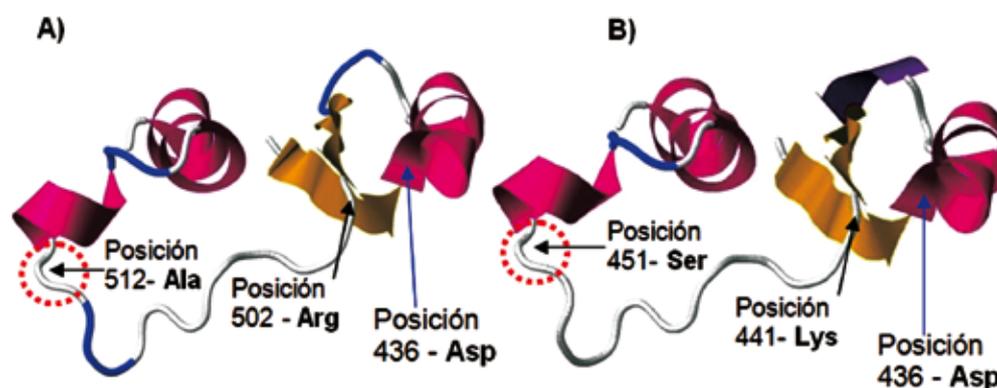


Figura 9.- Estructura tridimensional de la QRDR de ParE de *Bartonella bacilliformis* por homología con ParE de *Acinetobacter baumannii* (PDB: 2XKK). En A, se muestra la región de la QRDR de *B. bacilliformis* y en B, la QRDR de *E. coli* K12 MG1655. Las flechas de color negro indican la posición donde 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 AL, 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 Culupú, 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. Garcia-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 Magister 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. Garcia, 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. Boulos, 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* 57(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^{ed}. 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. Birtles, 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 Carrión 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.