

TRABAJOS ORIGINALES

DISEÑO Y ESTANDARIZACIÓN DE UNA PRUEBA DE PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA BARTONELOSIS CAUSADA POR *Bartonella bacilliformis*

Carlos Padilla R¹, Gladys Ventura E²

¹División de Biología Molecular, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

²División de Bacteriología, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

RESUMEN

Objetivo: Diseñar una prueba de PCR para el diagnóstico de la Bartonelosis causada por *Bartonella bacilliformis*. **Materiales y métodos:** Se usó la secuencia del locus de invasión ialB para diseñar los oligonucleótidos ialBF y ialBR, además del ADN genómico purificado de una cepa referencial de *B. bacilliformis* para estandarizar las condiciones de la prueba. Finalmente, la prueba fue preliminarmente evaluada con 12 cepas de *B. bacilliformis* aisladas en 3 áreas endémicas y 10 muestras de sangre total de pacientes con Bartonelosis confirmada. **Resultados:** La prueba detectó el ADN de aislamientos de *B. bacilliformis* de 3 áreas bartonelósicas endémicas del Perú: Ancash, Cuzco y Lima; mientras que no detectó el ADN de *B. henselae*, ni de *B. vinsonii*, ni de otras bacterias y parásitos. Además, esta prueba fue positiva para 10 muestras sanguíneas de pacientes con bartonelosis confirmada y negativa para 5 muestras de pacientes con malaria por *P. falciparum*. **Conclusión:** Esta prueba de PCR podría ser útil para el diagnóstico de la bartonelosis causada por *B. bacilliformis*.

Palabras clave: Infecciones por *Bartonella* / diagnóstico; Reacción en cadena por la polimerasa (fuente: BIREME).

ABSTRACT

Objective: To design a PCR test for the diagnosis of Bartonellosis produced by *Bartonella bacilliformis*. **Material and methods:** ialB locus was used to design ialBF and ialBR primers, and PCR conditions were standardized using genomic DNA from a referral strain. Furthermore, the test was preliminary assessed in 12 clinical isolates from three Peruvian endemic areas and 10 whole blood samples of bartonelosis confirmed cases. **Results:** This test detected DNA from *B. bacilliformis* strains from three Peruvian endemic places of bartonelosis: Ancash, Cuzco and Lima. Genomic DNA of *B. henselae*, *B. vinsonii*, and other pathogens were not detected. In addition, this test was positive for ten whole blood samples of patients with confirmed bartonelosis and it was negative for five whole blood samples of patients with *P. falciparum* malaria. **Conclusions:** This PCR test could be useful for diagnosing bartonelosis caused by *B. bacilliformis*.

Key words: *Bartonella* infections / diagnosis; Polymerase chain reaction (Source: BIREME).

INTRODUCCIÓN

La Bartonelosis es una enfermedad considerada como reemergente en el Perú y emergente en el ámbito mundial¹⁻³. En el Perú, esta enfermedad es causada por *Bartonella bacilliformis* y está presente en 11 de 24 departamentos⁴. Es endémica en algunas provincias de Ancash, Cajamarca, Amazonas y Piura, habiendo resurgido en Lima, Cusco, La Libertad y Huánuco⁵⁻⁷.

El control de la Bartonelosis depende del tratamiento temprano de los casos y de la vigilancia vectorial. El diagnóstico se basa principalmente en el examen directo de frotis; sin embargo, éste presenta baja sensibilidad⁶. Las pruebas serológicas presentan el mismo problema de sensibilidad y adicionalmente baja especificidad⁸⁻¹⁰. Por otro lado, el desarrollo de este microorganismo in vitro es muy lento (5 a 45 días), por lo cual el hemocultivo sólo permite confirmar la infección.

Una prueba moderna de diagnóstico consiste en la amplificación específica de fragmentos de ADN de los patógenos mediante el uso de ADN polimerasa termoestables in vitro, este método se denomina reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Varias pruebas de PCR han sido propuestas para el diagnóstico de la Bartonelosis, estas pruebas se basan en la amplificación de genes como el gen citrato sintetasa (gtIA)¹¹⁻¹³, el gen de la proteína de división celular FtsZ14, el gen 16SrRNA^{15,16}, el gen de la

riboflavina ribC¹⁷ y la proteína de estrés térmico de 60 kDa¹⁸. Sin embargo, estas no están diseñadas para el diagnóstico específico de la Bartonelosis por *B. bacilliformis* en muestras clínicas.

En este artículo se reporta el diseño y estandarización de una prueba de PCR en una sola etapa para el diagnóstico específico de *B. bacilliformis* en sangre total usando como marcador molecular el locus de invasión ialB de esta bacteria.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DE PRIMERS

La secuencia del locus de invasión ialAB de *Bartonella bacilliformis* ha sido reportada al GENBANK en 1995 por Mitchell S J y Minnick M F¹⁹. A partir de esta secuencia se diseñaron los oligonucleótidos ialBF e ialBR (Tabla N° 1) usando el programa Primer Premier; estos oligonucleótidos están ubicados en el gen ialB (Figura N° 1) y fueron sintetizados químicamente por la compañía DNA Integrated Inc.

Tabla N° 1. Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados.

Nombre	Secuencia	*Tm (°C)	Tamaño	*Posición
ialBF	5'-TAAGgAACTggATgTAAAT-3'	48,35	20 nt	809-828
ialBR	5'-CTAAAAAgCACTCAAAAAC-3'	49,11	20 nt	1408-1427

* Tm: temperatura de hibridación óptima teórica del oligonucleótido a su secuencia homóloga en una solución de 50 mM de NaCl.

¹ Con respecto a la secuencia reportada por Mitchell SJ y Minnick MF en el GenBank (N° acceso L25276)

Correspondencia: Carlos P. Padilla Rojas. División de Biología Molecular, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Dirección: Cápac Yupanqui 1400, Lima 11, Perú. Telf.: (51-1) 471-9920 Anexo: 149 E-mail: cpadilla@ins.gob.pe

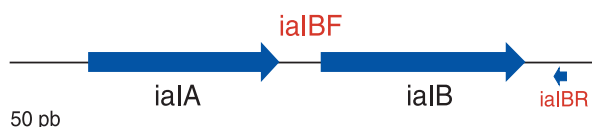


Figura N° 1. Mapa del locus *ialAB* y ubicación de los primers *ialBF* y *ialBR* diseñados. Las flechas representan la parte codante de los factores de invasión *ial* e indican la orientación de los genes.

MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las condiciones de esta prueba se estandarizaron usando el ADN genómico de la cepa de *Bartonella bacilliformis* JB584. Doce aislamientos de *B. bacilliformis* de 3 diferentes zonas bartonelósicas (3 de Ancash, 3 de Lima y 6 Cuzco), *B. henselae*, *Salmonella*, *Brucella mellitensis*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Shigella spp.* y *E. coli* O111 se obtuvieron del cepario del Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú). También se empleó ADN purificado de *Rickettsia typhi* (proporcionado por la División de Patología del Instituto Nacional de Salud); y ADN purificado de *B. vinsonii* (proporcionado por el CDC, USA). El ADN humano fue extraído de una persona clínicamente sana.

Además, se incluyeron 10 muestras de sangre total periférica con anticoagulante EDTA de pacientes con Bartonelosis confirmada por frotis, 5 de ellas de Urubamba (Cuzco) y otras 5 de Caraz (Ancash); y finalmente, 5 muestras sanguíneas con anticoagulante EDTA de pacientes confirmados por frotis con malaria por *P. falciparum* y ADN purificado de *P. falciparum* cepa 3D7 proporcionados por la División de Biología Molecular del Instituto Nacional de Salud.

EXTRACCIÓN DE ADN

Las extracciones de ADN genómico a partir de cultivos bacterianos y de sangre total fueron realizadas utilizando el kit para extracción de ADN Qiamp Tissue (QIAGEN Inc. Valencia, Calif.) según instrucciones de los fabricantes. Se procesaron 200 mL de sangre o cultivos líquidos, se añadieron soluciones que contenían duodecil sulfato de sodio al 1% para lisar las células, posteriormente se digirieron las proteínas de la muestra usando 400 µg de proteinasa K e incubándose a 65°C durante toda la noche. Luego, las muestras fueron colocadas en columnas con afinidad por ADN, el ADN fue atrapado en las columnas y las impurezas se eliminaron mediante soluciones de lavado; finalmente, el ADN purificado fue eluido de las columnas en 100 mL de agua bidestilada libre de ADNas. La concentración de ADN de las muestras se midió por espectrofotometría y las muestras se almacenaron a 4°C hasta su uso.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La prueba de PCR fue diseñada para un volumen final de 25 mL. Las reacciones se realizaron en tubos polipropileno de 200 mL de pared delgada y en un termociclador modelo 9700 (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.). Las mezclas de reacción contenían enzima Amplitaq Gold ADN polimerasa (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) entre 0,001 a 0,01 U/µL, oligonucleótidos específicos (*ialBF* y *ialBR*) entre 0,1 a 2 µmolar, MgCl₂ en-

tre 0,5 a 4 mM y desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) entre 0,1 a 0,5 mM. Se utilizó agua bidestilada, libre de ADNas y ARNsas (Sigma Inc, St. Louis, MO). La temperatura óptima de hibridación de los oligonucleótidos se evaluó entre 46°C a 50°C.

Los productos de amplificación fueron resueltos mediante electroforesis en geles de 1,5% de agarosa, a 75 V por 45 minutos en buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA), posteriormente los geles fueron incubados en una solución de 5 µg/mL de bromuro de etidio por 5 minutos, visualizados en una cámara de luz ultravioleta y fotografiados utilizando una cámara POLAROID MP4+ (POLAROID Co., Waltham, MA).

RESULTADOS

ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA

Las concentraciones de cada componente de la reacción fueron estandarizadas. Las concentraciones óptimas determinadas para la reacción fueron las siguientes: 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 0,004 U/µL de la enzima termoestable Amplitaq Gold ADN Polimerasa, 2,5 mM de MgCl₂ y 1 µM de cada oligonucleótido (*ialBF* y *ialBR*).

La temperatura óptima de hibridación de los oligonucleótidos fue 48°C (Figura N° 2). Los ciclos de temperatura para la amplificación óptima fueron: una denaturación inicial de 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de denaturación de 95°C por 30 segundos, una temperatura de hibridación de 48°C por 30 segundos y una temperatura de extensión de 72°C por 45 segundos; finalmente, una extensión de 72°C por 5 minutos.

PM 1 2 3 4 5

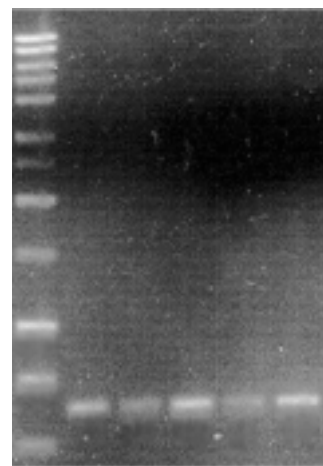


Figura N° 2. Estandarización de la temperatura de hibridación óptima de la prueba de PCR. Carril 1: 46°C, carril 2: 47°C, carril 3: 48°C, carril 4: 49°C, carril 5: 50°C. PM: marcador de peso molecular 1 kb ladder (Promega).

SENSIBILIDAD DEL SISTEMA

Para analizar la sensibilidad de la prueba se realizaron diluciones de ADN genómico de *B. bacilliformis* cepa JB584. Como está reportado, el tamaño del genoma de *B. bacilliformis* es aproximadamente 1617 kilo pares de

bases²⁰. Por lo tanto, una molécula del genoma de *B. bacilliformis* corresponde a aproximadamente 1,7 fentogramos de ADN purificado. Esta prueba es positiva a 5 fentogramos, lo cual corresponde aproximadamente a 3 genomas (Figura N° 3).

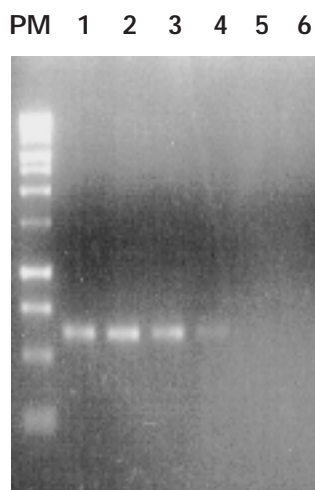


Figura N° 3. Sensibilidad de la prueba de PCR Esta evaluación se realizó usando ADN genómico de la cepa de *B. bacilliformis* JB854. Carril 1: 10 nanogramos, carril 2: 10 picogramos, carril 3: 1 picogramos, carril 4: 5 fentogramos, carril 5: 1 fentogramo, carril 6: sin ADN PM: marcador de peso molecular 1 kb ladder (Promega).

ESPECIFICIDAD BIOLÓGICA DE LA PRUEBA

Para analizar la especificidad biológica de la prueba se evaluó 50 ng de ADN genómico purificado de cepas de otras especies bacterianas, géneros bacterianos y parásitos, como: *B. henselae*, *B. vinsonii*, *Rickettsia typhi*, *Salmonella*, *Brucella mellitensis*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Shigella sp.*, *Plasmodium falciparum* cepa 3D7, *E. coli* O111 y ADN humano. La prueba resultó negativa a todas estas muestras (Ver algunos resultados en la Figura N° 4).

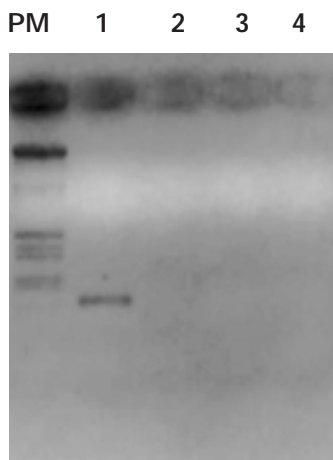


Figura N° 4. Especificidad de la prueba de PCR con primers dirigidos al gen ialB. Carril 1: *B. bacilliformis*, carril 2: *B. henselae*, carril 3: *B. vinsonii*, y carril 4: control negativo. PM marcador de peso molecular μ HindIII/EcoRI.

EVALUACIÓN DE MUESTRAS CLÍNICAS Y AISLAMIENTOS

Como una evaluación preliminar, se analizaron 10 muestras de sangre periférica de pacientes con frotis positivo para bartonelosis, todas estas muestras resultaron positivas a esta prueba (Figura N°5). Además, se evaluaron 5 muestras de sangre periférica de pacientes infectados por *P. falciparum*, las cuales fueron negativas a la prueba. Para evaluar la aplicabilidad de la prueba en diferentes áreas bartonelósicas del Perú, se evaluaron 12 aislamientos de *B. bacilliformis* de 3 diferentes zonas, resultando todas positivas.

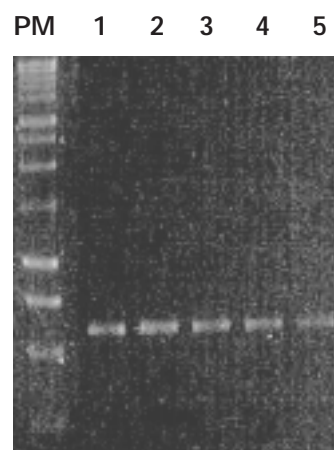


Figura N° 5. Aplicación de la prueba de PCR a muestras sanguíneas. Carril 1 al 5: muestras sanguíneas de pacientes con bartonelosis confirmada con frotis positivo. PM: marcador de peso molecular 1 kb ladder (Promega).

DISCUSIÓN

En nuestro país la Bartonelosis causada por *Bartonella bacilliformis* es un grave problema de salud y su diagnóstico muchas veces es difícil¹⁻³, por ello es importante contar con una prueba que apoye el diagnóstico rápido rutinario por frotis, el cual presenta muy baja sensibilidad⁶.

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es una técnica moderna que permite la detección del material genético de microorganismos en muestras clínicas, estando ampliamente difundida su utilidad en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Muchas pruebas de PCR han sido reportadas para el diagnóstico de la Bartonelosis. Entre estas pruebas destaca la prueba de PCR basada en el gen *ribC*¹⁷ y en el gen 16S rRNA¹⁵, en las que se propone varios oligonucleótidos para la detección de especies de *Bartonella*, entre ellas *B. bacilliformis*; sin embargo, estas pruebas aún no han sido evaluadas con muestras clínicas.

Otra prueba de PCR propuesta es la variante PCR-Nested que se basa en el gen *FtsZ*; sin embargo, esta prueba requiere una etapa adicional de amplificación con oligonucleótidos anillados¹⁴. Otro tipo de prueba propuesta es el PCR-RFLP en los genes: *gltA* que codifica a la enzima citrato sintasa¹¹, en el gen *rpoB* que codifica la subunidad β de la enzima ADN polimerasa¹² y el gen que expresa el 16S rRNA¹⁶, este tipo de pruebas requiere una etapa adicional de digestión de los productos de amplificación con enzimas de restricción. Adicionalmente, se ha

propuesto la amplificación y luego el secuenciamiento del gen de la citrato sintasa *glcA*¹¹ y del gen de estrés térmico *hsp*¹⁸ para poder diferenciar especies y subespecies de *Bartonella*. Sin embargo, estas pruebas requieren etapas adicionales en el procedimiento, lo cual encarece y retarda la confirmación de la Bartonelosis por *B. bacilliformis*.

Así, ninguna de estas pruebas de PCR han sido diseñadas para la detección específica de *B. bacilliformis* en muestras clínicas¹¹⁻¹⁸, por lo tanto, el valor diagnóstico de estas pruebas no se conoce. Nosotros reportamos por primera vez el diseño, la estandarización y la aplicación de una prueba de PCR para la detección de *B. bacilliformis* en muestras clínicas. Esta prueba es muy sensible dado que es capaz de detectar hasta 3 genomas de *B. bacilliformis*. Sin embargo, es necesario evaluar su sensibilidad diagnóstica en comparación con el frotis sanguíneo y el cultivo.

Además, esta prueba de PCR es específica para la detección de *B. bacilliformis*, ya que está basada en la amplificación del gen *ialB* de *B. bacilliformis*¹⁹, el uso de este gen como blanco de amplificación le otorga una buena especificidad a la prueba. Así, al evaluarse ADN genómico de *B. henselae* y *B. vinsonii* no se obtienen productos de amplificación; otras bacterias filogenéticamente relacionadas a *Bartonella* como *Rickettsia typhi* y *Brucella melitensis*, y no relacionadas como *Salmonella sp.*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Shigella sp.* y *E. coli* O111 tampoco son detectadas por la prueba. Probablemente, el locus de invasión *ialB* no esté presente en el genoma de estas bacterias o de lo contrario *ialB* de *B. bacilliformis* es muy divergente de otros locus de invasión similares.

Nosotros proponemos que esta prueba sea evaluada en otras muestras como líquido cefalorraquídeo (en los casos de sospecha de neurobartonelosis), en biopsias de verrugas (para confirmación de casos crónicos de Bartonelosis), y en mosquitos (para incriminación vectorial). Además, se propone que esta prueba puede ser usada para la confirmación rápida de brotes compatibles con Bartonelosis por *B. bacilliformis* en el país.

REFERENCIAS

- Maguiña C, García PJ, Gotuzzo E, Cordero L, Spach DH. Bartonellosis (Carrion's disease) in the modern era. *Clin Infect Dis* 2001; 33(6): 772-9.
- Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* sp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(2): 203-19.
- Imler GM. *Bartonella bacilliformis*: dangerous pathogen slowly emerging from deep background. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 144(1):1-11.
- Ministerio de Salud. Boletín epidemiológico semanal N° 14. Lima: OGE/MINSA; 2002.
- Ministerio de Salud. Boletín epidemiológico semanal N° 23. Lima: OGE/MINSA; 2002.
- Ellis BA, Rotz LD, Leake JAD, Samalvides F, Bernable J, Ventura G, et al. An outbreak of acute bartonelosis (Oroya Fever) in Urubamba region of Peru, 1998. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(2): 344-9.
- Kosek M, Lavarello R, Gillman R, Delgado J, Maguiña C, Verástegui M, et al. Natural history of infection with *Bartonella bacilliformis* in a nonendemic population. *J Infect Dis* 2000; 182(3): 865-72.
- Chamberlin J, Laughlin L, Gordon S, Romero S, Solórzano N, Regnery RL. Serodiagnosis of *Bartonella bacilliformis* infection by indirect fluorescence antibody assay: test development and application to a population in an area of bartonelosis endemicity. *J Clin Microbiol* 2000; 38(11): 4269-71.
- Knobloch J, Solano L, Álvarez O, Delgado E. Antibodies to *Bartonella bacilliformis* as determined by fluorescence antibody test, indirect haemagglutination and ELISA. *Trop Med Parasitol* 1985; 36(4):183-5.
- Mallqui V, Speelmon EC, Verástegui M, Maguiña-Vargas C, Pinell-Salles P, Lavarello R, et al. Sonicated diagnostic immunoblot for bartonelosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7(1):1-5.
- Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C, Krause I DC. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *J Clin Microbiol* 1995; 33(7): 1797-1803.
- Renesto P, Gouvernet J, Drancourt M, Roux V, Raoult D. Use of *rpo* (gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2): 430-7.
- Padilla C, Carrillo C, Ellis B, Ventura G, Montoya Y. Detección de *Bartonella bacilliformis* usando PCR-RFLP. *Rev Med Exp* 1998; 15(1): 34-6.
- Kelly TM, Padmalayam I, Baumstark BR. Use of the cell division protein FtsZ as a means of differentiating among *Bartonella* species. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5(6): 766-72.
- Jensen WA, Fall MZ, Rooney J, Kordick DL, Breitschwerdt EB. Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38(5): 1717-22.
- Matar GM, Koehler JE, Malcolm G, Lambert-Fair MA, Tappero J, Hunter SB, et al. Identification of *Bartonella* species directly in clinical specimens by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a 16S rRNA gene fragment. *J Clin Microbiol* 1999; 37(12): 4045-7.
- Bereswill S, Hinkelmann S, Kist M, Sander A. Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the *ribC* gene for differentiation of *Bartonella* species by PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37(10): 3159-66.
- Zeaiter Z, Fournier PE, Ogata H, Raoult D. Phylogenetic classification of *Bartonella* species by comparing *groEL* sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52(Pt 1): 165-71.
- Mitchell SJ, Minnick M F. Characterization of a two-gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes. *Infect Immun* 1995; 63(4): 1552-62.
- Krueger CM, Marks KL, Ihler GM. Physical map of the *Bartonella bacilliformis* genome. *J Bacteriol* 1995; 177(24): 7271-4.