

EXPRESIÓN Y SERORREACTIVIDAD DE LA LIPOPROTEÍNA RECOMBINANTE DE 43-kDa DE *Bartonella bacilliformis*.

Carlos Padilla R¹, Karen Gallegos V¹, Adolfo Marcelo Ñ², Stella Chenet C¹, Christian Baldeviano V¹

RESUMEN

Objetivo: La lipoproteína de 43-kDa de *Bartonella bacilliformis* fue obtenida en su forma recombinante (rBbLppB) y purificada para evaluar su serorreactividad mediante ELISA. **Materiales y métodos:** Los niveles de anticuerpos IgG e IgM humanos en los sueros de pacientes con Bartonelosis confirmada y sueros de otras enfermedades (salmonelosis, Brucelosis y leptospirosis) frente a rBbLppB fueron evaluados por ELISA, se utilizó sueros de personas sanas como controles. **Resultados:** La sensibilidad y la especificidad del ELISA IgG fueron 70,4% y 90% respectivamente. Asimismo, la sensibilidad y especificidad de ELISA IgM fueron 85,2% y 90% respectivamente. **Conclusiones:** Estos resultados demuestran que el ELISA usando rBbLppB tiene una buena sensibilidad y especificidad y puede ser considerada como un buen antígeno para el diagnóstico de Bartonelosis causada por *B. bacilliformis*.

Palabras clave: *Bartonella bacilliformis*; Diagnóstico; Test de ELISA; Proteínas Recombinantes, Enfermedad de Carrion (fuente: DeCS BIREME).

ABSTRACT

Objective: The *Bartonella bacilliformis* 43-kDa lipoprotein was obtained from its recombinant form (rBbLppB) and then, purified to evaluate sero-reactivity through ELISA. **Material and methods:** IgG and IgM human antibodies levels in the sera of patients with confirmed Bartonellosis and sera of patients with other diseases (salmonellosis, Brucellosis and Leptospirosis), when contrasted with rBbLppB were evaluated by ELISA. Sera from some healthy people were used for controls. **Results:** Sensitivity and specificity of the IgG ELISA were 70,4% and 90% respectively. Also, sensitivity and specificity of the IgM ELISA were 85,2% and 90%, respectively. **Conclusions:** These results show that ELISA using rBbLppB is highly sensitive and specific and may be considered a good antigen for the diagnosis of Bartonellosis caused by *B. bacilliformis*.

Key words: *Bartonella bacilliformis*; Diagnosis; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Recombinant proteins, Carrion's diseases (source: DeCS BIREME).

INTRODUCCIÓN

La Bartonelosis causada por *B. bacilliformis* es una enfermedad endémica en diversas localidades de nuestro país¹. Esta enfermedad presenta generalmente dos fases, la primera es conocida como la fase anémica, siendo ésta la más crítica, mientras que la segunda fase o etapa crónica se caracteriza por la presencia de verrugas². El diagnóstico de esta enfermedad presenta varias limitaciones, el frotis (método ampliamente difundido) presenta baja sensibilidad, mientras que el cultivo *in vitro* toma mucho tiempo (15 a 45 días)³. Una alternativa a este problema es la implementación del diagnóstico serológico mediante el uso de antígenos

específicos, por ello, es importante caracterizar la serorreactividad de antígenos de *B. bacilliformis*.

MATERIALES Y METODOS

CEPAS, INICIADORES Y PLÁSMIDOS

ADN genómico de la cepa JB584 de *B. bacilliformis* (Dr. Michael Minnick, Universidad de Montana, USA). cepa de *E. coli* XL1-Blue (Stratagene Corp, La Jolla, CA, USA), genotipo: recA1, endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F'proABlacIqZDM15Tn(Tetr)]c. El medio de cultivo usado durante todo el proceso de clonación fue Luria Bertani (1g de triptona, 0,5g de extracto

¹ Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

² Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.

Esta investigación es parte del proyecto "Desarrollo y evaluación de una prueba rápida para el diagnóstico de la Bartonelosis basada en proteínas recombinantes" (Código OGITT 2-01-05-02-110), la cual ha sido financiada por el Instituto Nacional de Salud".

de levadura y 1g de NaCl csp 100 mL). El plásmido de expresión pQE-30 fue adquirido comercialmente de QIAGEN (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA).

Se utilizó un juego de oligonucleótidos diseñados por el programa *Primer Select* versión 4.05 de DNASTAR. Los oligonucleótidos usados fueron adquiridos de la compañía IDT (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, USA). La secuencia para el diseño de oligonucleótidos se obtuvo del GenBank número de acceso AF157831 reportado por Padmalayan *et al.* en el 2000⁴, el análisis de esta secuencia indicó que el gen para BbLppB se encuentra en el ORF 401. El juego de nucleótidos utilizado fue *KpnI* 5'- GAT GGT ACC TAT GAG GGA GAA G - 3' y *PstI* 5'- AAA CTG CAG AAA CCG AGT CAG - 3'.

AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA QUE CODIFICA LA LIPOPROTEÍNA DE *B. Bacilliformis* (BbLppB) POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron en tubos para PCR de polipropileno de 200 µL de capacidad. El volumen de reacción fue de 50 µL conteniendo: 50 ng de ADN genómico, 5 µL de *buffer* de amplificación (500 mM KCl; 100 mM TrisCl pH 8,3; 1% gelatina), oligonucleótidos a una concentración de 1 µM, 1 U por tubo de reacción de AmpliTaq Gold® DNA polimerasa (Perkin Elmer, PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0,2 mM de mezcla de nucleótidos trifosfatos (dNTPs) (Perkin Elmer, PE Applied Biosystems, USA), MgCl₂ a una concentración final de 2,5 mM y agua para PCR (libre de ADNasas y ARNasas). El PCR se llevó a cabo usando un termociclador Perkin Elmer modelo 9700. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C por 10 minutos para activar la enzima, 30 ciclos de amplificación de 95 °C por 30 segundos, 51 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto 30 segundos y una extensión final de 72 °C por 10 minutos.

Los productos de amplificación fueron verificados realizando una electroforesis en gel de agarosa ultra pura (Biorad) al 1% en *buffer* de corrida TAE 1X diluido a partir de *buffer* TAE 50X (24,2g de Tris base disueltos en 50 mL de agua estéril, agregando luego 5,71 mL de ácido acético glacial y 10 mL de EDTA 0,5M pH 8,0. Se completó hasta un volumen de 100 mL con agua estéril.) a 100 voltios por 40 minutos. El gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio y la visualización se hizo en un transiluminador de luz ultravioleta.

Los productos de PCR obtenidos de la amplificación fueron purificados a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules,

CA, USA) al 1%. El producto de amplificación de interés fue cortado del gel y colocado en un tubo nuevo estéril de 1,5 mL (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). El fragmento fue purificado del gel usando el kit comercial Wizard PCR Preps DNA Purification Systems (Promega).

CUANTIFICACIÓN DE ADN POR COMPARACIÓN DE INTENSIDAD DE BANDAS

La muestra de ADN proveniente de los productos de PCR purificados fue cuantificada mediante la comparación de la intensidad de bandas con un marcador de peso molecular comercial. Para tal efecto, un volumen de 5µL de ADN purificado fue resuelto en gel de agarosa al 1%, junto con diferentes concentraciones del marcador comercial φX174 cortado con *HaeIII*, donde cada una de las bandas representó un valor de concentración de ADN en ng. La concentración de ADN obtenida fue de 10ng/µL.

REACCIÓN DE LIGACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE *E. coli* XL1-Blue

Luego de la cuantificación se procedió a digerir los productos purificados y el plásmido con las enzimas de restricción *KpnI* y *PstI*. Los productos de amplificación de PCR fueron ligados en marco de lectura al vector ya digerido pQE-30 *KpnI/PstI*. La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL, considerando los siguientes componentes: 1X de *buffer* de ligación (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 7 mM de MgCl₂ y 1 mM DTT), 1 µL rATP, 3,5 µL pQE *KpnI/PstI*, 3,5 µL de LppB *KpnI/PstI* y 2 U de ligasa T4 a 4 °C toda la noche.

Para la transformación de células de *E. coli* XL-1 Blue se utilizó un volumen de 10 µL de la reacción de ligación y se mezcló con un volumen de 100 µL de bacterias competentes. La transformación se llevó a cabo por el método de cloruro de calcio.

Para la identificación de clones recombinantes se realizó un mapeo con enzimas de restricción, secuenciamiento y expresión de la proteína recombinante.

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA LIPOPROTEÍNA RECOMBINANTE DE *B. bacilliformis* (rBbLppB) EN *E. coli*

Las condiciones de expresión de la rBbLppB fueron optimizadas a pequeña escala tomando en cuenta: la OD₆₀₀ del cultivo bacteriano, la concentración de IPTG y el tiempo de inducción a los cuales se obtuvo una mayor cantidad de proteína.

Se utilizaron las condiciones óptimas de expresión a pequeña escala para iniciar la producción a gran escala y se utilizó el protocolo "Batch purification of 6xHis-tagged proteins from *E. coli* under native conditions" del manual QIAexpressionist para la posterior purificación. Para ello, se inocularon 50 mL de cultivo bacteriano crecido durante toda la noche en 500 mL de LB con ampicilina. El cultivo fue incubado por una hora y media a 37 °C hasta alcanzar un $OD_{600} = 0,6$. La expresión de la proteína recombinante fue inducida añadiendo 1 mM de IPTG por dos horas. Luego, las células fueron recuperadas por centrifugación, el sobrenadante fue descartado y el *pellet* fue resuspendido en 10 mL de *buffer* de lisis (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol a un pH de 8). El cultivo fue lisado por tres ciclos de frío y calor (30 min a 80 °C por 15 min a 37 °C).

Luego, se centrifugó a 4400 rpm. por 15 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se agregó 2,5 mL de resina y se incubó por una hora a 4 °C con movimiento constante. La mezcla del lisado con la resina Ni-NTA agarosa se pasó por una columna cromatográfica y se lavó dos veces con 10 mL de *buffer* de lavado (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol a un pH de 8). Posteriormente, se eluyó la proteína cuatro veces con 500 μ L de *buffer* de elución y se analizó en geles de poliacrilamida al 12%. Finalmente se procedió a la cuantificación de la proteína por el método de Bradford obteniéndose una cantidad entre 0,32 a 0,4 mg por litro.

EVALUACIÓN DE LA SERORREACTIVIDAD DE rBbLppB

Para la evaluación de la serorreactividad se realizó un ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima) indirecto para la detección de anticuerpos IgG e IgM contra rBbLppB evaluando tres clases de sueros obtenidos de la seroteca del Instituto Nacional de Salud:

- o Cuarenta sueros de personas sanas, las cuales no tienen historia de Bartonelosis, no viven, ni han viajado a zonas endémicas.
- o Veintisiete sueros de pacientes con Bartonelosis aguda o crónica confirmada mediante PCR, frotis positivo o cultivo microbiológico. Estos pacientes provienen de zonas endémicas y no presentan complicaciones infecciosas asociadas.
- o Diez sueros de pacientes con otras infecciones (salmonelosis, leptospirosis, Brucelosis).

La estandarización del ELISA se llevó a cabo usando dos sueros positivos y dos sueros negativos. Se encontró que las condiciones óptimas para el ensayo fueron: 100 ng del antígeno por pocillo, dilución de suero 1/200 y dilución de conjugado 1/1000 y 1/500, para anti-IgG y anti-IgM respectivamente.

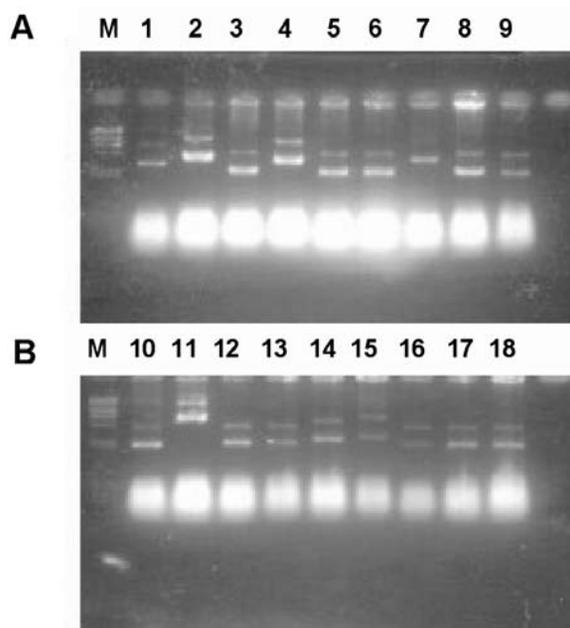


Figura 1. Posibles clones recombinantes en electroforesis en gel de agarosa al 1%. (A) M: Marcador de peso molecular ADN I/Hind III. Carril 1: Control con plásmido autoligado. Carriles 2, 4 y 7: posibles clones recombinantes. Carriles 3, 5, 6, 8 y 9: clones con plásmido autoligado. (B) M: Marcador de peso molecular ADN I/Hind III. Carril 1: Control con plásmido autoligado. Carril 11: Posible clona recombinante. Carriles 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18: Clonas con plásmido autoligado.

Se estableció el punto de corte tanto para IgG como IgM usando el promedio de los títulos obtenidos de los 41 sueros de personas sanas más tres veces la desviación estándar, tomando en cuenta este valor, se consideró a los sueros de los pacientes como positivos o negativos. Luego se calculó la sensibilidad y la especificidad con un intervalo de confianza de 95% con el paquete estadístico Epidat v.3,1.

RESULTADOS

AMPLIFICACIÓN EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE rBbLppB

Los oligonucleótidos amplificaron sólo la porción que codifica a la proteína madura correspondiente a 1099 pb. Se efectuó una selección de las colonias mediante aislamiento del ADN plasmídico según el procedimiento usado por Sambrook *et al.*, 1989 con algunas modificaciones.

En la figura 1 se muestran los plásmidos aislados de los cuales en los carriles 2, 4, 7, y 11 se observan plásmidos de mayor tamaño comparados con los autoligados y coinciden con el tamaño esperado de 4,4 kb. Las posibles clones recombinantes fueron luego evaluadas con cortes con las enzimas de restricción respectivas,

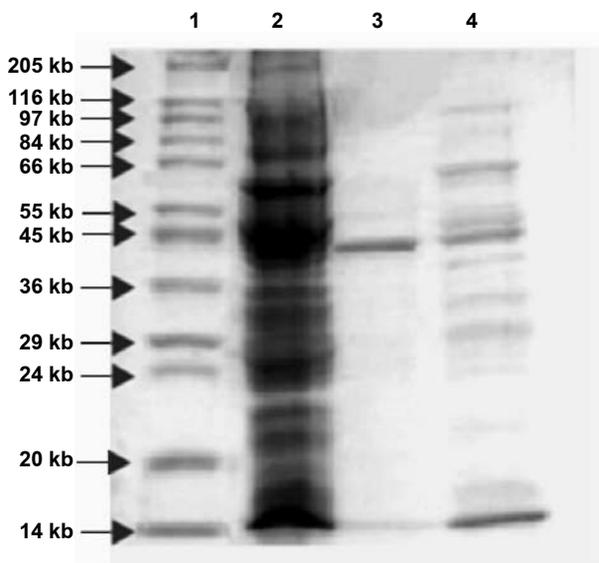


Figura 2. Expresión de 500 mL de cultivo y purificación en condiciones nativas de rBbLppB. Se muestra la banda correspondiente a la primera expresión en masa de la lipoproteína. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Carril 1: Marcador de amplio rango Sigma M4038. Carril 2: Lisado total. Carril 3: Elución 1. Carril 4: Proteínas eluidas durante los lavados.

de las cuales sólo una liberó el inserto. El posterior secuenciamiento de esta clona corroboró la secuencia que coincide con la reportada por Padmalayan⁴.

De los cultivos a escala de 500 mL se obtuvo una banda de 43 kDa, la cual corresponde al peso de rBbLppB. En la figura 2, en el carril 3 se observa la rBbLppB purificada bajo condiciones nativas con un peso de 43 kDa.

SERORREACTIVIDAD FRENTE A rBbLppB

Los títulos de anticuerpos IgG de los individuos normales (control negativo) variaron entre 0,018 y 0,117; mientras que para individuos bartonelósicos variaron entre 0,0435 y 0,824. Se estableció el punto de corte en 0,154 (Figura 3). La sensibilidad fue de 70,4% (IC95%: 51,3-89,5) y la especificidad fue de 100% (IC95%: 98,5-100%).

Los títulos de anticuerpos IgM de los individuos normales (control negativo) variaron entre 0,033 y 0,185; mientras que para individuos bartonelósicos variaron entre 0,095 y 1,587. Se obtuvo el valor de la línea de corte utilizando el promedio de los títulos de los 40 sueros negativos más tres veces la desviación estándar, siendo este valor igual a 0,22. Con los títulos obtenidos se calculó la sensibilidad y la especificidad de la prueba. El valor de sensibilidad fue de 85,2% (IC96: 69,9-100%) y el de especificidad fue de 100% (IC95%: 98,5-100%) (Figura 4).

DISCUSIÓN

Los problemas existentes en el diagnóstico de la Bartonelosis acarrearán una detección subóptima de pacientes en fase aguda o crónica, lo cual genera una demora en el tratamiento de casos, especialmente en fase aguda, e incrementa el riesgo de mortalidad y tasa de transmisión de esta enfermedad.

La identificación de antígenos inmunogénicos podría ser útil para el desarrollo de herramientas de diagnósti-

Tabla 1. Título de anticuerpos y positividad de los sueros ensayados para ELISA IgG eIgM contra la proteína rBbLppB de *Bartonella bacilliformis*.

Tipo de persona del que proceden los sueros	ELISA IgG				ELISA IgM			
	N.º sueros		Título anticuerpos		N.º sueros		Título anticuerpos	
	Total	Positivos	Media	DS	Total	Positivos	Media	DS
<i>Sano (área no endémica)</i>	40	0	0,073	0,0272	40	0	0,089	0,0438
<i>Bartonelosis (total)</i>	27	20	0,226	0,1573	27	23	0,608	0,3589
Bartonelosis aguda	24	18	0,228	0,1614	24	20	0,560	0,3172
Bartonelosis crónica	3	2	0,212	0,1486	3	3	0,991	0,5279
<i>Otras infecciones (total)</i>	10	1	0,089	0,0351	10	1	0,108	0,0757
Salmonelosis	6	1	0,099	0,0389	6	1	0,133	0,0886
Brucelosis	3	0	0,085	0,0191	3	0	0,056	0,0107
Leptospirosis	1	0	0,042	-	1	0	0,118	-

DS: desviación estándar.

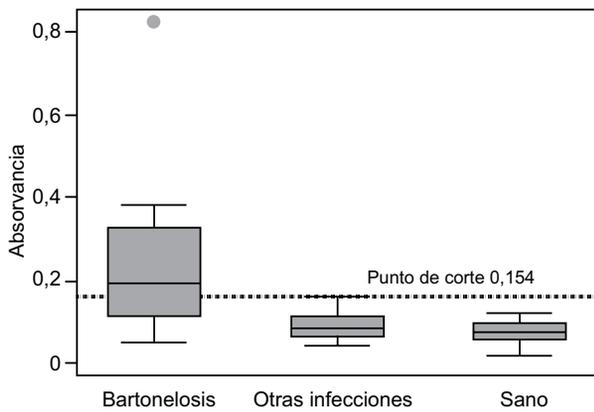


Figura 3. Evaluación de la seroreactividad frente a la lipoproteína recombinante de *Bartonella bacilliformis* utilizando el conjugado anti-IgG. Observar que la población de pacientes sanos y con otras infecciones (salmonelosis, leptospirosis y brucelosis) nos superan el punto de corte establecido (línea punteada).

co para la Bartonelosis⁴. Debido a esto se clonó, expresó, purificó y evaluó la seroreactividad del antígeno de 43-KDa de *Bartonella bacilliformis* (rBbLppB) frente a sueros de pacientes con Bartonelosis y otras enfermedades en el formato ELISA.

Ensayos de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) que usan proteínas recombinantes para diagnóstico de otras enfermedades infecciosas ya han sido descritos. Muchos de estos ensayos con proteínas recombinantes se desarrollan con altos niveles de sensibilidad y especificidad o funcionan mucho mejor que inmunoensayos que utilizan antígeno total⁵. Las proteínas recombinantes pueden ser ventajosas en ELISA bacterianos porque son antígenos definidos que contienen potencialmente menos epítopes que preparaciones de antígenos totales y por lo tanto la reacción cruzada es menor⁶.

La evaluación de los sueros en formato ELISA utilizando rBbLppB dio como resultado un valor de sensibilidad de 70,4 % para IgG y de 85,2 % para IgM, lo cual resulta coherente con lo reportado por Patrucco, quien demostró que en las cuatro primeras semanas de la fase aguda de la Bartonelosis los niveles de anticuerpos IgM se elevan, mientras que los niveles de IgG e IgA se mantienen normales. Los niveles de IgG se elevan aproximadamente luego de la cuarta semana. En la fase eruptiva existe un incremento significativo pero no muy marcado de los niveles de IgA, IgG e IgM⁷. Esto concuerda con los resultados obtenidos, ya que de los 27 sueros positivos evaluados 23 pertenecen a fase aguda y presentan títulos más altos al evaluarlos con conjugado anti-IgM, que con anti-IgG. Sin embargo, los tres sueros de pacientes crónicos presentaron

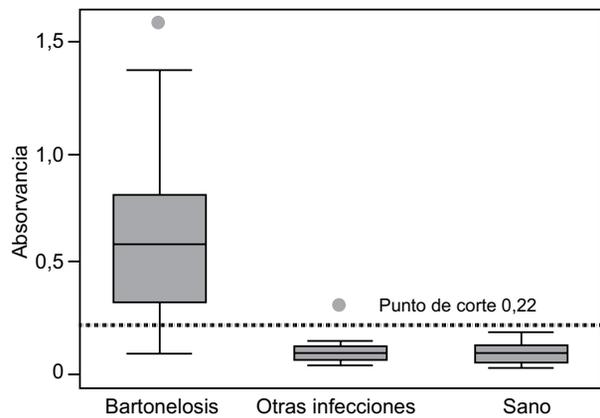


Figura 4. Evaluación de la seroreactividad frente a la lipoproteína recombinante de *Bartonella bacilliformis* utilizando el conjugado anti-IgM. Observar que la población de pacientes sanos y con otras infecciones (salmonelosis, leptospirosis y brucelosis) nos superan el punto de corte establecido (línea punteada) a excepción del caso de un suero con salmonelosis.

títulos elevados de IgM, lo cual nos indica que el ELISA IgM rBbLppB no discrimina entre las dos fases de la enfermedad.

También, se ha evaluado la reactividad serológica de la flagelina recombinante (rFlaA) de *Bartonella bacilliformis* por ELISA y Western-Blot obteniendo resultados satisfactorios. La reactividad encontrada para IgG en ELISA nos indica que podría ser un antígeno sensible identificando 11/20 (70%) sueros de pacientes. Se ha observado también que al evaluar la rFlaA en formato ELISA existe reactividad cruzada con sueros de pacientes con *Salmonella* y *Brucella*⁸. Sin embargo, los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos con la rBbLppB fueron mejores, esto debido a que la flagelina de *B. bacilliformis* posee mucha similitud con otras flagelinas y es posible que comparta epítopes con otras bacterias.

Los datos reportados en la literatura indican reacciones cruzadas entre sueros de pacientes con *B. bacilliformis* y sueros de pacientes con *C. psittaci* y *C. burnettii*⁹. También se ha detectado reacción cruzada con sueros de *Brucella*¹⁰. Sin embargo, en los ensayos realizados con rBbLppB no se encontró reacción cruzada con sueros de *Brucella*, pero sí con un suero de *Salmonella*.

El diagnóstico por inmunoblot, utilizando antígenos preparados por sonicación (bandas proteicas de 17 y 18 kDa) tiene 70% de sensibilidad frente a casos agudos de Bartonelosis y 94% de sensibilidad frente a casos crónicos¹¹. Bb65, por su parte, presenta 100% de sensibilidad a anticuerpos IgG con sueros de pacientes agudos y 70% de sensibilidad con sueros de pacientes en

fase verrucosa¹². Por otro lado, la prueba de anticuerpos fluorescentes (IFA) para *B. bacilliformis* tiene 82% de sensibilidad con muestras de pacientes confirmados en fase aguda¹³. Estos reportes nos indican que la evaluación realizada con rBbLppB en formato ELISA tiene una muy buena sensibilidad, incluso mayor a la obtenida por IFA y por tanto podría también ser utilizada como una herramienta de diagnóstico para *B. bacilliformis*.

Cabe resaltar, que el estudio realizado es un estudio preliminar por lo que debido a los datos obtenidos resultaría necesario evaluar un mayor número de casos para la posterior validación de la prueba utilizando rBbLppB, incluyendo pacientes en la fase aguda, fase verrucosa y en portadores crónicos de *B. bacilliformis*. Sin embargo, de ser considerado éste un buen método serológico de detección podría ser útil para dar un diagnóstico presuntivo en menos tiempo del que usualmente se requiere, claro que éste sólo serviría como complemento de uno de los métodos ya validados para la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Tec. Lab. Sra. Juana Choque Portilla por el apoyo brindado en estudio. Asimismo agradecemos a la Blga. Karina Jaramillo por proporcionarnos parte de los sueros utilizados en este estudio y al Dr. Michael Minnick de la Universidad de Montana, USA por la donación del ADN genómico de la cepa JB584 de *B. bacilliformis*.

La proteína recombinante lipoproteína de *Bartonella bacilliformis* de 43 KDa (rBbLppB) desarrollada en este estudio es propiedad de Instituto Nacional de Salud.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Pachas P.** Epidemiología de la bartonelosis en el Perú. Lima: Oficina General de Epidemiología/Instituto Nacional de Salud; 2001. Módulos técnicos. Serie de documentos monográficos N° 13.
2. **Maguiña C, Gotuzzo E.** Bartonellosis: new and old. Infect Dis Clin North Am 2000, 14(1): 1-22.
3. **Anderson BE, Neuman MA.** *Bartonella spp* as emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev 1997; 10(2): 203-19.

4. **Padmalayam I, Kelly T, Baumstark B, Massung R.** Molecular cloning, sequencing, expression and characterization of an immunogenic 43-kilodalton lipoprotein of *Bartonella bacilliformis* that has homology to NlpD/LppB. Infect Immun 2000; 68(9): 4972-79.
5. **Kaltenboeck B, Heard D, DeGraves FJ, Schmeer N.** Use of synthetic antigens improves detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies against abortigenic *Chlamydia psittaci* in ruminants. J Clin Microbiol 1997; 35(9): 2293-98.
6. **Livingston RS, Riley LK, Hook RR, Besch-Williford CL, Franklin CL.** Cloning and expression of an immunogenic membrane-associated protein of *Helicobacter hepaticus* for use in an enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Diagn Lab Immunol 1999; 6(5): 745-750.
7. **Patrucco R.** Estudio de los parámetros inmunológicos en pacientes portadores de la enfermedad de Carrión. Diagnóstico 1983; 12(4): 138-44.
8. **Gallegos K, Baldeviano C, Marcelo A, Padilla C.** Clonamiento, expresión y serorreactividad del antígeno recombinante flagelina de *Bartonella bacilliformis*. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2005; 22(1): 39-46.
9. **Knobloch J, Bialek R, Muller G, Asmus P.** Common surface epitope for *Bartonella bacilliformis* and *Chlamydia psittaci*. Am J Trop Med Hyg 1988; 39(5): 427-33.
10. **Mallqui V, Speelmon EC, Verastegui M, Maguiña-Vargas C, Pinell-Salles P, Lavarello R, et al.** Sonicated diagnostic immunoblot for bartonellosis. Clin Diagn Lab Immunol 2000, 7(1):1-5.
11. **Knobloch J.** Analysis and preparation of *Bartonella bacilliformis* antigens. Am J Trop Med Hyg 1988; 39(2):173-78.
12. **Knobloch J, Schreiber M.** Bb65, a major immunoreactive protein of *Bartonella bacilliformis*. Am J Trop Med Hyg 1990; 43(4): 373-79.
13. **Chamberlin J, Laughlin L, Gordon S, Romero S, Sorlorzano 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.

Correspondencia: Blgo. Carlos P. Padilla Rojas. Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular. Centro Nacional de Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.
Dirección: Calle Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima.
Teléfono: (511) 4719920 anexo 129.
Correo electrónico: cpadilla@ins.gob.pe; cpadillar@hotmail.com