Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina
Escuela Profesional de Tecnología Médica

Estandarización de una prueba de contrainmunoelectroforesis (CIEF) para determinar infección humana por *Bartonella sp.*

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Dante Ronald ACUÑA NARVA

ASESOR

Mg. William Renee CORNEJO MEDINA

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Acuña D. Estandarización de una prueba de contrainmunoelectroforesis (CIEF) para determinar infección humana por *Bartonella sp*. [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Tecnología Médica; 2020.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código ORCID del autor	0000-0002-8639-2791
DNI o pasaporte del autor	40041560
Código ORCID del asesor	0000-0003-2371-7533
DNI o pasaporte del asesor	25672818
Grupo de investigación	—
Agencia financiadora	Vicerrectorado de investigación Fondo de Promoción de Trabajo de Tesis 2014
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión” ubicada en 12°03'15.52"S 77°05'12.77"O
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2014 - 2017
Disciplinas OCDE	Tecnología médica de laboratorio http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.06.02 Inmunología http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.03 Enfermedades infecciosas http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.08

UNMSM
Firmado digitalmente por FERNANDEZ GIUSTI VDA DE PELLA Alicia Jesus FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 10.12.2020 09:14:01 -05:00

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Conforme a lo estipulado en el Art. 113 inciso C del Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (R.R. No. 03013-R-16) y Art. 45.2 de la Ley Universitaria 30220. El Jurado de Sustentación de Tesis nombrado por la Dirección de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, conformado por los siguientes docentes:

Presidente: Dr. Mario Monteghirfo Gomero.
Miembros: Lic. Pilar Fernanda Alva Betalleluz.
Lic. Esther Lilia Valencia Bazalar.
Asesor : Mg. William Renee Cornejo Medina.

Se reunieron en la ciudad de Lima, el día 28 de mayo del 2020, siendo las 11:30 horas, procediendo a evaluar la Sustentación de Tesis, titulado **"Estandarización de una prueba de contrainmunoelectroforesis (CIEF) para determinar infección humana por Bartonella *sp.*"**, para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica del Señor:

DANTE RONALD ACUÑA NARVA

Habiendo obtenido el calificativo de:

17	**DIECISIETE**
(En números)	(En letras)

Que corresponde a la mención de: **MUY BUENO**
Quedando conforme con lo antes expuesto, se disponen a firmar la presente Acta.

.....	.....
Presidente	Miembro
Dr. Mario Monteghirfo Gomero.	Lic. Pilar Fernanda Alva Betalleluz.
D.N.I: 08795755	D.N.I: 08098466
.....	.....
Miembro	Asesor (a) de Tesis
Lic. Esther Lilia Valencia Bazalar.	Mg. William Renee Cornejo Medina.
D.N.I: 06183418	D.N.I: 25672818

Datos de plataforma virtual institucional del acto de sustentación: Datos de la plataforma virtual institucional del acto de sustentación:
https: https://medical-int.zoom.us/j/97607541533
ID:
Grabación archivada en:

UNMSM
Firmado digitalmente por PAREDES ARRASCUE Jose Antonio FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 09.12.2020 20:24:12 -05:00

“Estandarización de una prueba de contrainmunoelectroforesis (CIEF) para determinar infección humana por Bartonella *sp.*”

AUTOR

Bachiller, ACUÑA NARVA, DANTE RONALD

ASESOR

Mg. WILLIAM RENEE CORNEJO MEDINA

Profesor Asociado – Tiempo Completo

Dedico este trabajo a:

A mis queridos padres,

Doris Soledad Narva Infante y Víctor Jorge Acuña Vargas. Por su apoyo incondicional y permanente para la culminación de mi carrera y desarrollo profesional.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Dr. Luis Isidoro Solano Mendoza (agradecimiento póstumo)

Maestro en la Cátedra de Microbiología Médica, ejemplo de investigador en la enfermedad de Carrión del Instituto de Medicina Tropical Daniel A. Carrión de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Debo manifestar mi infinita gratitud por ser participe en investigación y docencia.

Al Mg. William Renee Cornejo Medina y a la Lic. TM Pilar Fernanda Alva Betalleluz.

Docentes – investigadores, por su apoyo constante y sincero en el asesoramiento de mi tesis, en el Laboratorio de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical Daniel A. Carrión de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

A la Dra. Ruth García de la Guarda.

Docente – investigadora, por el apoyo constante en el desarrollo de mi tesis, en el Laboratorio de Microbiología Molecular en la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Al Q.F. Lázaro Rubén Valdivieso Izquierdo.

Docente – investigador, por la valiosa y desinteresada colaboración, en el Laboratorio de Bioquímica en el Departamento de Ciencias Dinámicas - Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Mi sincero agradecimiento a los profesores universitarios que de una u otra forma han contribuido en la realización del presente trabajo de investigación:

Dr. José Guevara Duncan, Mg. Abraham Cáceres Lázaro, Mg. Oscar Acosta Conchucos, Lic. Esther Valencia Bazalar, Lic. Arturo Atuncar Loyola, Blgo. Nataly Ayala Donaires.

Así mismo, al invalorable apoyo del personal técnico de Laboratorio: Srta. Ana María Arangues Tenemas, Sra. Lizbeth Vany Ramírez Cuestas del Departamento Académico de Microbiología Medica, y también Srta. Elvira Cabanillas Chipana, Sr. James Gonzales Hidalgo del IMT-DAC, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

ÍNDICE

RESUMEN ..... **X**
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN 2
1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES 3
1.2 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN 5
1.3 OBJETIVOS 6
1.3.1 OBJETIVO GENERAL 6
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 7
1.4 BASES TEÓRICAS 7
1.4.1 BASE TEÓRICA 7
1.4.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS 11
CAPITULO II: MÉTODOS **13**
2.1 DISEÑO METODOLÓGICO 14
2.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN 14
2.1.2 POBLACIÓN Y MUESTRA 14
2.1.2.1 POBLACIÓN 14
2.1.2.2 TIPO Y TAMAÑO DE MUESTRA 14
2.1.2.3 MUESTREO 14
2.1.3 UNIDAD DE ANÁLISIS 14
2.1.4 MATERIAL BIOLÓGICO 15
2.1.4.1 SUEROS HUMANOS 15
2.1.4.2 CULTIVO BACTERIANO DE UN AISLADO DE *Bartonella* 15
2.1.5 MÉTODOS 16
2.1.5.1 OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO BACTERIANO 16
2.1.5.2 DOSAJE DE PROTEÍNAS 17
2.1.5.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO SÓDICO (SDS-PAGE) DE LAS PROTEÍNAS OBTENIDAS POR SONICACIÓN DEL AISLADO DE *Bartonella* IMT/DAC 162-13/OCT-2015 17

2.1.5.4 ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA DE CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIEF) 19
2.1.6 ANÁLISIS DE RESULTADOS 21
CAPITULO III: RESULTADOS **23**
CAPITULO IV: DISCUSIÓN **37**
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES **44**
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS **47**
ANEXOS **52**
ANEXO A PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES 53
ANEXO B PROTOCOLO DE DOSAJE DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LÖWRY 57
ANEXO C OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES 59
ANEXO D FOTOGRAFÍAS 1, 2 Y 3, ESQUEMAS A Y B, PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE EVALUACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS 60

Lista de tablas

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes con diagnóstico bacteriológico y clínico de bartonelosis.

Tabla 2. Resultados de la prueba de CIEF con sueros de pacientes con diagnóstico de bartonelosis, sueros de personas sanas y sueros de pacientes con otras infecciones.

Tabla 3. Resultados de la prueba de CIEF con sueros de pacientes con otras enfermedades.

Lista de gráficos

Figura 1. Cultivo bacteriano del aislado de *Bartonella* (IMT/DAC 162-13/oct-2015) donde se observan algunas colonias (flechas negras).

Figura 2. Frotis del aislado de *Bartonella* (IMT/DAC 162-13/oct-2015), coloreado con el colorante de Leishman.

Figura 3. Análisis electroforético, SDS-PAGE al 12%, del sonicado de la cepa de *Bartonella* (IMT/DAC 162-13/oct-2015), utilizada como antígeno para la prueba de CIEF.

Figura 4. Titulación del antígeno bacteriano (IMT/DAC 162-13/oct-2015) utilizando un suero de paciente (IMT/DAC 155-12/oct-2012) con diagnóstico clínico, microbiológico y molecular de bartonelosis.

Figura 5. CIEF del suero (Ac) de pacientes (i, ii, iii) con diagnóstico bacteriológico y clínico de bartonelosis frente al antígeno (Ag) sonicado de *Bartonella sp.*

Figura 6. CIEF del suero (Ac) de pacientes (P, Q, R) con diagnóstico bacteriológico y clínico de bartonelosis frente al antígeno (Ag) sonicado de *Bartonella sp.*

Figura 7. CIEF del suero (Ac) de pacientes (X, Y, Z) con diagnóstico de otras infecciones frente al antígeno (Ag) sonicado de *Bartonella sp.*

RESUMEN

Introducción: La enfermedad de Carrión es causada por la bacteria *Bartonella bacilliformis* y su diagnóstico convencional se realiza por cultivo, el cual tiene la desventaja de requerir de un tiempo prolongado, necesitándose un método diagnóstico alternativo.

Objetivo: Estandarizar la prueba de contrainmunoelectroforesis (CIEF) para determinar infección humana por *Bartonella sp*.

Materiales y métodos: El antígeno para la prueba se obtuvo por sonicación de un aislado de *Bartonella* sp., cultivado en un medio bifásico libre de plasma y sangre de carnero. La reactividad del antígeno sonicado fue evaluada por la CIEF empleando 123 sueros de personas, de los cuales 60 fueron de pacientes con diagnóstico clínico y bacteriológico de Enfermedad de Carrión, 54 de personas con otras infecciones y 9 de personas sanas. Para la estandarización de la prueba de CIEF se evaluaron el tamaño y la distancia entre los pocillos, así como la concentración del antígeno y los volúmenes de los reactivos usados.

Resultados: La concentración óptima del antígeno fue de 0.64 mg/mL, la distancia entre los pocillos de 3 mm, el tamaño de los pocillos de 3 mm y el volumen de los reactivos de 12 µL. La CIEF estandarizada tuvo una sensibilidad de 43.3% y una especificidad de 98.4%. De los 60 sueros de pacientes con bartonelosis analizadas se encontraron 26 sueros positivos en la prueba de CIEF, de los 54 sueros provenientes de individuos con otras infecciones, uno resultó positivo, y los 9 sueros de las personas sanas resultaron negativos.

Conclusiones: Los resultados de la CIEF revelan una baja sensibilidad de la prueba, pudiéndose usar como una prueba confirmatoria dada su elevada especificidad, pero no puede ser utilizada como prueba de tamizaje serológico por la escasa sensibilidad referida.

Palabras Clave: Contrainmunoelectroforesis, infecciones por *Bartonella*, serología, sonicación (Fuente: DeCS BIREME).

SUMMARY

Introduction: Carrion's disease is caused by the bacterium *Bartonella bacilliformis* and its conventional diagnosis is made by culture, which has the disadvantage of requiring a long time, requiring an alternative diagnostic method.

Objective: Standardize the counterimmunoelectrophoresis (CIEF) test to determine human infection with *Bartonella* sp.

Materials and methods: The test antigen was obtained by sonication of an isolate of Bartonella sp., Grown in a biphasic medium free of plasma and sheep blood. The reactivity of the sonic antigen was evaluated by the CIEF using 123 sera from people, of which 60 were from patients with a clinical and bacteriological diagnosis of Carrión's Disease, 54 from people with other infections and 9 from healthy people. For the standardization of the CIEF test, the size and distance between the wells were evaluated, as well as the concentration of the antigen and the volumes of the reagents used.

Results: The optimal concentration of the antigen was 0.64 mg / mL, the distance between the 3 mm wells, the size of the 3 mm wells and the volume of the reagents of 12 µL. The standardized CIEF had a sensitivity of 43.3% and a specificity of 98.4%. Of the 60 sera of patients with bartonellosis analyzed, 26 positive sera were found in the CIEF test, of the 54 sera from individuals with other infections, one was positive, and the 9 sera of healthy people were negative.

Conclusions: The results of the CIEF reveal a low sensitivity of the test, being able to be used as a confirmatory test given its high specificity but cannot be used as a serological screening test due to the low sensitivity referred to.

Keywords: Counterimmunoelectrophoresis, Bartonella infections, serology, sonication (Source: DeCS BIREME)

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 DESCRIPCION DE LOS ANTECEDENTES

La bartonelosis es una infección bacteriana causada por bacterias del género *Bartonella*, responsable de múltiples manifestaciones clínicas, dependiendo de la especie y del estado inmunológico del paciente. *Bartonella* como tal puede ser causa de infecciones tanto en humanos, como en animales domésticos y silvestres.[1,2]

En 1941, Weiss fue el primer investigador en reportar la existencia de un periodo de depresión temporal del sistema inmune en los pacientes durante la fase aguda de la enfermedad de Carrión, con posterior recuperación durante la fase eruptiva. Este periodo de depresión inmune sería la causa de las frecuentes infecciones con virus, bacterias, parásitos y hongos durante la evolución clínica de la enfermedad.[3,4]

En 1983, Solano determinó infección por *B. bacilliformis* mediante una prueba de aglutinación en lámina, realizada en 70 pacientes con diagnóstico clínico y etiológico de enfermedad de Carrión. El antígeno bacteriano fue obtenido de cepas de *B. bacilliformis* cultivadas en el medio agar de fases, logrando un 60% de positividad en la prueba serológica con personas provenientes de zonas endémicas, comprobándose anticuerpos contra la bacteria.[5]

En 1985, Knobloch y col. detectaron anticuerpos contra *B. bacilliformis* mediante las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemaglutinación indirecta (HAI) y ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). Los resultados revelaron que el 63% de 187 sueros de personas residentes en un área endémica de bartonelosis fueron reactivos al utilizar las pruebas de ELISA, IFI e HAI. ELISA fue el más sensible (54.8%), seguido por la IFI (33.7%) y la HAI (27.8%). Los anticuerpos IgM fueron determinados mediante IFI, estos anticuerpos IgM estuvieron presentes en el suero de los pacientes en fase anémica, así como también en el suero de los pacientes en fase intercalar, en pacientes en fase eruptiva y en pacientes que habían tenido la fase anémica meses anteriores.[3,6]

En 1988, Knobloch empleando las técnicas de western blot e inmunoprecipitación identificó veinticuatro antígenos de *B. bacilliformis*. Utilizando sueros de conejo anti-*Bartonella*, así como sueros de pacientes, reportó una alta sensibilidad y especificidad. Los antígenos fueron designados en función de su masa molecular relativa que variaron desde 16 a 160 kDa.[7]

En 1999, Mallqui y col. evaluaron el desempeño de antígenos obtenidos por sonicación y extracción con buffer glicina mediante la técnica de western blot. Para ambos tipos de antígenos, las bandas de diagnóstico revelaron un 94% de sensibilidad en los sueros de casos confirmados de enfermedad de Carrión en fase eruptiva. Para la fase anémica las bandas de valor diagnóstico revelaron un 70% de sensibilidad, cuando se usó la técnica de sonicación para la obtención de los antígenos; y un 30% de sensibilidad cuando se usó la técnica de extracción con buffer glicina. La especificidad de la prueba utilizando los antígenos obtenidos por ambas técnicas fue de 100%.[8]

En el 2000, Chamberlin y col. desarrollaron una prueba de IFI demostrando 74% de sensibilidad en pacientes con enfermedad de Carrión provenientes de Caraz, y el 92% de los sueros de personas sanas fueron seronegativos. Considerando la fase de la enfermedad, la IFI reveló 82% de sensibilidad para la fase aguda y 93% para la fase convaleciente, siendo su especificidad del 92%; el valor predictivo positivo fue de 89% en un lugar donde *B. bacilliformis* es endémica y donde la prevalencia puntual de infección es del 45%. La prueba de inmunofluorescencia permite detectar anticuerpos contra *Bartonella* pero en la fase aguda tiene escasa sensibilidad, mejora el resultado cuando se detectan los anticuerpos en la fase de convalecencia.[9]

En el 2008, Anaya y col. estandarizaron una prueba de ELISA indirecta con el lisado total de *B. bacilliformis* como antígeno, encontrando una sensibilidad de 68,6%, especificidad de 94,1%, valor predictivo positivo de 95,2% y valor predictivo negativo de 64,0% y un 78,1% de reacción cruzada con otros agentes bacterianos.[10]

Dentro de las pruebas moleculares, la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) ofrece un medio rápido y específico para detectar e identificar

fragmentos de DNA de *Bartonella* spp. directamente a partir de muestras clínicas, biopsias o de cepas aisladas en cultivos. La técnica de PCR es más sensible que los cultivos cuando las muestras clínicas son adecuadas.[3]

FORMULACION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION

¿Cuáles son las condiciones de las características operativas de desarrollo de la prueba de la contrainmunoelectroforesis (CIEF) que permiten la detección de infección humana por *Bartonella sp*.?

1.2 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

La bartonelosis desarrollada en humanos, también puede ser causada por varias especies del género, por eso se hace referencia al término *Bartonella sp.* denotando correspondencia a otras especies diferentes a la especie *B*. *bacilliformis*, como son la *B. quintana, B. henselae*, entre las más importantes.[1]

Los métodos de diagnósticos actuales de infección por *Bartonella* sp. en nuestro medio se basan en el aislamiento del agente patógeno mediante hemocultivo, que tiene la desventaja de requerir de un tiempo prolongado de incubación de 2 semanas a 1 mes, para emitir un resultado. El hemocultivo tiene un 70-80% de sensibilidad a las 2 semanas de incubación; otro aspecto del cultivo es su alto costo por emplear sangre y plasma de carnero, y el requerir cierta experticia en su preparación y en la conservación de la esterilidad del medio de cultivo. Esta situación deriva en un diagnóstico prolongado, retrasando la decisión clínica para el tratamiento, poniendo en riesgo la vida del paciente. [11]

La prueba de contrainmunoelectroforesis (CIEF) es una alternativa como prueba de diagnóstico serológico para determinar infección por *Bartonella sp.* La prueba de CIEF empleada como herramienta diagnóstica para otras infecciones alcanzó un 79 - 81.8% de sensibilidad. [12,13,14]

La prueba de CIEF (Culliford, 1964) [15] es una técnica de inmunoprecipitación que combina los principios de doble inmunodifusión y electroforesis, y permite la rápida detección de anticuerpos o antígenos microbianos solubles en una variedad de fluidos corporales y tejidos. Esta técnica se diseñó en un principio para mejorar los exámenes forenses a fin de determinar el origen de un fluido corporal como esperma, sangre, saliva, etc. En la estandarización se empleó como soporte gel de agarosa sobre una lámina portaobjetos de microscopio, el gel fue disuelto en buffer Barbital a pH 8.6, el mismo tampón que contiene el recipiente de la cámara electroforética. Se perforan pocillos en el gel en pares separados unos milímetros, colocándose el antígeno en el pocillo catódico y el antisuero, en el anódico. En la cámara electroforética se aplica corriente eléctrica durante 15-20 minutos aproximadamente. El movimiento de los anticuerpos es hacia el cátodo y el de los antígenos, hacia el ánodo resultando la reacción de precipitación. Por lo tanto, en un tiempo corto, los dos reactivos se encuentran y precipitan entre los pocillos en el gel de agarosa. La migración contraria se debe al flujo osmótico que se establece en el interior de la agarosa. Este flujo osmótico (o electroendósmosis) se debe a los residuos aniónicos (sulfato y piruvato, principalmente) presentes en la agarosa.

La ventaja de CIEF, además de la disminución del tiempo de trabajo, es el pequeño volumen utilizado en cada pocillo, de 5 – 10 μL aproximadamente. Para una mejor resolución se hace lavados, se seca y tiñe el gel con colorante de proteínas.[15,16]

El desarrollo e implementación de una prueba como la CIEF de fácil ejecución, sencilla, rápida, cuya lectura se puede realizar a los 30, 60 y 120 minutos, incluso a las 12 y 24 horas, contribuiría a la pronta acción y decisión clínica en beneficio de la salud de la población susceptible a infecciones en zonas endémicas.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente estudio fue:

- ✓ Estandarizar una prueba de CIEF para determinar la infección humana por *Bartonella sp*.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos del estudio fueron:

- ✓ Determinar la concentración óptima del antígeno de *Bartonella sp.* para la prueba de CIEF que permita detectar la infección humana por *Bartonella sp.*
- ✓ Determinar las condiciones de cultivo, cosecha y lisis de la cepa de *Bartonella* utilizada como antígeno para la CIEF.
- ✓ Determinar el tamaño de los pocillos, la distancia que debe haber entre ellos y los volúmenes de los reactivos que se deben emplear en la CIEF.
- ✓ Determinar la sensibilidad, especificidad y los valores predictivos de la prueba.

1.4 BASES TEÓRICAS

1.4.1 BASE TEÓRICA

Las características microscópicas principales de *Bartonella* son las siguientes: Gram negativa, pleomórfica (cocoide, cocobacilo y bacilar), tamaño variable de 1-3 μm de largo por 0.25 o 0.30 μm de ancho, presenta flagelos unipolares (de 2 a 16) que le confieren movilidad. Es una bacteria intracelular de las células endoteliales y eritrocitos, y se puede colorear con colorantes derivados de Romanovsky como Giemsa, Leishman y Wright.[17]

Para el hemocultivo *Bartonella* requiere componentes nutritivos como sangre y plasma de carnero, acompañado de otros nutrientes para medios enriquecidos.[5] Es una bacteria que no es reactiva a las pruebas de identificación bioquímica bacteriana y no utiliza los carbohidratos.[3]

El principal representante de las bartonelas en humanos es la *Bartonella bacilliformis*, que ocasiona la enfermedad denominada "enfermedad de Carrión", en honor al estudiante de medicina Daniel Alcides Carrión, quien se inoculó la bacteria de

un exudado verrucoso de un paciente en recuperación. Este procedimiento realizado por Carrión lo hizo con la intención de demostrar que dos enfermedades, fiebre de la Oroya y verruga peruana, consideradas diferentes, eran dos etapas de una misma enfermedad.[18,19]

B. bacilliformis se encuentra en humanos residentes en las zonas endémicas de verruga, quienes cumplen la función de reservorios bacterianos; la forma natural de la transmisión es por la picadura del mosquito *Lutzomyia verrucarum*, cuya distribución altitudinal va de los 900 a los 3,000 msnm.[20] La enfermedad de Carrión es endémica y reemergente en el Perú, limitada a ciertas regiones del ande peruano y algunos focos en Ecuador[21] y Colombia.[22]

En el Perú, la enfermedad de Carrión es endémica en los departamentos de Lima, Ancash, La Libertad, Piura, Cajamarca, Amazonas, Huancavelica, Ayacucho y Cusco; donde el humano es el único reservorio de *B. bacilliformis*.[3] Se han documentado brotes de la enfermedad de Carrión en zonas no endémicas, evidenciando ser una enfermedad emergente con potencial de expansión geográfica.[23]

La enfermedad de Carrión se compone de dos etapas o fases clínicas características: etapa aguda febril anemizante (fiebre de la Oroya), y la etapa eruptiva o crónica (verruga peruana). En el momento que la infección avanza surgen una variedad de complicaciones, produciendo cuadro séptico, ictericia, palidez, pericarditis, endocarditis, edema agudo de pulmón, convulsiones, etc.[3]

El estudio de la infección por *B. bacilliformis* se puede realizar en la fase hemática o de anemia hemolítica, a través del frotis o extendido de sangre periférica en láminas portaobjetos, coloreados con derivados de Romanovsky, pudiéndose observar como las bacterias parasitan a los glóbulos rojos.[5] La sensibilidad del frotis de sangre periférica ha demostrado ser solo del 36%.[3]

El cultivo de verrucoma solo se realiza en la fase eruptiva de la enfermedad de Carrión, practicando biopsias de las lesiones eruptivas más recientes, las cuales se

trituran para ser inoculadas en el medio agar de fases. El desarrollo de la *B. bacilliformis* tanto en hemocultivo como en cultivo de verrucoma es por lo general en un periodo de 10 a 15 días de incubación a 29 °C.[5]

El estudio histopatológico también se puede realizar en la fase eruptiva. Por medio de los cortes de biopsia de verrucomas, se puede observar una proliferación angioblastica e histiocitaria con ausencia de infiltración leucocitaria, y en microscopia electrónica se puede observar a la bacteria en su forma bacilar como también en su forma cocoide.[24]

Durante la fase aguda de la enfermedad de Carrión, las coinfecciones por microorganismos relativamente comunes, son aquellas que ocasionan enfermedades como: salmonelosis, toxoplamosis, sepsis, tuberculosis reactivada, hepatitis B y leptospirosis.[25]

Según Patrucco citado por Pachas[3] "En la fase aguda, las concentraciones de anticuerpos IgG e IgA se encuentran dentro de valores normales, en cambio los valores de IgM se encuentran incrementados, normalizándose cuatro semanas después. […] En la fase eruptiva hay un ligero aumento de IgG, IgA e IgM". (p. 20)

Durante la fase hemática de la infección, se desarrolla un descenso en la cantidad de linfocitos T, pero un recuento normal de linfocitos B. Este decrecimiento linfocitario no solo es en su número, sino también en la actividad que desempeñan. En relación a las subpoblaciones de linfocitos, se ha verificado una caída de linfocitos $CD4^+$, un incremento de los linfocitos $TCD8^+$, así como una disminución de la proporción CD4/CD8. Este descenso poblacional linfocitario puede ser atribuido a una menor producción, debido al efecto supresor de los linfocitos T CD8. Esta variación poblacional en las células inmunológicas, podría ser la causa de la mayor frecuencia a infecciones por microorganismos oportunistas que aumentan la letalidad. Durante la fase crónica eruptiva se observa una predisposición a la linfocitosis. [3]

Hasta inicios del año 1990, este género fue representado por una especie, *B. bacilliformis*. La reciente identificación de otras especies de *Bartonella* como los agentes de la enfermedad por arañazo de gato, angiomatosis bacilar y fiebre de las trincheras ha dejado en evidencia su importancia como patógenos humanos oportunistas.[1]

Bartonella henselae, B. quintana, B. vinsonii y B. elizabethae se clasificaron previamente en el género *Rochalimaea* y se consideraron rickettsias, pero fueron trasladados al género *Bartonella* en 1993.[1] Las especies de *Bartonella* que han sido aislados de los seres humanos son: *B. henselae,*[26] *B. quintana, B. elizabethae, B. bacilliformis, B. vinsonii subsp. arupensis*, *B. rochalimae, B. washoensis y B. tamiae*. De éstas*, B. quintana, B. bacilliformis*, y *B. henselae* se han aislado con mayor frecuencia en humanos.[1]

Bartonella sp. se transmite a través de vectores hematófagos como pulgas, garrapatas y piojos. [2,27,28]

Los estudios que revelan infecciones por *B. henselae*, están relacionadas por tener contactos con gatos jóvenes. La transmisión ocurre por picadura de pulgas y/o mordeduras del gato. La persona infectada puede revelar manifestaciones clínicas como angiomatosis bacilar, peliosis bacilar del hígado y del bazo, endocarditis, bacteriemia y enfermedad del arañazo del gato. Se reconocen similitudes bioquímicas en los ácidos grasos de *B. henselae* y *B. quintana* pero son diferentes de *B. bacilliformis*.[26]

El diagnóstico de la bartonelosis se puede realizar mediante el empleo de pruebas inmunoserológicas. La detección de anticuerpos tiene la ventaja de evitar los problemas asociados con otros métodos, tales como los largos periodos de incubación para los cultivos y la obtención de muestras difíciles de conseguir (biopsia de tejidos u órganos), y así evitar las consecuencias por la demora al iniciar el tratamiento antibiótico correcto.[3]

1.4.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- **Antígeno:** Sustancia que, al introducirse en el organismo, induce en este una respuesta inmunitaria, provocando la formación de anticuerpos.
- **Anticuerpo:** Sustancia segregada por los linfocitos de la sangre para combatir una infección de virus o bacterias que afecta al organismo.
- **Bartonelosis humana:** infección producida por la bacteria del genero *Bartonella*.
- **Cepa bacteriana:** Bacteria identificada por medio de cultivo microbiológico, la cual es almacenada para posteriores trabajos de investigación.
- **Contrainmunoelectroforesis (CIEF):** prueba Inmunoserológica que combina dos métodos serológicos: la inmunodifusión doble y la electroforesis.
- **Estandarización:** es el proceso que crea normas que van a hacer reproducible un evento, en las mismas condiciones en las que fueron realizadas.
- **Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE):** separación en gel de poliacrilamida de proteínas según su peso molecular, sometidas a una corriente eléctrica.
- **Seroteca:** sueros conteniendo anticuerpos contra una determinada infección almacenados en condiciones de conservación.
- **Serológico:** relacionado con el suero, componente que contiene proteínas y compuestos de la sangre no celular.
- **Sonicación:** método físico de fraccionamiento de una estructura, utilizando el ultrasonido.

CAPÍTULO II

MÉTODOS

2.1 DISEÑO METODOLÓGICO

2.1.1 Tipo de investigación

Estudio de evaluación de pruebas diagnósticas.

2.1.2 Población y muestra

2.1.2.1 Población

Sueros de pacientes con diagnóstico clínico y bacteriológico de bartonelosis, de la seroteca del laboratorio de la enfermedad de Carrión del Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión" (IMT/DAC), de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). De la misma seroteca se seleccionaron sueros de personas no infectadas con *Bartonella*.

2.1.2.2 Tipo y tamaño de muestra

La muestra se obtuvo por muestreo no probabilístico, intencionado para una población. Se seleccionaron 123 sueros del laboratorio del Programa especial de bartonelosis humana, del IMT/DAC, UNMSM, de los cuales 60 provenían de personas que presentaron diagnóstico de bartonelosis humana por cultivo; el resto de sueros fueron de personas que tuvieron un cultivo negativo.

2.1.2.3 Muestreo

No probabilístico, por conveniencia.

2.1.3 Unidad de análisis

La unidad de análisis fueron los sueros de la seroteca provenientes de pacientes con diagnóstico positivo o negativo de bartonelosis humana.

2.1.4 Material biológico

2.1.4.1 Sueros humanos

Se seleccionaron 60 sueros de pacientes con diagnóstico clínico y bacteriológico de bartonelosis. Cada suero estaba alicuotado y guardado a -20 °C. Los signos y síntomas de los pacientes con la infección bacteriana revelaron: escalofríos, fiebre, cefalea intensa, anorexia, dolores osteoarticulares, anemia profunda, palidez acentuada y postración. El diagnóstico de laboratorio de la bartonelosis se inició con la observación del frotis de sangre periférica del paciente tanto en fase aguda como en fase crónica, encontrándose bacilos intraeritrocitarios. El cultivo de *Bartonella* se realizó antes del tratamiento con antibióticos y se dio el diagnóstico de crecimiento bacteriano compatible con la bacteria de género *Bartonella,* [5] en un lapso de 15 a 30 días.

Para evaluar la reacción cruzada potencial, se consideraron 54 muestras de sueros de personas con otras infecciones, de los cuales 21 fueron de pacientes con fiebre tifoidea, 14 con brucelosis, 6 con enfermedad de Chagas, 3 con sífilis, 3 con toxoplasmosis, 2 con fasciolosis, 1 con hidatidosis, 1 con paragonimiasis, 1 con cisticercosis, 1 con himenolepiasis nana y 1 con aspergilosis.

Nueve sueros de personas sanas (seronegativos) fueron obtenidos de la seroteca del laboratorio del Programa especial de bartonelosis humana del IMT/DAC – UNMSM, sin antecedentes de viaje a zona endémica, o de haber padecido de bartonelosis.

2.1.4.2 Cultivo bacteriano de un aislado de *Bartonella*

Se realizaron subcultivos de un aislado de *Bartonella sp.* proveniente de un cultivo positivo de un paciente con diagnóstico clínico de bartonelosis (IMT/DAC 162-13/oct-2015), del laboratorio del programa especial de bartonelosis humana del IMT/DAC de la UNMSM. Estos subcultivos se

realizaron en medio bifásico a base de agar granulado con infusión de papa glicerinada, la fase líquida contuvo caldo triptosa enriquecido con RPMI, [29] con y sin componentes sanguíneos de carnero (glóbulos rojos y plasma) y sin antibióticos. Los subcultivos se incubaron a una temperatura de 29 °C. Una vez comprobado el desarrollo de *Bartonella*, se procedió a realizar la prueba de pureza de la cepa bacteriana utilizando la coloración de Leishman, y se evaluó mediante observación al microscopio. La cepa se consideró que estaba pura, si solo se observó cocos y cocobacilos. El cultivo puro fue cosechado, lavado y almacenado a -20 °C hasta ser sonicado.

2.1.5 Métodos

2.1.5.1 Obtención del antígeno bacteriano

El cultivo bacteriano cosechado fue lavado con PBS pH 7.2 (Anexo A.1), 2-3 veces mediante centrifugación a 3 000 r.p.m. en refrigeración (4°C). La separación final del sedimento bacteriano se realizó mediante filtración, lo cual se hizo con jeringas descartables y filtros Millipore 0.45 µm, sin vacío, en refrigeración, por decantación. Después de cada filtración se realizó la prueba de pureza y si se comprobó la ausencia de contaminantes bacterianos, se procedió a realizar la sonicación. Previo a la sonicación, a la masa bacteriana se le adicionó azida de sodio a la concentración final de 1/5000 para su inactivación.

La sonicación se realizó a partir del aislado de *Bartonella* lavado e inactivado. Se preparó la suspensión bacteriana en PBS pH 7.2, ajustando su concentración al patrón de turbidez de 0.5 de la escala de Mc Farland, que corresponde a 1.5 $x10^8$ UFC/mL.[30]

La lisis de *Bartonella* sp. para la obtención del antígeno proteico se realizó por ultrasonido. La sonicación de la masa bacteriana se realizó de tres formas diferentes: 3 ciclos de un pulso de 1 minuto de sonicación en periodos de 2 minutos de descanso,[8] 5 ciclos de un pulso de 1 minuto de sonicación en

periodos de 1 minuto de descanso,[10] y 20 ciclos de un pulso de 20 segundos de sonicación en periodos de 10 segundos de descanso.[31] Todas las sonicaciones se realizaron a 22.5 KHz de frecuencia, con intensidad de onda de 6.5, y los descansos de los sonicados fueron en baño de hielo.

La masa bacteriana sonicada fue centrifugada a 14 000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C, eliminándose el sedimento y obteniéndose el sobrenadante, el cual fue almacenado en pequeños volúmenes a -20 °C hasta su uso. Al sobrenadante del sonicado se les realizó el dosaje de proteínas por el método de Löwry.[32]

2.1.5.2 Dosaje de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas de la cepa sonicada fue realizada por el método colorimétrico de Löwry (Anexo A.2) ,[32] usando como estándar albúmina sérica bovina.

2.1.5.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) de las proteínas obtenidas por sonicación del aislado de *Bartonella* IMT/DAC 162-13/oct-2015

Se realizó la electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico mediante el método de Laemmli (Anexo B).[33] Consta de dos tipos de geles: un gel llamado concentrador con un tamaño de poro no restrictivo (grande), que se forma sobre un segundo gel llamado separador o de resolución. En este sistema cada uno de los geles se prepara con tampones de diferente pH y fuerza iónica.

La corrida electroforética se realizó en una cámara Biometra Standard Power pack P25 durante un periodo de 50 minutos.

a. Preparación de la muestra

Se mezcló la muestra de proteínas de la cepa sonicada (IMT/DAC 162-13/oct-2015) con el buffer de tratamiento de muestra 2X, empleando volúmenes iguales de 6 µL cada uno, en un criotubo, y se sometió a baño de agua hirviendo por 90 segundos. Culminada la incubación se colocó la muestra en hielo hasta su uso.

b. Procedimiento de la electroforesis

Una vez preparados los geles de concentración y resolución, se retiró el peine lo que permitió la formación de carriles en el gel, se añadió el buffer de corrida y se colocó un volumen de la muestra de 10 µL por carril, y en un carril separado, 10 µL del estándar de peso molecular. A continuación, se conectaron los electrodos a la cubeta de electroforesis y también a la fuente de poder, se fijó inicialmente el voltaje a 95 V en el gel de concentración, y luego cuando la migración de las bandas llegó al gel de resolución, se aumentó el voltaje hasta 125 V.

Una vez que el frente de corrida llegó hasta el borde inferior del gel de resolución, determinado por la migración del frente de corrida del colorante azul de bromo fenol, se disminuyó el voltaje y apagó el equipo de electroforesis, e inmediatamente se desconectaron los electrodos.

c. Tratamiento, coloración y decoloración del gel

Culminada la electroforesis, se retiró una de las placas de vidrio para desprender y eliminar el gel de concentración. El gel de resolución fue incubado en la solución de fijación estuvo compuesta por metanol, ácido acético y agua destilada en proporciones de 5:1:10, respectivamente, previo a su tinción con azul de Coomassie al 0,05% durante 4 horas en agitación.

Una vez coloreado el gel, se procedió a su decoloración para evidenciar las bandas de proteínas separadas. La decoloración se realizó durante 4 horas en

agitación. La solución decolorante estuvo compuesta por metanol, ácido acético y agua destilada en proporciones de 5:7:100, respectivamente.

d. Estándar de peso molecular

Se utilizó el patrón de peso molecular Perfect protein Markers 10-225 kDa Novagen® Merck Millipore. Este estándar incluye proteínas de peso molecular de 15, 25, 35, 50, 75, 100 y 150 kDa, asimismo fue tratado de similar forma a la muestra problema previo a su aplicación en el carril del gel de la SDS-PAGE.

2.1.5.4 Estandarización de la prueba de Contrainmunoelectroforesis (CIEF)

La prueba de CIEF se efectuó de acuerdo al procedimiento descrito por Cornejo y cols. (1993).[34] Láminas portaobjetos de 25mmx75mm fueron cubiertas con agarosa (Sigma) de alta electroendósmosis al 1%, disuelta en buffer barbital (pH 8.3 u=0.06) conteniendo azida de sodio al 0.02% (Anexo C). El antígeno fue colocado en los pocillos de localización catódica y los sueros a evaluar fueron colocados en los pocillos de localización anódica. Las láminas de CIEF fueron sometidas a 100 V de corriente eléctrica por 30 minutos, luego fueron leídas inmediatamente de terminada la corrida electroforética, después de 0.5, 1, 2, 12 y 24 horas de incubación a temperatura ambiente en cámara húmeda. Las bandas de precipitación inespecíficas se eliminaron con citrato trisódico al 5%,[35] y después fueron lavadas, secadas y teñidas con Amido Black 10B (Merck).[34]

i. Titulación del antígeno de *Bartonella sp*.

La titulación del antígeno sonicado de *Bartonella sp*. se realizó frente a un suero de paciente (IMT/DAC 155-12/oct-2012), conteniendo anticuerpos anti-*Bartonella*. Debido a que para *Bartonella* no existe un suero comercial estándar, se decidió utilizar el suero de un paciente diagnosticado con bartonelosis a nivel clínico, microbiológico y molecular, reportado como tal en el Hospital Nacional

Cayetano Heredia y en el Naval Medical Research Unit 6 (NAMRU-6). El aislado bacteriano de *Bartonella* obtenido en el Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión" (IMT/DAC 162-13/oct-2015), sonicado y dosado en su contenido proteico previamente, fue utilizado como cepa de referencia.

La titulación del antígeno sonicado de *Bartonella* se realizó mediante la prueba de contrainmunoelectroforesis (CIEF), enfrentando el antígeno sin diluir (1:1) y diluido en forma seriada al doble (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256) en solución salina amortiguada, [36] con el suero de referencia sin diluir según el esquema A (Anexo D). Al término de la prueba, las láminas fueron leídas inmediatamente, después de 0.5, 1 y 24 horas de incubación a temperatura ambiente en cámara húmeda. Después de esta lectura preliminar las láminas fueron lavadas, secadas y, finalmente, coloreadas con Negro de amido (Amido Black 10B), un colorante para proteínas, y vueltas a leer. El título del antígeno fue la inversa de la máxima dilución que produjo bandas de precipitación nítidas, cuya forma y ubicación corresponden a la reacción antígeno – anticuerpo en un medio semisólido.[34]

ii. Estandarización del tamaño y distancia entre los pocillos, y volúmenes de los reactivos

Para la estandarización de la prueba se evaluaron los tamaños de los pocillos de 3, 4 y 5 mm, volúmenes de los reactivos de 12, 21 y 36 µL, y distancia entre los pocillos de 3, 4 y 5 mm (Anexo D, esquemas A y B).

iii. Evaluación de los sueros

Los sueros humanos fueron evaluados mediante la prueba de CIEF estandarizada, empleando el antígeno titulado. Todos los sueros fueron titulados, para lo cual se hicieron diluciones seriadas al doble del suero en solución salina

amortiguada. El título de estos sueros fue la inversa de la máxima dilución que produjo bandas o líneas de precipitación, luego de la coloración.[34,36]

2.1.6 Análisis de resultados

Para el análisis electroforético se construyó la curva estándar utilizando los valores de Rf (Ratio of front, distancia de la muestra desde el origen/distancia del colorante de corrida desde el origen) y el logaritmo del peso molecular de las proteínas estándar. Para hallar los pesos moleculares de las proteínas en estudio se interpoló los datos de los Rf de dichas proteínas en la curva estándar construida. [37]

La CIEF se consideró positiva cuando se evidenció al menos una banda de precipitación luego de la coloración con el colorante Amido Black. Los cálculos para la determinación de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la prueba se realizaron de acuerdo a lo descrito (anexo D). [38]

CAPITULO III

RESULTADOS

Se estudió un total de 60 muestras de suero provenientes de pacientes con diagnóstico clínico y bacteriológico de bartonelosis. Los pacientes tuvieron entre 3 y 76 años de edad, con una edad promedio de 42,4 años y una desviación estándar de ± 16.3. El 70% (42) de los pacientes fueron del sexo masculino y 30% (18) fueron del sexo femenino (Tabla 1).

El cultivo bacteriano del aislado de *Bartonella* (IMT/DAC 162-13/oct-2015) reveló colonias típicas del género (Figura 1). El frotis de estas colonias coloreadas con el colorante Leishman mostró la presencia de bacterias cocoides y cocobacilares (Figura 2). La prueba de pureza de la cepa no mostró contaminación con otros microorganismos bacterianos.

En un inicio, cuando se preparó el medio de cultivo con componentes sanguíneos de carnero (eritrocitos y plasma), la suspensión bacteriana obtenida, lavada y sonicada, utilizada como antígeno en la prueba de CIEF reveló resultados falso positivos con 1/3 de los sueros provenientes de personas sanas. Por esta razón, se eliminaron los componentes sanguíneos de carnero para el cultivo de la cepa bacteriana utilizada como fuente de antígeno para la prueba.

La extracción óptima de proteínas de *Bartonella sp.* se obtuvo por sonicación de la masa bacteriana con 20 ciclos de un pulso de 22.5 KHz, con intensidad de onda de 6.5, en periodos de 20 segundos de sonicación por 10 segundos de descanso entre cada sonicación, en baño de hielo, lo cual se comprobó cuando se enfrentaron los antígenos obtenidos con un suero positivo.

El aislado de *Bartonella* sonicado, libre de componentes sanguíneos de carnero, tuvo una concentración de 0.64 mg/mL obtenido por el método colorimétrico de Löwry y col.

La electroforesis en condiciones reductoras (SDS-PAGE) del aislado de *Bartonella* sonicado reveló tres bandas de proteínas con pesos moleculares de 66.2 kDa, 74.5 kDa y 97.3 kDa, respectivamente (Figura 3).

Para determinar la concentración óptima del antígeno bacteriano en la prueba de CIEF, se realizó su titulación utilizando un suero de paciente con diagnóstico clínico, microbiológico y molecular de bartonelosis, encontrándose que la concentración óptima fue 0.64 mg/mL (Figura 4).

Al evaluar el tamaño y la distancia óptima entre los pocillos, se encontró que el diámetro y la distancia entre los pocillos que mejor revelaron un resultado positivo fueron de 3 mm, y el volumen utilizado para cada reactante fue de 12 µL (Anexo D, esquemas A y B).

Los sueros de 60 pacientes con diagnóstico de enfermedad de Carrión fueron evaluados mediante la prueba de CIEF, de los cuales 26 fueron positivos (Figura 5 y 6) y 34 fueron negativos (Tabla 2). La prueba fue positiva en el 44% (19/43) y en el 41% (7/17) de los sueros de pacientes en fase aguda y crónica de la enfermedad, respectivamente. La mayoría de los sueros positivos, revelaron solo una banda de precipitación. Los sueros de 54 pacientes con otras infecciones fueron evaluados mediante la prueba de CIEF para determinar la especificidad de la prueba, de los cuales solo el suero proveniente de un paciente con hidatidosis fue positivo (Figura 7), siendo el resto de los sueros negativos (Tabla 3). Asimismo, los sueros de 9 personas sanas fueron negativos para la misma prueba (Tabla 2).

La prueba de CIEF reveló una sensibilidad de 43.3% y una especificidad de 98.4%. El valor predictivo positivo fue de 96.3% y el valor predictivo negativo fue de 64.6%.

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes con diagnóstico bacteriológico y clínico de bartonelosis.

Variables	**N° (%)**
Sexo	
Masculino	42 (70)
Femenino	18 (30)
Edad (años)	
3-13	2 (3)
14-24	10 (17)
25-35	8 (13)
36-46	11 (18)
47-57	18 (30)
58-68	10 (17)
> 69	1 (2)
Total	60 (100)

Tabla 2. Resultados de la prueba de CIEF con sueros de pacientes con diagnóstico de bartonelosis, sueros de personas sanas y sueros de pacientes con otras infecciones.

	Pacientes con bartonelosis		Personas sanas	Pacientes con otras infecciones	TOTAL
	Aguda	Crónica			
CIEF positiva	19	7	0	1	27
CIEF negativa	24	10	9	53	96
TOTAL	43	17	9	54	123

Tabla 3. Resultados de la prueba de CIEF con sueros de pacientes con otras enfermedades.

Enfermedad	**N° de muestras positivas/N° de muestras totales**
Fiebre tifoidea	0/21
Brucelosis	0/14
Enfermedad de Chagas	0/6
Sífilis	0/3
Toxoplasmosis	0/3
Fasciolosis	0/2
Hidatidosis	1/1
Paragonimiasis	0/1
Cisticercosis	0/1
Himenolepiasis	0/1
Aspergilosis	0/1
Total	1/54

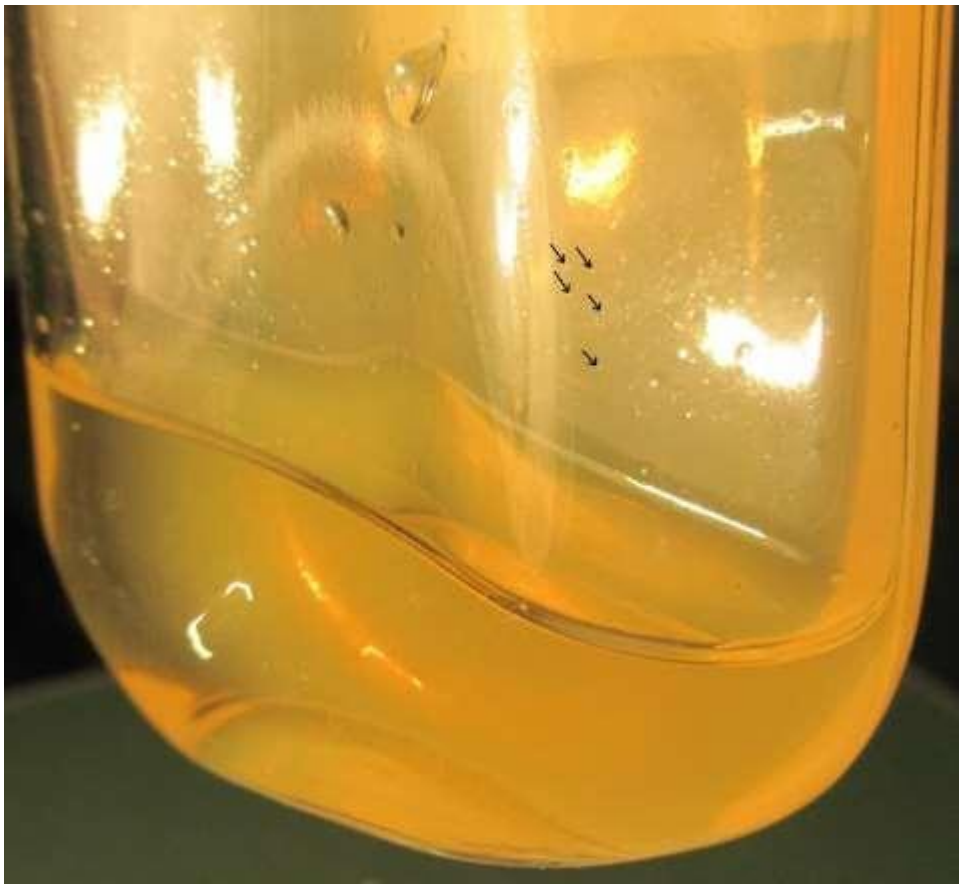


Figura 1. Cultivo bacteriano del aislado de *Bartonella* (IMT/DAC 162-13/oct-2015) donde se observan algunas colonias (flechas negras).

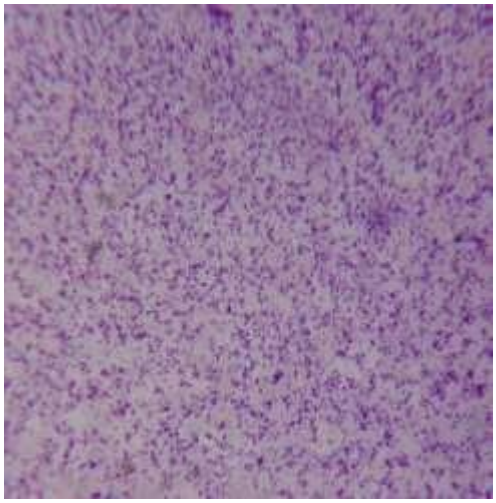


Figura 2. Frotis del aislado de *Bartonella* (IMT/DAC 162-13/oct-2015), coloreado con el colorante de Leishman.

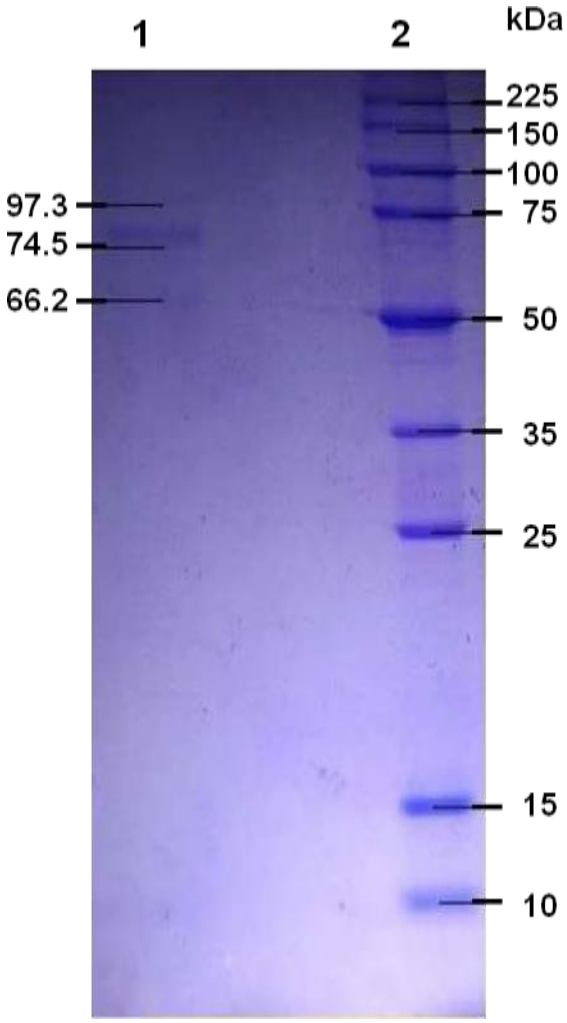


Figura 3. Análisis electroforético, SDS-PAGE al 12%, del sonicado de la cepa de *Bartonella* (IMT/DAC 162-13/oct-2015), utilizada como antígeno para la prueba de CIEF. Carril 1: las bandas mostradas corresponden a proteínas de 66.2 kDa, 74.5 kDa y 97.3 kDa; carril 2: marcador de peso molecular.

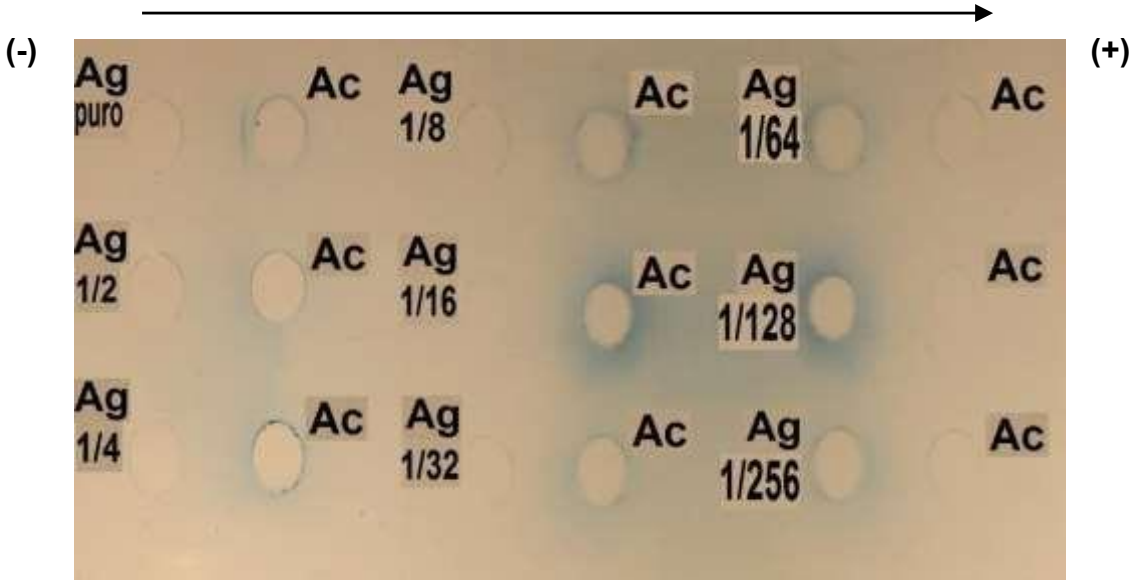


Figura 4. Titulación del antígeno bacteriano (IMT/DAC 162-13/oct-2015) utilizando el suero de paciente (IMT/DAC 155-12/ oct-2012), con diagnóstico clínico, microbiológico y molecular de bartonelosis. Se observa una banda de precipitación nítida solo con el antígeno no diluido (puro).

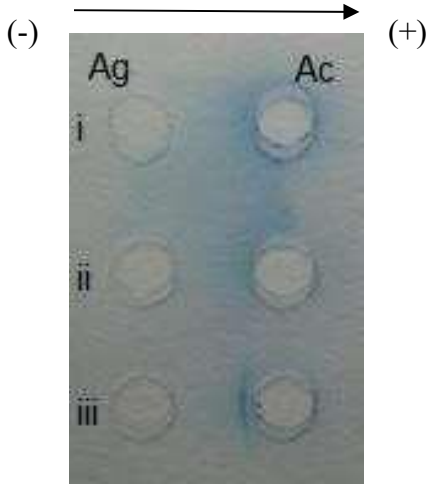


Figura 5. CIEF del suero (Ac) de pacientes (i, ii, iii) con diagnóstico bacteriológico y clínico de bartonelosis frente al antígeno (Ag) sonicado de *Bartonella sp.* Se observa una banda de precipitación entre el suero del paciente iii y el Ag, después de que la lámina fue coloreada. Se observan reacciones negativas para los otros dos sueros evaluados, i e ii. La flecha superior indica la dirección del movimiento del antígeno.

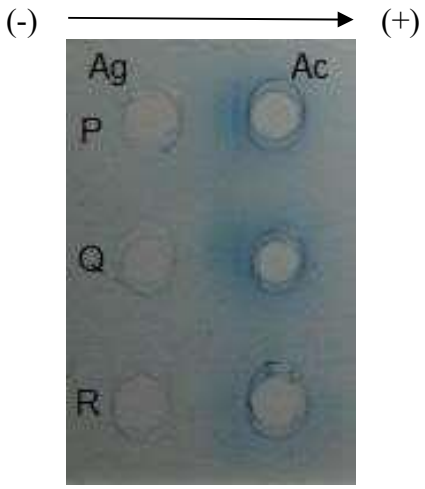


Figura 6. CIEF del suero (Ac) de pacientes (P, Q, R) con diagnóstico bacteriológico y clínico de bartonelosis frente al antígeno (Ag) sonicado de *Bartonella sp.* Se observan bandas de precipitación entre los sueros de los pacientes P y Q y el Ag, después de que la lámina fue coloreada. Se observa una reacción negativa para el otro suero evaluado, R. La flecha superior indica la dirección del movimiento del antígeno.

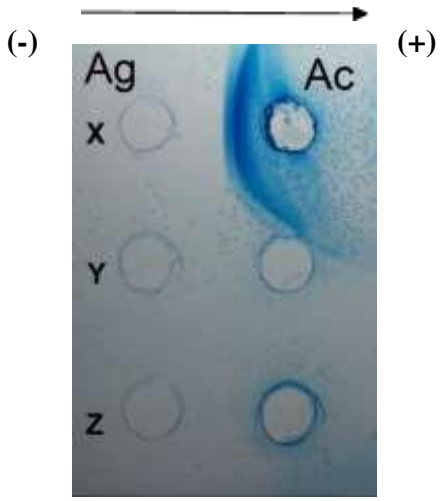


Figura 7. CIEF del suero (Ac) de pacientes (X, Y, Z) con diagnóstico de otras infecciones frente al antígeno (Ag) sonicado de *Bartonella sp.* Se observa una banda de precipitación entre el suero del paciente con hidatidosis (X) y el Ag, después de que la lámina fue coloreada. Se observa una reacción negativa para los otros sueros evaluados, Y y Z. La flecha superior indica la dirección del movimiento del antígeno.

CAPÍTULO IV
DISCUSIÓN

En nuestro país, la búsqueda de nuevos métodos y técnicas de diagnóstico de la enfermedad de Carrión ha sido escasa, a pesar de que *B. bacilliformis* es una bacteria difícil de cultivar y de identificar [1], y a la baja sensibilidad que revela el frotis sanguíneo coloreado con Giemsa.[3] Este interés no ha aumentado a pesar de haberse descubierto que en el Perú no solamente circula *B. bacilliformis*, sino también otras especies de *Bartonella* causantes de enfermedad en humanos, como *B. quintana* y *B. henselae* [26], pudiendo originar esta última un cuadro clínico similar al ocasionado por *B. bacilliformis*.[1] Sin embargo, sigue siendo *B. bacilliformis* el principal agente bacteriano del género *Bartonella* que causa enfermedad en el Perú.[3] Dado el riesgo potencial de pérdida de vidas humanas por la infección por *Bartonella*, es necesario contar con técnicas serológicas para un pronto diagnóstico de la enfermedad.

La CIEF es una prueba que ha sido usada con éxito para el diagnóstico serológico y constituye una técnica relativamente simple para detectar anticuerpos contra una variedad de agentes patógenos.[12,34,36] La prueba es rápida y sencilla de realizar, requiere pequeños volúmenes de los reactivos y el antígeno debe ser soluble. El propósito del estudio fue estandarizar una prueba de CIEF, que utiliza proteínas extraídas por sonicación de una cepa de *B. bacilliformis* como antígeno, para el diagnóstico de la bartonelosis, principalmente la enfermedad de Carrión. Este estudio demostró que la prueba estandarizada posee una elevada especificidad, pero es poco sensible incluso en la etapa aguda de la enfermedad.

Las condiciones de cultivo de la bacteria revelaron ser de extrema importancia, debido a que cuando creció en presencia de plasma o sangre de carnero, estos componentes se incorporaron al antígeno y fueron la causa de reacciones falsas positivas con sueros de personas sanas, probablemente debido a la presencia de antígenos heterófilos.[39] La obtención del antígeno, libre de componentes hemáticos de carnero, por sonicación fue sencilla y rápida, pero la principal dificultad en su preparación fue el acceso al equipo sonicador. Dos estudios previos habían reportado la obtención de antígeno sonicado de *B. bacilliformis* y su uso con éxito en pruebas serológicas primarias, Western blot

(Mallqui y col.) [8] y ELISA (Chamberlin y col.) [9], aunque las condiciones de extracción de las proteínas antigénicas fueron diferentes.

El análisis del perfil proteico por SDS-PAGE del extracto bacteriano sonicado reveló tres bandas de 66, 74.5 y 97 kDa. Knobloch reportó la obtención de seis proteínas antigénicas específicas para sueros de pacientes con enfermedad de Carrión por inmunoblot, cuyos pesos moleculares fueron de 18, 26, 36, 48, 65 y 75 kDa.[7] Aunque es evidente que hay visibles diferencias en el perfil proteico de ambas preparaciones, también parecería que hay bandas en común o muy cercanas en peso molecular. Es más, el antígeno de 75 kDa, considerado uno de los dos principales antígenos de *B. bacilliformis*, debido a que presenta fuerte reactividad en los inmunoensayos[3], podría ser la banda de 74.5 kDa revelada en la SDS-PAGE. En cambio, Mallqui y col.[8] reportaron siete antígenos inmunoreactivos de bajo peso molecular, entre 13-42 kDa, de los cuales dos fueron específicos para la enfermedad de Carrión en fase crónica, los antígenos de 17 y 18 kDa.

La concentración óptima del antígeno de 0.64 mg/mL, obtenida por titulación contra un suero conteniendo anticuerpos anti-*Bartonella*, utilizada en la CIEF fue menor a la reportada por Díaz y col.,[40] quienes usaron 1 mg/mL para detectar anticuerpos anti-*Brucella*. Esta menor concentración de antígeno requerida para detectar anticuerpos contra *Bartonella* puede reflejar un contenido enriquecido de proteínas específicas, como se observa en el perfil proteico por SDS-PAGE.

En relación al diámetro de los pocillos, la distancia entre ellos y el volumen del antígeno y de los sueros utilizados, fueron similares a los reportados por Cornejo y col.[34], lo que hace a la CIEF una prueba versátil, dado que se puede adaptar para detectar anticuerpos contra bacterias y parásitos, y económica, porque emplea pequeños volúmenes de los reactantes. El empleo de la fuerza electroforética favorece el encuentro de casi la totalidad de antígeno y anticuerpo presente, de modo que si hay complementariedad entre ambos se evidencia la reacción de precipitación.

La CIEF reveló 43.3% de sensibilidad para los casos de la infección por *Bartonella sp.*, un valor superior pero similar al 27.8% y 33.7% obtenido por HAI e IFI, respectivamente, reportado por Knobloch y col.[6] con sueros de pacientes con enfermedad de Carrión. Solo la prueba de ELISA, el inmunoblot y la IFI aplicados para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Carrión, con antígeno de esta especie de *Bartonella*, han mostrado mayor sensibilidad. Para el ELISA Knobloch y col.[6] y Anaya y col.[10] reportaron una sensibilidad de 54.8% y 68.6%, respectivamente; mientras que para el inmunoblot la sensibilidad reportada por Mallqui y col. fue de 70%[8], un valor similar alcanzado por la IFI reportada por Chamberlin y col.[9]

La falta de una moderada o elevada sensibilidad de la CIEF podría tentarnos a afirmar que se debe a que los sueros provienen en su mayoría (72%, 43/60) de casos en fase aguda de la fase de la enfermedad, porque se ha demostrado que cuando se evalúan sueros en la etapa crónica, la sensibilidad de las pruebas serológicas como la IFI y el inmunoblot superan el 92% de sensibilidad [8,9]. Sin embargo, cuando se comparó la positividad de la CIEF considerando la fase de la enfermedad se encontró que fue similar (44% en fase aguda versus 41% en fase crónica), lo cual significa que esta explicación es insatisfactoria. Una mejor explicación de la baja sensibilidad de la CIEF se debe a que necesita un elevado número de complejos antígeno-anticuerpo para tornarse positiva, dado que se trata de una prueba secundaria, en contraste con las pruebas primarias como el ELISA, la IFI y el inmunoblot, que por lo general son más sensibles y requieren menos complejos inmunitarios para ser positivas. Por último, algunos de los sueros utilizados llevaban almacenados más de 3, 4 y 5 años, lo cual podría haber afectado la conservación de los anticuerpos.

En este estudio, el 98% de los sueros provenientes de personas sanas o que no estaban infectadas por *Bartonella* fueron seronegativos, indicando que la especificidad de la CIEF es lo suficientemente alta como para ser usada conjuntamente con una prueba serológica sensible para el diagnóstico de la enfermedad de Carrión. La única muestra de suero que originó un resultado positivo falso provino de un paciente con hidatidosis, y no fue posible establecer la razón de este inesperado resultado. La prueba de ELISA

desarrollada por Anaya y col. [10] presentó baja sensibilidad y su especificidad, considerando no solo los sueros de personas sanas sino también los sueros de personas con otras infecciones bacterianas, fue de 69.8%, lo que no permite su empleo como prueba diagnóstica. Así mismo, el inmunoblot para el diagnóstico de la enfermedad de Carrión desarrollado por Chamberlin y col. [8] fue 100% específico para los sueros control negativos, provenientes de personas sanas, pero fue solo 79% específico para los sueros de pacientes con otras infecciones bacterianas, siendo llamativo un 34% de reacciones cruzadas con los sueros de pacientes con brucelosis, una enfermedad prevalente en nuestro medio[41]. Esta baja especificidad tanto del ELISA como del inmunoblot, podría explicarse por la presencia de antígenos no específicos en los extractos totales usados en ambas pruebas, lo cual no ocurriría en el antígeno bacteriano sonicado usado en la CIEF.

La prueba de CIEF estandarizada para detectar anticuerpos contra *Bartonella* es específica de género, no reacciona con el suero de pacientes con otras infecciones bacterianas evaluadas, incluyendo brucelosis, pero los casos detectados en este estudio corresponden únicamente a pacientes con sospecha de infección por *B. bacilliformis,* la principal especie de *Bartonella* que se reporta en el país. [3]

La limitación más importante del estudio ha sido no haber podido comparar los resultados de la CIEF con una prueba serológica primaria, a fin de determinar que la falta de reactividad de los sueros se debe a la falta de sensibilidad propia de la prueba y no a la ausencia de anticuerpos, sea porque el paciente era seronegativo, por su deterioro debido al tiempo transcurrido o por las condiciones de almacenamiento de los sueros. Así mismo, no se evaluó la especificidad de la prueba con muestras de suero de pacientes infectados con *Coxiella burnetti*, *Chlamydia trachomatis* y *Rickettsia rickettsii*, reportadas como causas de reacción cruzada con *B. henselae* y *B. quintana* [42,43], debido a que no se contaba con dichos sueros. Además, la relativa baja concentración del antígeno podría haber afectado la sensibilidad del ensayo, porque solo fue capaz de dar resultados positivos cuando no se diluyó.

En conclusión, este estudio ha mostrado una escasa sensibilidad de la CIEF para detectar anticuerpos contra *Bartonella* en pacientes con sospecha de infección por *B. bacilliformis*. Sin embargo, es una prueba con elevada especificidad, que podría ayudar en el diagnóstico serológico si se usa conjuntamente con una prueba sensible. Se requieren futuras investigaciones para evaluar el antígeno bacteriano sonicado en pruebas serológicas primarias como el ELISA o el inmunoblot, con las cuales se mejoraría la detección de un mayor número de casos, debido a que reveló escasas reacciones cruzadas.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La prueba de CIEF estandarizada para determinar infección humana por *Bartonella sp.* reveló una baja sensibilidad y una alta especificidad.

2. Para el cultivo de la cepa de *Bartonella* utilizada como antígeno no se debe utilizar sangre o plasma de carnero, porque fue una causa de las reacciones falsas positivas.

3. El antígeno sonicado de la cepa de *Bartonella* utilizada reveló tres bandas proteicas de elevado peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

4. La concentración óptima del antígeno de *Bartonella sp.* para la prueba de CIEF que permite detectar infección humana por *Bartonella sp.* fue relativamente baja.

5. La prueba de CIEF puede ser utilizada como prueba confirmatoria dada su elevada especificidad, pero por su baja sensibilidad no puede ser utilizada como prueba de tamizaje serológico.

5.2 RECOMENDACIONES

1. Desarrollar metodologías para el cultivo de *Bartonella* en un medio semi-sintético que incremente la masa bacteriana a fin de utilizarla como antígeno en pruebas serológicas.
2. Implementar técnicas de purificación de los antígenos de *Bartonella* sonicados y realizar su caracterización para identificar los antígenos específicos de género.
3. Desarrollar pruebas serológicas primarias rápidas y específicas para el diagnóstico de las infecciones por *Bartonella sp.* utilizando antígenos semipurificados o purificados caracterizados inmunológicamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blanco J, Raoult D. Enfermedades producidas por *Bartonella spp.* Enferm Infecc Microbiol Clín. 2005; 23(5):313-20.
2. Breitschwerdt E B, Kordick D L. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. Clin Microbiol Rev. 2000; 13(3):428-38.
3. Pachas P. Enfermedad de Carrión (Bartonelosis) en el Perú. Módulos Técnicos. Lima (Perú): Serie de Documentos Monográficos; 13. 2001. Ministerio de Salud. Oficina General de Epidemiología – Instituto Nacional de Salud.
4. Weiss P. Hacia una concepción de la Verruga Peruana. An Fac Med. 1926; 12: 279-99. Disponible en: http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php /anales/article/view /10136/8880 [citado: dic. 2016]
5. Solano L. Investigación de anticuerpos anti-*Bartonella* en la enfermedad de Carrión o Bartonelosis humana. Rev Per Epidemiol. 1986; 1(1):27-8.
6. Knobloch J, Solano L, Alvarez 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.
7. Knobloch J. Analysis and preparation of *Bartonella bacilliformis* antigens. Am J Trop Med Hyg. 1988; 9(2):173-8.
8. Mallqui V, Speelmon E, Verástegui M, Maguiña C, Pinell P, Lavarello R, et al. Sonicated diagnostic immunoblot for bartonellosis. Clin Diagn Lab Immunol. 2000; 7(1):1-5.
9. Chamberlin J, Laughlin L, Gordon S, Romero S. Solórzano N, Regnery R. Serodiagnosis of *Bartonella bacilliformis* Infection by Indirect fluorescence antibody assay: Test development and application to a population in an area of bartonellosis endemicity. J Clin Microbiol. 2000; 38(11):4269–71.
10. Anaya E, Mendoza G, García L, Fernández Y. Prueba de Elisa Indirecta del lisado total de *Bartonella bacilliformis* para el diagnóstico rápido de la Enfermedad de Carrión. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2008; 25(2):243-6.

11. Ventura G, Padilla C. Diagnóstico Bacteriológico de la bartonelosis humana o enfermedad de Carrión. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Lima (Perú), 2006. Disponible en: http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual_ Bacteriologico.pdf [citado: dic. 2016].
12. Cornejo W, Ticlla D, Tantaleán M, Huiza A. Detección de anticuerpos en gatos infectados con *Paragonimus mexicanus* mediante la contrainmunoelectroforesis. Rev Per Med Trop. UNMSM. 1994; 8(1-2):53-5.
13. Cornejo W, Alva P, Sevilla C, Huiza A. Comparación de tres pruebas serológicas para detectar infecciones por *Paragonimus mexicanus* en gatos infectados. An Fac Med. 2012; 73(1):29-33.
14. Collins J., Kelly M. Comparison of phadebact coagglutination, bactogen latex agglutination, and counterimmunoelectrophoresis for detection of *Haemophilus influenzae* type b antigens in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol. 1983; 17(6): 1005-8.
15. Culliford, B. J. Precipitin reactions in forensic problems: a new method for precipitin reactions on forensic blood, semen and saliva stains. Nature. 1964; 201(4924):1092–1093. doi: 10.1038/2011092a0 [citado: mayo 2016].
16. Alonso C., Bartolomé R., Domínguez J., Matas L., Rabella N. Procedimientos en microbiología. 19 Técnicas rápidas de detección de antígeno. 2005. Disponible en: https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientos microbiologia/seimc-procedimientomicrobiologia19.pdf [citado: dic 2016].
17. Solano L, Solano V. La Enfermedad de Carrión y la biología de *Bartonella bacilliformis*. Rev Per Med Trop. (UNMSM) 1991; 5:13-8.
18. Cuadra M, Cuadra AL. Enfermedad de Carrión: inoculaciones en seres humanos con *Bartonella bacilliformis*, una revisión. An Fac Med. 2000; 61(4):289-94.
19. Burstein Z, Mayta P. En defensa de la denominación como "enfermedad de Carrión" para la Bartonelosis humana producida por la *Bartonella bacilliformis*. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2007; 24(2):103-6.
20. Herrer A. *Phlebotomus* y DDT en el Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 1956; 10(2):99-137.

21. Calero G, Aguilar M, Castillo P. Estudio clínico y epidemiológico de la bartonelosis en Ecuador. Soc Per Dermatol. 2005; 15(2):132-6.
22. Samper B., Montoya J. Estudios bacteriológicos y experimentales de un germen aislado en una epidemia de Bartonellosis en el departamento de Nariño (Colombia). Rev Fac Med. 1940; 9(4):197-218. Disponible en: http://revistas.unal.edu.co/index.php/revfacmed/article/view/30513 [citado: Dic 2016].
23. Kosek M., Lavarello R, Gilman R, Delgado J, Maguiña C, Verastegui M, et al. Natural history of infection with *Bartonella bacilliformis* in a nonendemic population. J Infect Dis. 2000; 182(3):865-72.
24. Takano J. Enfermedad de Carrión (Bartonellosis humana). Estudio morfológico de la fase hemática y del periodo eruptivo con el microscopio electrónico. An Fac Med. 1970; 53(1-4):44-86. Disponible en: http://dx.doi.org/10.15381/anales. v53i1-4.5081 [citado: dic. 2016]
25. Maguiña C, Ugarte-Gil C, Breña P, Ordaya E, Ventosilla P, Huarcaya E, et al. Actualización de la enfermedad de Carrión. Rev Med Hered. 2008; 19(1):36-41.
26. Cornejo W, Vizcarra H. *Bartonella henselae*: Nuevo patógeno en humanos. An Fac Med UNMSM. 1999; 60(4):281-92.
27. Billeter S, Levy M, Chomel B, Breitschwerdt E. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. Med Vet Entomol. 2008; 22:1-15.
28. Cáceres A, Padilla C, Arias Stella J, Huatuco G, Gonzales A. La detección *de Bartonella spp.* y *Rickettsia spp.* en pulgas, garrapatas y piojos recolectados en las zonas rurales de Perú. Rev Peru Biol. 2013; 20(2):165-9.
29. Koneman E, Allen S, Winn W, Procop G, Janda W, Schreckenberger P, et al. Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en Color. 6a ed. Argentina: Médica Panamericana, 2008.1696 p.
30. Mendoza G, Flores D. Resistencia antimicrobiana de cepas de *Bartonella bacilliformis* procedentes de regiones endémicas de la enfermedad de Carrión en el Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2015; 32(4):659-66.

31. Guerrero A, Villarraga J. Elaboración de un anticuerpo monoclonal contra *Leptospira interrogans* serovar Pomona [internet]. Facultad Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Bogotá. 2010. [citado: mayo 2016] disponible en: http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/6108/T14.10%20G937e.pdf;sequence=1
32. Löwry O, Rosebrough N, Farr L, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193(1):265-75.
33. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227:680-5.
34. Cornejo W, Náquira F, Alva P. Evaluación de la Contrainmunoelectroforesis y la prueba de ELISA en el diagnóstico de fasciolasis experimental de ratones. Rev Per Med Trop. UNMSM. 1993; 7(1):53-9.
35. Negroni R, Robles A, Galussio J. Estudio comparativo de las reacciones serológicas cuantitativas con un antígeno metabólico de *Aspergillus fumigatus*. Mycopathol Mycol Appl. 1972; 48(4):275-87.
36. Díaz A., Albas A., Valentini E., Perdomo G. Evaluación de la calidad de los reactivos que se utilizan en la técnica de contrainmunoelectroforesis para la determinación de anticuerpos antirrábicos. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1991; 33(1):44-9.
37. Maldonado A, Jorrín J. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*. Departamento de Bioquímica y biología Molecular, Campus Universidad de Rabanales, Córdova. 2009:1-15. Disponible en: https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20GELES%20PAA.pdf [citado: Dic. 2016].
38. Fernández P, Pértegas S. Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complexo Hospitalario Universitario de A Coruña (España) Cad Aten Primaria 2003; 10:120-124. Disponible en: http://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas /pruebas_diagnosticas.asp [citado: Dic 2016].
39. Lee C, Davidsohn I, Slaby R. Horse agglutinins in infectious mononucleosis. Am J Clin Pathol. 1968; 49(1):3-11.

40. Díaz R, Maravi-Poma E, Rivero A. Comparison of counter-immunoelectrophoresis with other serological tests in the diagnosis of human brucellosis. Bull World Health Organ.1976; 53(4):417-24.
41. Ortega A, Paredes J, Guillén A. Prevalencia de anticuerpos contra *Brucella sp.* en donantes del banco de sangre de un hospital de Lima. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2007; 24(4):431-34.
42. La Scola B, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. J Clin Microbiol. 1996; 34(9):2270-4.
43. Maurin M, Eb F, Etienne J, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. J Clin Microbiol. 1997; 35(9):2283-7.

ANEXOS

ANEXO A

PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

1. Solución de Buffer Salino Fosfato (PBS)

Cloruro de sodio	(NaCl)	8 g
Cloruro de Potasio	(KCl)	0.2 g
Fosfato dibásico de potasio	(KH2PO4)	0.2 g
Fosfato dibásico de sodio	(Na2HPO4)	2.9 g
Agua destilada		c.s.p. 1000 mL

Mezclar, ajustar el pH a 7.4.

2. Buffer barbital (pH 8.3) 1X

Buffer Barbital 10X	15 mL
5,5′ dietil acido barbitúrico	6.2 g
Barbital sódico	34.2 g
Lactato de calcio pentahidratado	1.6 g
Agua destilada	c.s.p. 150 mL

Mezclar, ajustar el pH a 8.3.

3. Reactivos de la agarosa de alta electroendósmosis (EEO) al 1%

Agarosa de alta EEO	0.5 g
Azida de sodio	0.05 g
Buffer Barbital (PBS), pH 8.3	c.s.p. 50 mL

Licuar y repartir en láminas portaobjetos.

4. Solución de citrato trisódico 5%

Citrato trisódico	5 g
Agua destilada	c.s.p. 100 mL

Mezclar y conservar a temperatura ambiente.

5. Colorante Amido Black

Amido Schwarz (negro amido)	0.01 g
Ácido acético glacial	2 mL
Agua destilada	c.s.p. 100 mL

6. Solución decolorante para la coloración de Amido Black

Alcohol etílico	40 mL
Ácido acético glacial	10 mL
Agua destilada	c.s.p. 100 mL

REACTIVOS Y SOLUCIONES DE ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DODECIL SULFATO SÓDICO (SDS-PAGE)

1. Soluciones para preparación del gel concentrador (stacking) 5% para SDS-PAGE

H2O destilada	2,7 mL
Acrilamida/bis acrilamida 30%	0.67 mL
Tris 1 M pH 6.8	0.5 mL
SDS 10%	0.04 mL
10% Persulfato de amonio	0.04 mL
TEMED	0.004 mL

2. Soluciones para preparación del gel de resolución (resolving) 12% para SDS-PAGE

H2O destilada	4.9 mL
Acrilamida/bisacrilamida 30%	6 mL
Tris 1 M pH 6.8	3.8 mL
SDS 10%	0.15 mL
10% Persulfato de amonio	0.15 mL
TEMED	0.006 mL

3. Solución de fijación

Metanol	50 mL
Ácido acético	10 mL
H2O destilada	c.s.p. 100 mL

4. Solución de tinción azul de Coomassie

Metanol	50 mL
Azul de Coomassie R250	0.05 g
Ácido acético	10 mL
H2O destilada	c.s.p. 100 mL

5. Solución decolorante de gel

Metanol	5 mL
Ácido acético	7 mL
H2O destilada	c.s.p. 100 mL

6. Solución de conservación del gel

Ácido acético 7%

7. Buffer de tratamiento de muestra 2x

4x stacking gel buffer	0.125M	2.5 mL
10% SDS	4%	4 mL
Glicerol	20%	2 mL
Azul de bromofenol	0.02%	2 mg
Dithiotreitol	0.2M	0.31 g
H2O destilada		10 mL

ANEXO B

PROTOCOLO DE DOSAJE DE PROTEÍNAS POR MÉTODO DE LÖWRY

Materiales:

A: Na2CO3 10% en NaOH 0.1 M

B1: CuSO4. 5H2O al 5%

B2: Tartrato Na-K al 10%

C: mezclar A, B1 y B2 (10: 0.1: 0.1)

Reactivo Folin: 1/4

estándar BSA 2 mg / mL

	B	**St1**	**St2**	**St 3**	**MP**
H_2O destilada (mL)	0.2	-	0.1	0.150	-
ST 2 mg/mL (mL)	-	0.2	0.1	0.050	-
MP (mL)	-	-			0.2
Reactivo C (mL)	1	1	1	1	1
	Muestras en reposo x 15 minutos en oscuridad				
Reactivo Folin (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Muestras en reposo x 30 minutos, después leer en espectrofotómetro a 580 nm

$$F_C = [St] / ABS_{ST} = 2mg/mL / 0{,}736$$

$$[MP] = F_C * (ABS_{MP} - ABS_{BL})$$

MP: muestra problema

St: estándar

F_C: factor de calibración.

BSA: albúmina sérica bovina

ABS_{ST}: Absorbancia del estándar.

ABS_{BL}: Absorbancia del Blanco.

ABS_{MP}: Absorbancia de la muestra problema.

ANEXO C

OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variable	Definición	Nivel de medición	categorías
concentración de antígeno	Cantidad de proteínas bacterianas	Cuantitativa continua	miligramos / mililitros
volumen de antígeno	Volumen de proteínas(antígeno) bacterianas	Cuantitativa continua	microlitros
Volumen de suero de referencia	Volumen en pocillo de suero anti-*Bartonella*	Cuantitativa continua	microlitros
Distancia entre pocillos de en lamina	Distancia óptima del pocillo entre antígeno y anticuerpo para inmunoprecipitación evidente	Cuantitativa continua	milímetros
Volúmenes de reacción de muestras problema	volúmenes óptimos para reacción de inmunoprecipitación	Cuantitativa continua	microlitros

ANEXO D

FOTOGRAFÍAS 1, 2 Y 3, ESQUEMAS A Y B, PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE EVALUACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Fotografía 1



Medios de cultivo para *Bartonella*

De izquierda a derecha: medios (plasma gelificado, gel de fases, agar de fases).

Fotografía 2



Medio agar de fases

Medio de cultivo para aislamiento primario de bartonellas

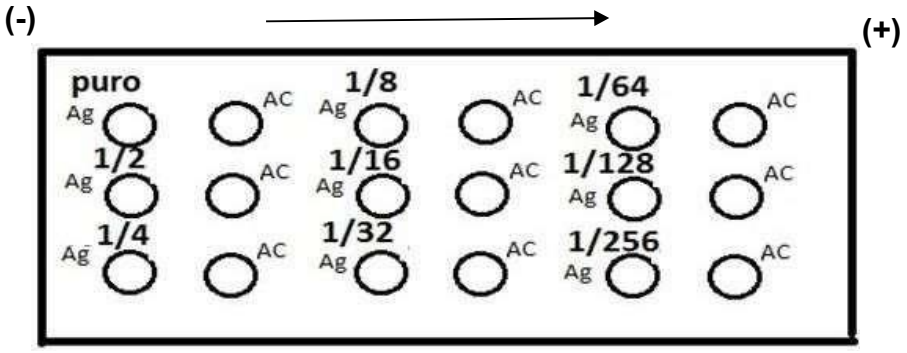
Fotografía 3



Medio bifásico sin sangre ni plasma de carnero (Subcultivo)

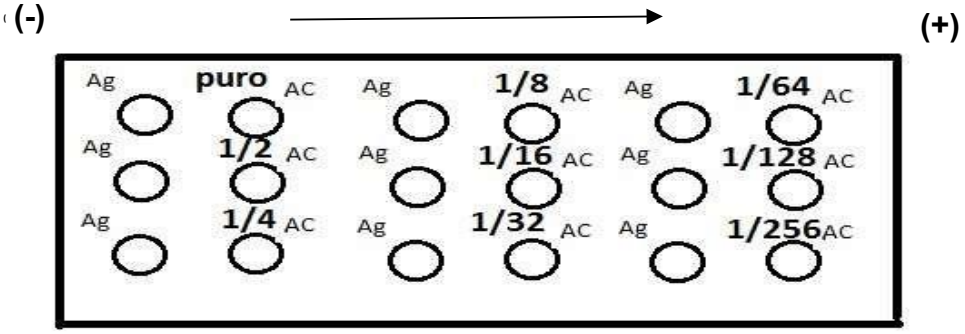
Medio de cultivo donde se obtuvo los sonicados bacterianos(caldo y superficie del cultivo)

Esquema A. Titulación del antígeno de referencia diluido seriadamente al doble frente a un suero positivo



- Ag: Antígeno
- Ac: Antisuero (suero de paciente)

Esquema B. Lámina portaobjetos con pocillos conteniendo agarosa de alta electroendósmosis para la prueba de CIEF. Titulación del suero de la seroteca con diagnóstico de infección por bartonelosis, mediante diluciones seriadas al ½, donde el antígeno se coloca frente al pocillo del suero.



- Ag: Antígeno
- Ac: Antisuero (suero de paciente)

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE EVALUACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{verdaderos positivos + falsos negativos}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{verdaderos negativos + falsos positivos}} \times 100$$

Valor predictivo positivo

$$\text{VPP} = \frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{verdaderos positivos + falsos positivos}} \times 100$$

Valor predictivo negativo

$$\text{VPN} = \frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{verdaderos negativos + falsos negativos}} \times 100$$