

Estandarización y utilidad de la contraimmunoelectroforesis para el diagnóstico de la bartonellosis

Standardization and utility of counterimmunoelectrophoresis for the diagnosis of bartonellosis

Dante Acuña^a, William Comejo^{1,2,b}

¹Departamento Académico de Microbiología Médica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

²Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión", Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

^aTecnólogo médico de laboratorio clínico, ORCID: 0000-0002-8639-2791

^bBiólogo microbiólogo, magister en docencia en educación superior. ORCID: 0000-0003-2371-7533

An Fac med. 2020;81(3):294-300. / DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v81i3.18713>

Correspondencia:

William Comejo Medina
wcomejom@unmsm.edu.pe

Recibido: 2 de setiembre 2020

Aprobado: 18 de diciembre 2020

Publicación en línea: 30 de diciembre 2020

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento: Estudio parcialmente financiado por el Vicerrectorado de Investigación y Posgrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, año 2014.

Contribuciones de autoría: DA concibió la idea, recolectó las muestras. DA y WC participaron en la ejecución, interpretación y redacción del artículo, así como la aceptación de la versión final para su publicación.

El presente estudio forma parte de la tesis de Dante Acuña Narva: Estandarización de una prueba de contraimmunoelectroforesis (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 de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Citar como: Acuña D, Comejo W. Estandarización y utilidad de la contraimmunoelectroforesis para el diagnóstico de la bartonellosis. An Fac med. 2020;81(3):294-300. DOI: <https://doi.org/10.15381/anales.v81i3.18713>

Resumen

Introducción. La enfermedad de Carrión, causada por *Bartonella bacilliformis*, es una enfermedad reemergente en el Perú, que se diagnostica convencionalmente mediante el frotis sanguíneo y el cultivo, los cuales son métodos poco sensibles, necesiéndose métodos diagnósticos alternativos. **Objetivos.** Determinar la sensibilidad y especificidad de la contraimmunoelectroforesis (CIEF) utilizando un antígeno sonicado obtenido de una cepa de *Bartonella* sp., para detectar anticuerpos contra la bacteria comparado con el cultivo como estándar de referencia. **Métodos.** El antígeno para la prueba se obtuvo por sonicación de un aislado de *Bartonella* sp., cultivado en un medio bifásico con y sin 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%. **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 su escasa sensibilidad. **Palabras clave:** Contraimmunoelectroforesis; Infecciones por *Bartonella*; Serología; Pruebas Inmunológicas; Antígenos; Sonicación (fuente DeCS BIREME).

Abstract

Introduction. Carrion's disease, caused by the bacterium *Bartonella bacilliformis*, is a reemerging disease in Perú, which is conventionally diagnosed by blood smear and culture, which are not very sensitive methods, requiring alternative diagnostic methods. **Objectives.** To determine the sensitivity and specificity of the counterimmunoelectrophoresis (CIEP) using a sonicated antigen obtained from a *Bartonella* sp. strain, to detect antibodies against the bacteria compared to the culture as reference standard. **Methods.** The test antigen was obtained by sonication of an isolate of *Bartonella* sp., grown in a biphasic medium with and without sheep blood. The reactivity of the sonic antigen was evaluated by the CIEP using 123 sera from people, of which 60 were from patients with a clinical and bacteriological diagnosis of Carrion's disease, 54 from people with other infections and 9 from healthy people. For the standardization of the CIEP 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 CIEP had a sensitivity of 43,3% and a specificity of 98,4%. **Conclusions.** The results of the CIEP 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; Immunologic Tests; Antigens; Sonication (source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

La bartonelosis es una infección causada por bacterias del género *Bartonella*, responsable de múltiples manifestaciones clínicas, dependiendo de la especie y del estado inmunológico del paciente, ocasionando infecciones tanto en humanos como en animales domésticos y silvestres ^(1,2).

Hasta inicios del año 1990, el género *Bartonella* tuvo una sola especie, *B. bacilliformis*. La posterior identificación de otras especies de *Bartonella* como agentes causantes de enfermedades como el araño de gato, angiomatosis bacilar y fiebre de las trincheras, ha dejado en evidencia su importancia como patógenos humanos ⁽¹⁾.

B. bacilliformis es el agente causal de la enfermedad de Carrión, la cual es endémica y reemergente en el Perú, limitada a ciertas regiones del ande peruano y algunos focos en Ecuador y Colombia ^(3,4). Se transmite por la picadura del mosquito *Lutzomyia verrucarum*, cuya distribución altitudinal va de los 900 a los 3000 msnm ⁽⁵⁾.

En el Perú, la enfermedad de Carrión es endémica en los departamentos de Lima, Ancash, La Libertad, Piura, Cajamarca, Amazonas, Huancavelica, Ayacucho y Cusco, siendo el humano el único reservorio de *B. bacilliformis* ⁽⁶⁾. Se han documentado brotes de la enfermedad de Carrión en zonas no endémicas, evidenciando ser una enfermedad reemergente con potencial de expansión geográfica ⁽⁷⁾.

Los métodos de diagnósticos actuales de la enfermedad de Carrión en nuestro medio se basan en los antecedentes epidemiológicos, las manifestaciones clínicas, el frotis sanguíneo coloreado con Giemsa o Wright y el aislamiento del agente patógeno mediante hemocultivo. En zonas endémicas, el método de elección en la fase aguda de la enfermedad es la observación al microscopio de frotis sanguíneos coloreados en busca de eritrocitos con bacilos intracelulares. El método es poco sensible (24%-36%), aunque revela una alta especificidad (96%) ^(4,8). En la etapa crónica de la enfermedad, la detección bacteriana en las verrugas tiene una menor sensibilidad

(10% o menos) ⁽⁸⁾. Por otro lado, el cultivo de *B. bacilliformis* requiere de un tiempo prolongado de incubación, es laborioso, tiene escasa sensibilidad, y requiere de cierta experticia en su preparación y en la conservación de la esterilidad del medio de cultivo ⁽⁹⁾.

Una alternativa al frotis sanguíneo y hemocultivo es el uso de métodos moleculares, entre los que destaca la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR), que mostró ser más sensible que los frotis sanguíneos ^(10,11) y el cultivo ⁽¹¹⁾. Sin embargo, debido a los altos costos de los equipos y la necesidad de contar con un entrenamiento especializado para su ejecución, es difícil su implementación en las zonas endémicas alejadas de los centros urbanos. Recientemente, la amplificación isotérmica mediada por bucle parece ser una técnica promisoría para el diagnóstico de la enfermedad de Carrión, no solo por su sensibilidad, sino por su rapidez y requerir un menor equipamiento que las pruebas de PCR convencionales ⁽¹²⁾.

El diagnóstico de la enfermedad de Carrión más utilizado en nuestro medio es el serológico, predominando las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) ^(13,14), prueba de ELISA ^(13,15,16) y Western blot ⁽¹⁷⁾. A pesar de sus innegables ventajas, las pruebas primarias son costosas, requieren un largo tiempo para obtener un resultado, necesitan equipo especializado y personal entrenado para su ejecución e interpretación. Además, una de las limitaciones de estas pruebas serológicas primarias es que no cuentan con un buen antígeno definido. Los distintos antígenos evaluados como el BB65 (GroEL), 75kDa (FtsZ), 43 kDa, fla o Pap31 (HbpA), principalmente en las pruebas de ELISA, han revelado resultados poco satisfactorios ⁽⁸⁾.

La prueba de contraelectroforesis (CIEF) es una técnica de inmunoprecipitación que utiliza antígenos puros o totales, y permite la rápida detección de anticuerpos o antígenos microbianos solubles en una variedad de fluidos corporales y tejidos. Otras ventajas de la CIEF son: la obtención de resultados en corto tiempo, el uso de un pequeño volumen, la simplicidad del procedimiento y el requerir un mínimo equipamiento ⁽¹⁸⁾. El objetivo del

presente estudio fue determinar la sensibilidad y especificidad de la CIEF utilizando un antígeno sonicado obtenido de una cepa de *Bartonella* sp., para detectar anticuerpos contra la bacteria comparado con el cultivo como estándar de referencia.

MÉTODOS

Diseño del estudio

Se realizó un estudio de evaluación de pruebas diagnósticas. El diseño muestral fue por conveniencia, se seleccionaron sueros de pacientes con diagnóstico clínico y bacteriológico de enfermedad de Carrión del repositorio de sueros 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).

Muestra

Para el estudio se seleccionaron 60 sueros de pacientes con diagnóstico clínico y bacteriológico (examen de frotis y cultivo) de bartonelosis del repositorio de sueros del Laboratorio de la Enfermedad de Carrión del IMT/DAC. Cada suero estaba en un criovial y fue guardado a -20 °C.

Para evaluar la reacción cruzada potencial, se consideraron 54 muestras de sueros de personas con otras infecciones, de las 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 fueron obtenidos del repositorio de sueros 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.

Se incluyó en el estudio a aquellas personas que dieron su consentimiento informado escrito para uso futuro de muestras.

Cepas bacterianas y condiciones del cultivo

Se realizaron subcultivos de un aislado de *Bartonella* sp. proveniente de un cultivo

positivo de un paciente con diagnóstico clínico de enfermedad de Carrión (IMT/DAC 162-13/oct-2015). Estos subcultivos se realizaron en medio bifásico⁽¹⁹⁾ con y sin componentes sanguíneos de carnero (glóbulos rojos y plasma), y sin antibióticos. La prueba de pureza de la cepa bacteriana se determinó mediante la observación al microscopio del frotis coloreado con Leishman. El cultivo puro fue cosechado, lavado y almacenado a -20 °C hasta ser sonicado.

Obtención del antígeno bacteriano

Las colonias de *Bartonella* resuspendidas en el tampón salino fosfato (PBS) pH 7,2 fueron lavadas por 2-3 veces mediante centrifugación a 3000 rpm a 4°C. La separación final del sedimento bacteriano se realizó mediante filtración, con ayuda de filtros Millipore de 0,45 µm. Previo a la sonicación, a la masa bacteriana se le adicionó azida de sodio a la concentración final de 1/5000, y se ajustó su concentración al patrón de turbidez de 0,5 de la escala de Mc Farland.

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⁽¹⁷⁾, 5 ciclos de un pulso de 1 minuto de sonicación en periodos de 1 minuto de descanso⁽¹⁶⁾, y 20 ciclos de un pulso de 20 segundos de sonicación en periodos de 10 segundos de descanso. 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 14000 rpm 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⁽²⁰⁾.

Electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Se realizó la electroforesis de proteínas en gel de poli(acrilamida con dodecil sulfato sódico mediante el método de Laemmli,⁽²¹⁾ usando un gel de separación de poli(acrilamida del 12% y un gel de concentración al 5%. La muestra antigénica fue separada en una cámara electro-

forética Biometra Standard Power pack P25 (Labgene Scientific SA, Suiza), a 95 V para el gel de concentración y 125 V para el gel de resolución. El peso de las proteínas de la mezcla antigénica fue estimado mediante el uso de un estándar de peso molecular (Perfect protein Markers Novagen® Merck Millipore), con pesos moleculares en el rango de 10-225 kDa. Los geles fueron coloreados con Coomassie Blue al 0,05%.

Contrainmunolectroforesis

La prueba de CIEF se efectuó de acuerdo al procedimiento descrito por Cornejo y col. (1993)⁽²²⁾. Las bandas de precipitación inespecíficas se eliminaron con citrato trisódico al 5%⁽²³⁾. Las láminas fueron después lavadas, secadas y teñidas con Amido Black 10B (Merck)⁽²²⁾.

Titulación del antígeno de *Bartonella*

La titulación del antígeno sonicado de *Bartonella* se realizó usando un suero de paciente (IMT/DAC 155-12/oct-2012), conteniendo anticuerpos anti-*Bartonella*, y proveniente de un paciente diagnosticado con enfermedad de Carrión a nivel clínico, microbiológico y molecular. Para su titulación el antígeno fue empleado sin diluir (1:1) y diluido en forma seriada al doble en solución salina amortiguada, y enfrentado con el suero de paciente sin diluir. El título del antígeno fue la inversa de la máxima dilución que produjo bandas de precipitación nítidas.

Determinación 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.

Evaluación de los sueros

Los sueros humanos fueron evaluados mediante la prueba de CIEF estandarizada, empleando el antígeno titulado.

Análisis de resultados

Para el análisis electroforético se construyó la curva estándar utilizando los valores de Rf y el logaritmo del peso molecular de las proteínas estándar. Para hallar los pesos moleculares de las pro-

teínas en estudio se interpoló los datos de los Rf de dichas proteínas en la curva estándar construida.

La CIEF se consideró positiva cuando se evidenció al menos una banda de precipitación luego de la coloración con el colorante Amido Black.

Análisis estadístico

Los cálculos para la determinación de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la prueba se realizaron de acuerdo a lo descrito por Fernández y col.⁽²⁴⁾.

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, según se muestra en la tabla 1.

El cultivo bacteriano del aislado de *Bartonella* (IMT/DAC 162-13/oct-2015) reveló colonias típicas del género. El frotis de estas colonias coloreadas con el colorante Leishman mostró la presencia de bacterias cocoides y cocobacilares. 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 el antígeno obtenido con un suero positivo.

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, tal como se muestra en la figura 1.

La concentración óptima del antígeno bacteriano en la prueba de CIEF fue 0,64 mg/mL. Figura 2.

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.

Los sueros de 60 pacientes con diagnóstico de enfermedad de Carrión fueron evaluados mediante la prueba de CIEF, de

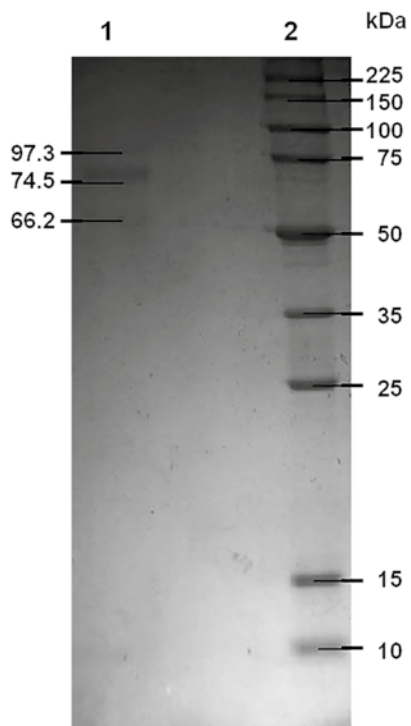


Figura 1. Análisis electroforético, SDS-PAGE al 12%, del sonicado de la cepa de *Bartonella* (IMT/DAC 162-13/oct-2015), utilizada como antígeno para la prueba de CIEF. Carril 1: las bandas mostradas corresponden a proteínas de 66,2 kDa, 74,5 kDa y 97,3 kDa; carril 2: marcador de peso molecular.

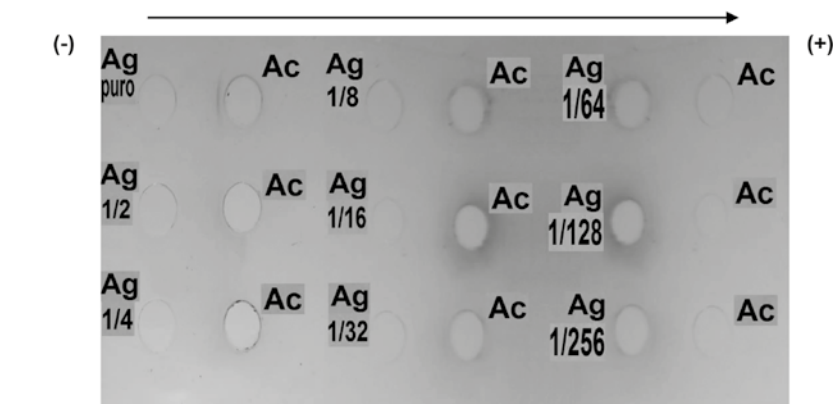


Figura 2. Titulación del antígeno bacteriano (IMT/DAC 162-13/oct-2015) utilizando el suero de paciente (IMT/DAC 155-12/ oct-2012), con diagnóstico clínico, microbiológico y molecular de enfermedad de Carrión. Se observa una banda de precipitación nítida solo con el antígeno no diluido (puro). La flecha superior indica la dirección del movimiento del antígeno (cátodo- ánodo).

los cuales 26 fueron positivos (Figura 3) 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 deter-

minar la especificidad de la prueba, de los cuales solo el suero proveniente de un paciente con hidatidosis fue positivo, siendo el resto de los sueros negativos. 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%.

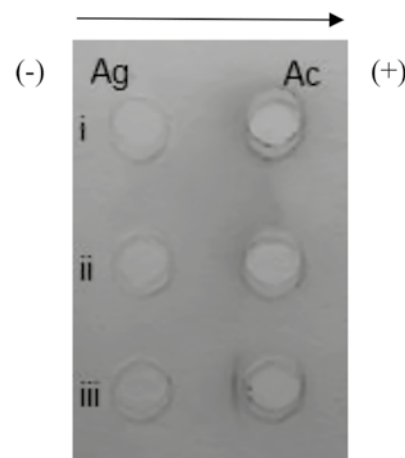


Figura 3. CIEF del suero (Ac) de pacientes (i, ii, iii) con diagnóstico bacteriológico y clínico de bartonelosis frente al antígeno (Ag) sonicado de *Bartonella* sp. Se observa una banda de precipitación entre el suero del paciente iii y el Ag, después de que la lámina fue coloreada. Se observan reacciones negativas para los otros dos sueros evaluados, i e ii. La flecha superior indica la dirección del movimiento del antígeno (cátodo- ánodo).

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes con diagnóstico bacteriológico y clínico de bartonelosis. Sueros del Laboratorio de la Enfermedad de Carrión del IMT/DAC UNMSM.

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

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⁽⁸⁾, principal método de diagnóstico en las zonas endémicas. 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*, *B. clarridgeiae*, *B. rochalimae*, *B. ancashensis* y *B. henselae*⁽²⁵⁾, 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⁽⁸⁾. 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^(22,26,27). La prueba es rápida y sencilla de realizar, requiere pequeños volúmenes de los reactivos y el antígeno debe ser soluble. Este estudio demostró que la prueba posee una elevada especificidad para detectar casos de infección por *Bartonella*, pero es poco sensible incluso en la etapa aguda de la enfermedad. Otras pruebas, como la IFI⁽¹⁴⁾ y el Western blot⁽¹⁷⁾ han revelado ser sensibles para el diagnóstico de la enfermedad de Carrión en esta etapa de la infección.

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⁽²⁸⁾. La obtención del antígeno, libre de componentes hemáticos de carnero, por sonicación, fue sencilla y rápida. Dos estudios previos habían reportado la obtención de antígeno sonicado de *B. bacilliformis* y su uso con éxito en pruebas serológicas primarias^(16,17), 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 66,2, 74,5 y 97,3 kDa. El aparente escaso número de bandas detectadas se puede deber al método de coloración del gel empleado, el Coomassie Blue, que es menos sensible que la coloración de plata⁽²⁹⁾. 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⁽³⁰⁾. Aunque son evidentes las 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, podría ser la banda de 74,5 kDa revelada en la SDS-PAGE. El uso de un estándar de peso molecular de amplio rango (10-225 kDa) pudo afectar la precisión de la determinación del peso

molecular. En cambio, Mallqui y col.⁽¹⁷⁾ reportaron siete antígenos inmunoreactivos de bajo peso molecular identificados por Western Blot, 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 utilizada en la CIEF fue menor a la reportada por Díaz y col.⁽³¹⁾, 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 obtenidas por sonicación y reveladas en la 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.⁽²²⁾, 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 reactivos.

La CIEF reveló 43,3% de sensibilidad para los casos de la infección por *Bartonella* sp., un valor superior al 27,8% y 33,7% obtenido por HAI e IFI, respectivamente, reportado por Knobloch y col.⁽¹³⁾ 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.⁽¹³⁾, Anaya y col.⁽¹⁶⁾ y Padilla y col.⁽³²⁾ reportaron una sensibilidad de 54,8%, 68,6% y 70,4%-85,2%, respectivamente; mientras que para el inmunoblot la sensibilidad re-

portada por Mallqui y col. fue de 70%⁽¹⁷⁾, un valor similar alcanzado por la IFI reportada por Chamberlin y col.⁽¹⁴⁾.

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 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^(14,17). 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. Asimismo, se desconoce si todas las proteínas de la suspensión sonicada migran al ánodo, de no ocurrir le restaría sensibilidad a la prueba.

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 bartonelosis. 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.⁽¹⁶⁾ 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. Asimismo, el inmunoblot para el diagnóstico de la enfermedad de Carrión desarrollado por Mallqui y col.⁽¹⁷⁾ 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⁽³³⁾. 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 con el antígeno bacteriano sonicado obtenido 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⁽⁶⁾.

La limitación más importante del estudio fue 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 podría deberse a la falta de sensibilidad propia de la prueba condicionada por la presencia de antígenos que carecen de migración anódica y no a la ausencia de anticuerpos, sea porque el paciente era seronegativo o por su deterioro debido al tiempo de almacenamiento. Otra limitación a resaltar fue el uso de sueros de pacientes con bartonelosis aguda o crónica no confirmada por métodos moleculares, lo que impide afirmar si la CIEF es género o especie específica. Asimismo, no se evaluó la especificidad de la prueba con muestras de suero de pacientes infectados con *Coxiella burnetii*, *Chlamydia trachomatis* y *Rickettsia rickettsii*, reportadas como causas de reacción cruzada con *B. henselae* y *B. quintana*^(34,35), 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, como la IFI⁽¹⁴⁾ o el Western blot⁽¹⁷⁾. Se requieren futuras investigaciones para evaluar el antígeno bacteriano sonicado obtenido en este estudio, en otras pruebas serológicas como el ELISA o el inmunoblot, con las cuales se podría lograr la detección de un mayor número de casos, y de esta forma evaluar su valor como antígeno específico.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Solano Mendoza (agradecimiento póstumo) por hacernos partícipes en la investigación de la enfermedad de Carrión, a la Lic. TM Pilar Alva Betallete por sus sugerencias y apoyo en la investigación realizada, a la Dra. Ruth García de la Guarda por su colaboración para la extracción de proteínas de *Bartonella*, al Q.F. Rubén Valdivieso Izquierdo por su apoyo en el dosaje de proteínas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blanco J, Raoult D. Enfermedades producidas por *Bartonella* spp. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23(5):313-20. DOI: 10.1157/13074971
2. Breitschwerdt EB. Bartonellosis, one health and all creatures great and small. *Vet Dermatol*. 2017; 28:96-e21. DOI: 10.1111/vde.12413
3. Minnick M, Anderson BE, Lima A, Battisti JM, Lawyer PG, Birtles RJ. Oroya fever and verruga peruana: bartonelloses unique to South America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:e2919. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002919
4. Sanchez Clemente N, Ugarte-Gil CA, Solórzano N, Magaña C, Pachas P, Blazes D, et al. *Bartonella bacilliformis*: a systematic review of the literature to guide the research agenda for elimination. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1819. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001819
5. Pons MJ, Gomes C, del Valle-Mendoza J, Ruiz J. Carrion's disease: more than a sand fly-vectored illness. *PLoS Pathog*. 2016;12(10):e1005863. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005863
6. Pachas P. Enfermedad de Carrión (Bartonellosis) en el Perú. Módulos Técnicos. Lima (Perú): Serie de Documentos Monográficos; 13. 2001. Ministerio de Salud. Oficina General de Epidemiología – Instituto Nacional de Salud.
7. Kosek M, Lavarello R, Gilman R, Delgado J, Magaña C, Verastegui M, et al. Natural history of infection with *Bartonella bacilliformis* in a nonendemic population. *J Infect Dis*. 2000;182(3):865-72. <https://doi.org/10.1086/315797>

8. Gomes C, Ruiz J. Carrion's Disease: the Sound of Silence. *Clin Microbiol Rev.* 2017;31(1): e00056-17. DOI: 10.1128/CMR.00056-17
9. Ventura G, Padilla C. Diagnóstico bacteriológico de la bartonelosis humana o enfermedad de Carrion. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Lima (Perú), 2006. Disponible en: <https://repositorio.ins.gob.pe/xmlui/bitstream/handle/INS/160/CNSP-0032.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [citado: ago. 2020].
10. del Valle Mendoza J, Silva W, Tinco C, Pons MJ, del Valle LJ, Champin D, et al. Diagnosis of Carrion's disease by direct blood PCR in thin blood smear negative samples. *PLoS One* 2014; 9:e92283. DOI: 10.1371/journal.pone.0092283
11. Smit PW, Peeling RW, Garcia PJ, Torres LL, Pérez-Lu JE, Moore D, et al. Dried blood spots for qPCR diagnosis of acute *Bartonella bacilliformis* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2013; 89(5):988-90. DOI: 10.4269/ajtmh.13-0246
12. Angkasekwinai N, Atkins EH, Johnson RN, Grieco JP, Ching WM, Chao CC. Rapid and sensitive detection of *Bartonella bacilliformis* in experimentally infected sand flies by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of the pap31 gene. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(12):e33342. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003342
13. 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):183-85.
14. 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 bartonelosis endemicity. *J Clin Microbiol.* 2000;38(11): 4269-271.
15. Gallegos K, Baldeviano C, Marcelo A, Padilla C. Clonamiento, expresión y seroreactividad del antígeno recombinante flagelina de *Bartonella bacilliformis*. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2005;22(1):39-46.
16. 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 Carrion. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2008;25(2):243-46.
17. Mallqui V, Speelman E, Verástegui M, Maguñá C, Pinell P, Lavarello R, et al. Sonicated diagnostic immunoblot for bartonelosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000;7(1):1-5. DOI: 10.1128/cdli.7.1.1-5.2000
18. Crowley AJ. *Immunodiffusion.* 2a. Ed. Elsevier Inc. 1973. 560 p. DOI: 10.1016/C2013-0-10551-X
19. 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.
20. Löwry O, Rosebrough N, Farr L, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
21. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-85. DOI: <https://doi.org/10.1038/227680a0>
22. Cornejo W, Nâquira F, Alva P. Evaluación de la contrainmunolectroforesis y la prueba de ELISA en el diagnóstico de fasciolosis experimental de ratones. *Rev Per Med Trop.* UNMSM. 1993;7(1): 53-9.
23. 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):275-287.
24. Fernández P, Pértegas S. Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña España. *Cad Aten Primaria.* 2003;10:120-124.
25. Rizzo MF, Osikowicz L, Cáceres AG, Luna-Caipio VD, Suarez-Puyen SM, Bai Y et al. Identification of *Bartonella rochalimae* in guinea pigs (*Cavia porcellus*) and fleas collected from rural peruvian households. *Am J Trop Med Hyg.* 2019;101(6):1276-1281. DOI: 10.4269/ajtmh.19-0517
26. Díaz A, Albas A, Valentini E, Perdomo G. Evaluación de la calidad de los reactivos que se utilizan en la técnica de contrainmunolectroforesis para la determinación de anticuerpos antirrábicos. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1991;33(1):44-9.
27. Popoff MR. Detection of Enterotoxin of *Clostridium perfringens*. En: *Encyclopedia of food microbiology.* 2a. Ed. Elsevier. 2014:474-480.
28. Lee C, Davidsohn I, Slaby R. Horse agglutinins in infectious mononucleosis. *Am J Clin Pathol.* 1968;49(1):3-11. DOI: 10.1093/ajcp/49.1.3
29. Sasse J, Gallagher SR. Staining proteins in gels. *Curr Protoc Immunol.* 2004; Capitulo 8: 8.9.1-8.9.25. DOI: 10.1002/0471142735.im0809s58
30. Knobloch J. Analysis and preparation of *Bartonella bacilliformis* antigens. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;9(2):173-78.
31. 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.
32. Padilla C, Gallegos K, Marcelo A, Chenet S, Baldeviano C. Expresión y serorreactividad de la lipoproteína recombinante de 43-kDa de *Bartonella bacilliformis*. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2006;23:182-87.
33. 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.
34. La Scola B, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. *J Clin Microbiol.* 1996;34(9):2270-4. DOI: 10.1128/JCM.34.9.2270-2274.1996
35. 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. DOI: 10.1128/JCM.35.9.2283-2287.1997