



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE MEDICINA HUMANA

**Desarrollo de una prueba inmunocromatográfica para la
detección rápida de *Bartonella bacilliformis***

Tesis para optar el título profesional de Médico Cirujano

Autores

Mazulis Aleman, Fernando David Martín ([0000-0002-4737-2894](tel:0000-0002-4737-2894))

Weilg Espejo, Ana Claudia ([0000-0002-6256-9062](tel:0000-0002-6256-9062))

Asesor de Tesis

Juana del Valle Mendoza ([0000-0002-6011-5040](tel:0000-0002-6011-5040))

Lima, 13 de Julio de 2017

A nuestros seres queridos, por su incondicional apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Cláudia Gomes del ISGlobal, Barcelona Ctr. Int. Health Res. (CRESIB), Hospital Clínic - Universitat de Barcelona, Barcelona, España, por proporcionarnos la proteína GroEL.

Al equipo de investigación del laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación e Innovación de la UPC y al laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigación Nutricional.

Tabla de Contenido

INTRODUCCIÓN	8
OBJETIVOS	11
OBJETIVO GENERAL:	11
OBJETIVOS ESPECIFICOS:.....	11
HIPÓTESIS.....	11
METODOLOGÍA.....	12
CULTIVO MICROBIOLÓGICO DE <i>BARTONELLA BACILLIFORMIS</i>	12
DETECCIÓN DE <i>BARTONELLA SPP.</i> POR LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR) CONVENCIONAL	12
DETECCIÓN DE <i>BARTONELLA BACILLIFORMIS</i> POR LA TÉCNICA DE PCR A TIEMPO REAL	13
OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA GROEL DE <i>BARTONELLA BACILLIFORMIS</i> PARA INMUNIZACIÓN.....	13
PRODUCCION DE ANTICUERPOS.....	14
IMPLEMENTACIÓN DE LA INMUNOCROMATOGRAFÍA PARA LA DETECCIÓN DE <i>BARTONELLA BACILLIFORMIS</i>	16
RESULTADOS	21
CULTIVO MICROBIOLÓGICO DE CEPAS CLÍNICAS.....	21
PCR CONVENCIONAL PARA <i>BARTONELLA SPP.</i>	21
PCR REAL TIME PARA <i>BARTONELLA BACILLIFORMIS</i>	21
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS – PAGE)	22
IMPLEMENTACIÓN DE LA PRUEBA INMUNOCROMATOGRÁFICA.....	22
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIÓN	28
REFERENCIAS	29
ANEXOS	34

Resumen

Desarrollo de una prueba inmunocromatográfica para la detección rápida de

Bartonella bacilliformis

Antecedentes: La Enfermedad de Carrión es una patología importante que requiere un diagnóstico precoz para su manejo a fin de disminuir la morbimortalidad de la misma.

Objetivo: Desarrollar una prueba inmunocromatográfica para la detección rápida de *Bartonella bacilliformis* usando anticuerpos policlonales de conejo etiquetados con oro coloidal.

Metodología: Los anticuerpos policlonales contra *Bartonella bacilliformis* fueron obtenidos mediante la inmunización de conejos con la proteína GroEL de *Bartonella bacilliformis*. Se utilizó oro coloidal de 40 nm para la conjugación el anticuerpo primario obtenido. La sensibilidad analítica se evaluó con diferentes concentraciones de *B. bacilliformis* incluidas en un rango de 1×10^1 UFC/mL a 1×10^5 UFC/mL. La especificidad analítica o reacción cruzada se analizó con microorganismo de diferentes especies, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Candida* spp.

Resultados: Las concentraciones óptimas del anticuerpo de captura y el anticuerpo de revestimiento (línea T) fueron de 2 mg/mL y 0.2 mg/mL respectivamente. Se determinó que la sensibilidad analítica de la prueba se encuentra en un rango de 1×10^2 UFC/mL y 1×10^1 UFC/mL. No se evidenciaron reacciones cruzadas con los microorganismos evaluados. Se determinó que el tiempo de corrida óptimo para el registro de resultados es de 20 minutos y el volumen mínimo requerido de la muestra analizada fue de 50 μ L.

Conclusión: Se desarrolló la primera prueba inmunocromatográfica para la detección rápida, sensible y específica de *Bartonella bacilliformis* utilizando anticuerpos policlonales contra la proteína GroEL, la cual deberá ser validada mediante estudios posteriores.

Palabras clave: GroEL, *Bartonella bacilliformis*, inmunocromatografía.

Abstract

Development of an immunochromatographic assay for the rapid detection of

Bartonella bacilliformis

Background: Carrión's disease is an important disease that requires a timely diagnosis and management to reduce its morbimortality.

Objective: Develop a lateral flow assay for the rapid detection of *Bartonella bacilliformis* using colloidal gold-labeled rabbit polyclonal antibodies.

Materials and methods: Polyclonal antibodies against *Bartonella bacilliformis* were produced by the immunization of rabbits with GroEL protein purified from *Bartonella bacilliformis*. Colloidal gold of 40 nm was used for the conjugation process with the rabbit polyclonal antibodies. The analytical sensitivity was evaluated by testing solutions of *B. bacilliformis* with different concentrations ranging between 1×10^1 to 1×10^5 CFU/mL. Analytical specificity was determined by testing cross-reactivity with microorganisms from different species, including *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Candida* spp.

Results: The optimal concentrations for the capture antibody and the coating antibody (T-line) were 2 mg / mL and 0.4 mg / mL, respectively. The analytical sensitivity was determined to be between 1×10^2 CFU/mL and 1×10^1 CFU/mL. There were no cross-reactions observed with the groups of bacteria used in this study. We determined that the flowing time and volume required for an optimum signal to be generated was 20 minutes and 50 μ L, respectively.

Conclusions: We developed the first gold-based lateral flow assay for the rapid, sensitive and specific detection of *Bartonella bacilliformis* using polyclonal antibodies against the protein GroEL, which needs to be validated in future studies.

Key words: GroEL, *Bartonella bacilliformis*, Lateral flow assay.

1. INTRODUCCIÓN

Bartonella bacilliformis es un cocobacilo aerobio, gram negativo, intracelular facultativo causante de la Enfermedad de Carrión, la cual es una patología emergente que afecta a comunidades andinas de Perú y otros países de Sudamérica como Ecuador y Colombia [1].

La Enfermedad de Carrión es transmitida por el vector *Lutzomya verrucarum* y posee dos periodos clínicos definidos: la Fiebre de la Oroya y la Verruga Peruana [2]. Sin embargo, pueden presentarse otras formas clínicas como la bacteriemia asintomática, Verruga Peruana aislada o enfermedad verrucosa recurrente [3]. Se ha descrito un periodo de incubación de la enfermedad que oscila entre 1 y 30 semanas, con un promedio de 8 semanas [4]. Durante la Fiebre de la Oroya, fase aguda o hemática, las características clínicas más comunes son la fiebre, palidez, malestar, hepatomegalia indolora y linfadenopatía [5]. Asimismo, los pacientes presentan niveles variables de anemia debido a la invasión masiva de los eritrocitos por el agente causal [6], lo que genera un cuadro de anemia hemolítica e inmunosupresión transitoria. Esta primera fase, sin tratamiento, posee una alta mortalidad que oscila entre el 40% y 88%, afectando principalmente a los niños menores de 5 años [5,7]. Aquellos que sobreviven a la fase aguda pueden desarrollar la fase crónica o verrucosa de la Enfermedad de Carrión, la cual ocurre después de un período intercalar asintomático que se caracteriza por la desaparición la fiebre, ausencia de hemólisis y la disminución de la densidad bacteriana circulante [8]. Habitualmente el periodo intercalar es asintomático y dura de 1 a 3 semanas, aunque puede llegar a durar varios meses [8, 9]. Posteriormente, aparece la fase crónica, eruptiva, también conocida como Verruga Peruana, la cual se caracteriza por

lesiones verrucosas de características similares a un hemangioma, pruriginosas, que sangran fácilmente con una localización generalmente en miembros superiores, inferiores y el rostro, y pueden ser de tres tipos: miliar, nodular y mular [2,10]. Dichas lesiones se acompañan de dolor óseo, pueden desaparecer después de varias semanas o hasta 6 meses sin dejar cicatriz [10] y se observan con mayor frecuencia en niños que viven en áreas endémicas [9].

El diagnóstico en cualquiera de sus fases es clínico y se confirma por métodos de laboratorio como el frotis de sangre periférica, hemocultivo, anatomía patológica y técnicas de biología molecular, siendo las dos primeras las aplicadas en el campo [11]. Actualmente, los programas de vigilancia epidemiológica utilizan como métodos diagnósticos principales el frotis en sangre periférica y el cultivo, por ser técnicas de fácil aplicación en zonas endémicas. Sin embargo, poseen bajos niveles de especificidad y sensibilidad, respectivamente [12].

Se ha desarrollado la técnica de PCR mediante la amplificación de un fragmento específico del gen *Bartonella 16S rRNA*, que ha demostrado tener una sensibilidad y especificidad del 100% para la detección de *Bartonella* spp. [12]. Sin embargo, las localidades endémicas para la Enfermedad de Carrión carecen de infraestructura y personal capacitado para el desarrollo de estas pruebas, por lo que no se ha logrado implementar esta técnica como parte del programa de vigilancia epidemiológica.

Debido a los brotes ocurridos durante los últimos años y la probable subestimación del número de casos debido a las limitaciones que poseen los métodos diagnósticos usados en las zonas endémicas en la actualidad [13], es necesario diseñar pruebas diagnósticas sensibles, específicas y de bajo costo que puedan aplicarse en áreas endémicas. Una

alternativa ampliamente usada en el diagnóstico de otras patologías infecciosas son las pruebas serológicas [14]. En las últimas décadas, se han descrito diversos antígenos esperando que posean la inmunogenicidad suficiente para obtener una adecuada sensibilidad en pruebas serológicas y que sean específicos para *Bartonella bacilliformis*. Entre ellos, la proteína GroEL, la cual posee actividad mitogénica a diferencia de sus análogos presentes en otras bacterias como *Escherichia coli* [15]. Además se han implementado pruebas de ELISA [16, 17] e IFI [18] obteniéndose valores de sensibilidad y especificidad > 80%. Sin embargo, aún con buenos resultados, las pruebas antes mencionadas no pueden ser aplicadas para el diagnóstico de la Enfermedad de Carrión en campo debido a que no son pruebas validadas y su uso requiere de equipamiento y personal especializado.

Por otro lado, existen otros métodos diagnósticos basados en la interacción antígeno-anticuerpo que son idóneos para su aplicación en zonas endémicas. La inmunocromatografía, también conocida como “prueba rápida”, es una prueba que permite la identificación de un antígeno reconocido por un anticuerpo marcado con oro coloidal, el cual es detectado por un anticuerpo secundario inmovilizado en una membrana de nitrocelulosa [19]. Esta técnica es una prueba rápida, de fácil ejecución e interpretación, de bajo costo, que no requiere instrumental de laboratorio sofisticado, ni personal altamente capacitado [20 21].

La Enfermedad de Carrión es una patología de notificación obligatoria nacional, requiere de métodos diagnósticos que cumplan con las características antes mencionadas. Por este motivo, el presente trabajo tiene como objetivo el desarrollo de una prueba inmunocromatográfica que permita la detección rápida de *Bartonella bacilliformis*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

Desarrollo de una prueba diagnóstica basada en el método de inmunocromatografía para la detección de *Bartonella bacilliformis*.

2.2 Objetivos específicos:

- Producción y purificación de anticuerpos policlonales de conejo contra la proteína GroEL de *Bartonella bacilliformis*.
- Implementación de la prueba inmunocromatográfica para la detección de *Bartonella bacilliformis*.

2.3 HIPÓTESIS

La prueba de inmunocromatografía desarrollada será capaz de detectar la presencia de la bacteria *Bartonella bacilliformis* con un límite de detección aceptable y sin presentar reacciones cruzadas.

3. METODOLOGÍA

3.1 Cultivo microbiológico de *Bartonella bacilliformis*

La cepa CIP 77.27 ATCC4 fue adquirida del Instituto Pasteur de Francia (Lab. Ident. Inst. Pasteur, Paris, France). La cepa fue cultivada en agar Columbia suplementado con 10% de sangre de cordero desfibrinada en condiciones de anaerobiosis controlada a 28°C durante 30-60 días. Posteriormente, las colonias fueron cultivadas en medio líquido para lo cual se utilizaron frascos de cultivo estériles que contenían 10 ml de medio *Brain Heart Infusion* (BHI) líquido e incubadas en condiciones de anaerobiosis controlada a 28°C durante 45 días [12]. Las colonias fueron identificadas acorde a su morfología, tinción gram y PCR convencional y a tiempo real para confirmar la presencia de *Bartonella bacilliformis*.

3.2 Detección de *Bartonella* spp. por la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) convencional

Se amplificó un fragmento de 328pb del gen 16S rRNA para *Bartonella* spp. Para lo cual se utilizó cebadores específicos descritos por Garcia-Esteban et al. [22] El volumen final de la mezcla de PCR fue 50 µl, distribuido de la siguiente manera: 25 µl de la mezcla enzimática (Taq polimerasa, 2.5mM MgCl₂, 15 mM Tris/HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 200 µM de cada desoxinucleótido), 20 pmol de cada cebador (Macrogen, Seoul, Korea), 5 µl del ADN extraído y agua estéril a un volumen final de 50 µl. Las condiciones de reacción fueron 95°C por 10 min, seguido de 45 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y

72°C por 1 minuto, con una elongación final de 10 minutos a 72°C. Los productos amplificados de ADN fueron analizados por electroforesis en gel con gel de agarosa al 2% (FMC, Rockland, ME) que contiene bromuro de etidio (3 mg/L). Posteriormente los amplicones son purificados y enviados a secuenciar a Macrogen (Korea) para su confirmación.

3.3 Detección de *Bartonella bacilliformis* por la técnica de PCR a Tiempo Real

La muestra fue analizada por PCR a tiempo real para confirmar la presencia de *Bartonella bacilliformis*. Para lo cual se utilizó cebadores específicos descritos por Li et al. [23]. Se aisló el ADN del cultivo bacteriano haciendo uso del Kit comercial (*High Pure Kit Preparation template*, Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Para la PCR se utilizó 25 µl enzima ready mix (Taq polymerase, 2.5 mM MgCl₂, 15 mM Tris / HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 200 µM de cada desoxinucleótido), 20 pmol de cada cebador (Macrogen, Seoul, Korea), 5 µl de Sonda y 5 µl de ADN extraído. Las condiciones de reacción fueron 95°C por 30 segundos, seguido de 45 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 10 segundos y 72°C por 20 segundos, con una elongación final de 30 segundos a 72°C. Las muestras fueron procesadas en el equipo *Light cycler 2.0* (Roche Diagnostic).

3.4 Obtención de la proteína GroEL de *Bartonella bacilliformis* para inmunización

La proteína purificada GroEL fue diseñada y obtenida proporcionada por el laboratorio de microbiología del ISGlobal, Barcelona Ctr. Int. Health Res. (CRESIB), Hospital Clínic - Universitat de Barcelona, Barcelona, España.

3.5 Producción de anticuerpos

3.5.1 Inmunización de conejos con antígenos seleccionados

Conejos de raza Nueva Zelanda adultos de aproximadamente 2 Kg de peso corporal fueron adquiridos comercialmente del Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú. Los conejos se aclimataron en un bioterio durante dos semanas antes de llevar a cabo el protocolo de inmunización. Los conejos fueron inmunizados teniendo en cuenta las recomendaciones descritas por Stills [24] y Schunk et al. [25]. En cada inmunización se inyectó 100 µg de los antígenos en estudio mencionado en los pasos anteriores. Un mismo volumen (0.5 ml) de la suspensión de antígeno y adyuvante fue mezclado vigorosamente hasta formar la emulsión de agua en aceite y la mezcla fue inmediatamente administrada a los conejos. El adyuvante completo de Freund fue utilizado en la primera inmunización para inducir una reacción humoral y en posteriores inmunizaciones se utilizó el adyuvante de Freund incompleto. En la semana 0, cada conejo fue inoculado subcutáneamente en múltiples sitios con un volumen total antígeno de 1 mL. Dos inmunizaciones posteriores con el mismo volumen de antígeno fueron inyectadas a los conejos por vía intramuscular en la semana 2 y 4 (**Tabla 1**).

3.5.2 Evaluación de reactividad de los anticuerpos en suero de conejo

Se evaluó la presencia de anticuerpos en el suero de conejo semanalmente, mediante las técnicas de inmunoprecipitación y la técnica de aglutinación. Se pudo apreciar un incremento progresivo de la aglutinación en relación a la producción de anticuerpos contra los antígenos en estudio. El método de inmunodifusión radial fue utilizado para

evaluar objetivamente la formación del inmunocomplejo entre el anticuerpo policlonal de conejo y anticuerpo policlonal IgG anti-conejo.

3.5.3 Obtención y purificación de anticuerpos policlonales contra GroEL

De cada conejo, se obtuvo 2 mL de sangre en tubos tipo *Vacurette® TUBE Serum Separator Clot Activator* (Vacurette, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) mediante venopunción lateral de la vena marginal de la oreja, este procedimiento se realizó cada semana posterior a la inmunización. El suero fue separado mediante centrifugación a 1.500g durante 2 minutos y posteriormente se evaluó el título de anticuerpos frente a *B. bacilliformis* mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IGDA) siguiendo el procedimiento previamente descrito por (Simard et al. [26]. Las muestras de suero de conejo fueron almacenadas a -20 °C para los análisis posteriores. Los anticuerpos policlonales IgG obtenidos fueron purificados a partir de muestras de suero de los conejo mediante un kit comercial de purificación específica (*Melon Gel IgG Purification Kit*; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). El procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5.4 Análisis en anticuerpos obtenidos por electroforesis en gel de poliacrilamida

Para confirmar la presencia de IgG en el paso previo, se analizaron las fracciones de anticuerpo obtenidas a partir del proceso de purificación. Estas fueron analizadas mediante electroforesis Bis-acrilamida, seguido de la tinción Coomassie® azul brillante G250.

3.5.5 Cuantificación de la producción de anticuerpo

Las concentraciones de las fracciones de anticuerpos purificados fueron determinadas usando el fluorospectrometro NanoDrop 3300 (ThermoScientific Fisher) siguiendo instrucciones del fabricante.

3.6 Implementación de la inmunocromatográfica para la detección de *Bartonella bacilliformis*

3.6.1 Determinación de la concentración óptima del anticuerpo de captura

Un volumen de 50 μ L de las fracciones con diferentes concentraciones de anticuerpos IgG policlonales de conejo purificados, fueron utilizados para evaluar la estabilidad del oro coloidal durante el proceso de conjugación. La concentración máxima que se identificó previa a la desestabilización del oro coloidal de 40 nm fue de 2 mg/mL. Las concentraciones mayores a esta cambiaron el color de la solución de oro coloidal de rojo a azul grisáceo, demostrando una precipitación por desestabilización. Se decidió utilizar una concentración de anticuerpo de 0.2 mg/mL ya que concentraciones mayores no presentaron cambios en el color de la solución.

3.6.2 Determinación de pH óptimo del conjugado anticuerpo policlonal-oro coloidal

Se realizó la estandarización del pH del conjugado con una solución de anticuerpos policlonales IgG con una concentración de 0.2 mg/mL y el oro coloidal de 40 nm. Se crearon diferentes alícuotas de la solución de conjugado y se varió el pH con HCl y

Na²OH. La precipitación del oro coloidal se evidenció como un cambio del color de la solución hacia azul grisáceo. Se determinó que el pH óptimo se hallaba entre 8 y 9, puesto que no se evidenció cambio de color del oro coloidal dentro de estos límites.

3.6.3 Preparación del conjugado con anticuerpo policlonal IgG y el oro coloidal

Utilizamos una solución de oro coloidal de 40 nm (Sigma-Aldrich, USA) para este procedimiento. El pH fue ajustado a 8.5 con HCl considerando el pH óptimo previamente establecido. Se mezcló manualmente 110 µL del anticuerpo policlonal IgG anti-groEL de conejo con una concentración de 0.2 mg/mL y 1 mL del oro coloidal 40 nm durante 30 minutos. Se agregó 110 µL de solución bloqueadora SeaBlock (Abcam, USA) a la solución y posteriormente fue centrifugada a 12,000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante fue removido y el material precipitado fue resuspendido con 1 mL de buffer de suspensión (0.01 mol/L de Tris-HCl (pH 8.5), 2% Albúmina de Suero Bovino (BSA), 5% sucrosa). La solución fue centrifugada a 12,000 x g, a 4°C durante 30 minutos y el precipitado fue resuspendido con 1 mL de buffer de suspensión. La solución fue centrifugada 12,000 x g, a 4°C durante 30 minutos y el precipitado fue resuspendido con 500 µL de buffer de suspensión. Finalmente, la muestra fue centrifugada de 1000 x g, a 4°C durante 4 minutos, el sobrenadante fue colectado y almacenado 4°C.

3.6.4 Preparación de la concentración óptima del anticuerpo de revestimiento (Línea T)

Se utilizaron 4 concentraciones diferentes de las fracciones purificadas de los anticuerpos policlonales IgG anti-groEL para determinar la concentración óptima del anticuerpo de revestimiento de la línea T. Las concentraciones utilizadas para determinar la

concentración óptima del anticuerpo fueron: 1.0, 0.6, 0.4, 0.3, 0.2 mg/mL. Se utilizó una membrana de nitrocelulosa con una porosidad de 45 μm (Abcam, USA). Los anticuerpos fueron transferidos manualmente con una pipeta a la membrana de nitrocelulosa con un volumen 3 μL para formar las líneas T. Se evidenció que la señal generada aumentó con la concentración del anticuerpo utilizado y se determinó que la concentración óptima del anticuerpo de revestimiento sea de 0.4 mg/mL ya que no se evidenció aumento en la intensidad de la línea T con concentraciones mayores.

3.6.5 Ensamblaje de la tira inmunocromatográfica

El material utilizado para la prueba inmunocromatográfica fueron una membrana de nitrocelulosa con porosidad de 45 μm (Abcam, USA), una almohadilla absorbente CF5 (GE Healthcare, USA), una almohadilla de conjugado Fusión 5, (GE Healthcare, USA), y una base de PVC (Abcam, USA). El anticuerpo monoclonal de cabra anti-IgG de conejo y el oro coloidal de 40 nm fueron obtenidos del laboratorio Abcam. La línea Test y la línea Control tuvieron una separación de 8 mm y cada tira fue cortada con 4 mm de ancho y 4,0 cm de largo. Para la línea control, utilizamos un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo (**Figura 1A, 1B**).

La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con la solución bloqueadora, Tampón Fosfato Salino (PBS) (Abcam, USA) por 1 hora y posteriormente se lavó con PBS. La membrana bloqueada se secó en un horno estéril a 37°C durante 30 minutos. Finalmente se adhiere una membrana absorbente a la tira bloqueada en un extremo.

Los resultados positivos se evidencian cuando la línea Test y la línea control se tiñen después de agregar 50 µL de diferentes concentraciones solución bacteriana sonicada de la cepa CIP 77.27 de *B. bacilliformis* en goteo sobre la almohadilla de muestra. Las muestras negativas no tiñeron la línea T pero si la línea de control. La prueba fue inválida si no se evidencia ninguna tinción, si solo se tiñe la línea T, o solo la línea C (**Figuras 1 y 2**).

3.6.6 Determinación de sensibilidad analítica de inmunoanálisis de flujo lateral

Se realizó el cultivo de la cepa CIP 77.27 de *B. bacilliformis* en un medio de agar Columbia suplementado con 10% de sangre de cordero e incubado a 28°C por 45 días bajo condiciones anaeróbicas. Las placas fueron inspeccionadas visualmente durante 24, 48, 72 horas para detectar contaminación y una vez a la semana para evaluar crecimiento bacteriano. Las colonias fueron seleccionadas y colocadas en una solución estéril con PBS 1X. La solución bacteriana inicial tuvo una concentración de 1×10^5 UFC/mL aproximado según la escala de McFarland. Esta solución bacteriana fue diluida de manera seriada con PBS 1x hasta obtener 4 alícuotas con diferentes concentraciones. Se prepararon 5 tiras con las condiciones óptimas establecidas. Se agregó 50 µL de cada alícuota bacteriana con diferente concentración en la almohadilla de muestra de cada tira y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de realizar la lectura.

3.6.7 Determinación de la especificidad analítica

La especificidad analítica o reacción cruzada se probó con microorganismo de diferentes especies, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Candida* spp.

Se colocaron 50 μ L de solución bacteriana y del hongo y se evaluaron los resultados después de 20 minutos.

3.6.8 Evaluación de la estabilidad de la tira inmunocromatográfica

La estabilidad de las tiras inmunocromatográficas fue evaluada utilizando una tira tratada con las condiciones previamente establecidas y colocándola en un horno estéril a 37°C durante 30 días. Se evaluó la intensidad de la señal generada en las líneas test y control al colocar 50 μ L de la solución bacteriana sin diluir.

4. RESULTADOS

4.1 Cultivo microbiológico de cepas clínicas

El crecimiento bacteriano fue evaluado de manera macroscópica. Se observaron colonias pequeñas puntiformes de bordes definidos y translúcidos (**Figura 3**).

4.2 PCR convencional para *Bartonella spp.*

La cepa CIP 77.27 se sometió a diagnóstico por PCR convencional para *Bartonella spp.*, como control positivo (CP) se utilizó ADN de *B. bacilliformis* previamente secuenciado y como control negativo (CN) se utilizó agua estéril. Se observó que el cultivo de la cepa CIP 77.27 fue positiva obteniéndose un amplicón de 438pb (**Figura 4**).

4.3 PCR Real Time para *Bartonella bacilliformis*

Para confirmar la presencia de *Bartonella bacilliformis* se realizó la PCR a tiempo real. Los resultados muestran que CIP 77.27 fue positiva para *Bartonella bacilliformis* con un ciclo límite (inglés: *Crossing point-PCR-cycle, Treshold cycle*) de 31,04 ciclos y una pendiente de 4,85. El control positivo tuvo un ciclo límite de 27,50 ciclos y una pendiente de 5,00, mientras que el control negativo arrojó un resultado negativo descartando contaminación durante el proceso (**Figura 5**).

4.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS – PAGE)

Se corrió las muestras en el gel de poliacrilamida, observándose la presencia de fracciones de 50 kDa y 23 kDa, correspondiente a las cadenas pesadas y ligeras de IgG. (**Figura 6**)

4.5 Implementación de la prueba inmunocromatográfica

4.5.1 Determinación de volumen óptimo para generación de señal

El volumen óptimo que se determinó para obtener una buena señal en las líneas T y la línea de control y permitir el flujo óptimo del analito fue de 50µL

4.5.2 Determinación de tiempo mínimo de generación de señal

El tiempo que se determinó para obtener una señal óptima de los resultados de la tira inmunocromatográfica después de aplicar el analito en la almohadilla de muestra fue de 20 minutos.

4.5.3 Sensibilidad analítica de la prueba de inmunocromatografía

La evaluación de sensibilidad analítica de la tira se llevó a cabo usando una solución bacteriana de *B bacilliformis* (CIP 77.27) con una concentración aproximada de 1×10^5 UFC/mL según la escala de McFarland. Posteriormente esta solución fue diluida x10 con PBS. El control negativo se evaluó usando solamente PBS 1X.

Demostramos que la sensibilidad analítica de esta prueba se encuentra entre 1×10^2 UFC/mL y 1×10^1 UFC/mL (**Figura 7**).

4.5.4 Especificidad analítica de la prueba de inmunocromatografía

Para determinar la especificidad de la prueba se evaluó la prueba optimizada con dos soluciones bacterianas. No se evidenciaron reacciones cruzadas con las bacterias mencionadas. (**Figura 8**).

4.5.5 Estabilidad de la prueba

La estabilidad de las tiras inmunocromatográficas fue evaluada con una tira que se mantuvo en 37°C por 1 mes. Se evidencio que la línea T presentó una buena señal; sin embargo, se evidencia una debilidad de la señal en la línea de control (**Figura 9**).

5. DISCUSIÓN

En la actualidad, los métodos diagnósticos de los que disponemos para utilizar en el campo son el frotis de sangre periférica y el cultivo; sin embargo, ambos poseen limitaciones que no permiten el diagnóstico temprano y, por lo tanto, el manejo oportuno de una patología con niveles importantes de mortalidad como la Enfermedad de Carrión [27]. El frotis de sangre periférica es una técnica operador dependiente, tiene una sensibilidad que oscila entre el 24% y 36% según fue reportado por Pachas et al. [28] y Ellis et al. [30], respectivamente. El valor de sensibilidad es bajo para los requerimientos en zonas endémicas, ya que muchas veces estas localidades también son endémicas de otras patologías y la primera fase de la Enfermedad de Carrión puede ser indistinguible de otros procesos febriles que también requieren un diagnóstico temprano y oportuno. Por otro lado, el cultivo posee la ventaja de tener una alta especificidad (97,8% si se compara con PCR *16S rRNA-Bartonella*), motivo por el cual es considerado el *gold standard*; sin embargo, se reporta una sensibilidad del 50% [12] debido a que *Bartonella bacilliformis* requiere condiciones microbiológicas exigentes con un periodo de crecimiento de 2 a 6 semanas y posee una tasa de contaminación de cultivo que oscila entre el 7 y 20% [30].

En las últimas décadas, se han descrito antígenos como GroEl [31], [32], Pap31 [33], la lipoproteína recombinante de *B. bacilliformis* (rBbLppB) [16] y, los más recientes, succinil-coA sintetasa subunidad alfa y beta [33], esperando que posean la inmunogenicidad suficiente para obtener una adecuada sensibilidad en pruebas serológicas y que sean específicos para *Bartonella bacilliformis*. Un ensayo con anticuerpos fluorescentes indirectos

(IFI) permitió la detección de anticuerpos contra *B. bacilliformis* en pacientes en fase aguda confirmados, con una sensibilidad de hasta 82%. El mismo estudio mostró que ésta técnica detecta el 93% de casos de bartonelosis en fase convaleciente [18] Adicionalmente, se ha descrito un procedimiento de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) empleando la lipoproteína de 43-kDa de *B. bacilliformis* obtenida en su forma recombinante (rBbLppB) con una sensibilidad de hasta 85% y especificidad de 90% [16]. Asimismo, se ha probado un ELISA indirecto de lisado total de *B. bacilliformis* y este estudio mostró una sensibilidad de 68% y una especificidad de 94.1% [17]. Sin embargo, aún con resultados prometedores, las técnicas mencionadas no son idóneas para ser usadas como herramientas en el diagnóstico de la Enfermedad de Carrión en el campo debido a que no son pruebas validadas o específicas y su uso requiere de personal especializado usualmente carente en zonas endémicas.

A pesar de que el diagnóstico de la Enfermedad de Carrión en cualquiera de sus fases es principalmente clínico, una prueba diagnóstica rápida y económica como la inmunocromatografía que permita la detección temprana de la Enfermedad de Carrión en áreas geográficas en las que no se cuenta con laboratorios es una necesidad insatisfecha. En el presente trabajo, se desarrolló una prueba rápida para el diagnóstico de Bartonelosis a partir de anticuerpos anti-GroEL de conejo, la cual demostró tener una sensibilidad analítica que se encuentra entre 1×10^2 UFC/mL y 1×10^1 UFC/mL. El prometedor límite de detección podría deberse a que la proteína GroEL es un factor de virulencia localizado en fracciones solubles e insolubles que incluyen a la membrana interna y externa de la célula y es una proteína excretada activamente por *Bartonella bacilliformis* [35]. Además, GroEL ha sido identificado por métodos bioquímicos e inmunológicos como participante en el aumento de mitogenicidad en células endoteliales humanas de la vena umbilical (HUVECs por sus siglas en inglés

Human Umbilical Vein Endothelial Cell) [35], [36]. Asimismo, se ha probado que la transcripción del operón GroESL de *Bartonella bacilliformis* es inducida por el estrés térmico al que es expuesta la bacteria in vitro, lo cual podría asemejarse a las condiciones por las que atraviesa durante la transmisión del patógeno del vector al hospedero y durante la fase inicial de la enfermedad [36].

Por otro lado, se halló una alta especificidad analítica para la prueba debido a que no reaccionó con las bacterias que se utilizaron en este estudio, que incluyen: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Chlamydomphila pneumonia* y *Candida* spp. A pesar de que las proteínas GroEL pertenecen a la familia de las chaperonas y, por ende, están presentes en un gran número de bacterias, no comparten la misma secuencia de aminoácidos. En un estudio previo, se secuenció la proteína GroEL de *Escherichia coli* y la de *B. bacilliformis*, y se halló que solo comparten un 66% de la secuenciación genética [36]. Además, no obstante no se haya logrado probar la especificidad analítica con *Bartonella henselae* y *B. quintana*, se estima que la prueba de inmunocromatografía implementada también podrá distinguir entre estos patógenos. En el estudio mencionado, se comparó también la similitud entre el operón GroESL de *B. bacilliformis*, *B. quintana* y *B. henselae*, y se halló que sólo comparten un 89% de la secuencia [36]. Otro motivo por el que se espera se pueda confirmar que no haya reacción cruzada entre estos patógenos en estudios posteriores, es que se sabe que *B. bacilliformis* produce un mitógeno proteico que actúa en las HUVECs en forma dosis-dependiente, con una actividad máxima a partir de las 72 horas de exposición, resultando en un aumento de hasta 20 veces el número inicial de células. En el caso de *B. henselae*, a pesar de poseer cierta actividad mitógena para HUVECs, solo incrementó el número celular en 2 veces [35]. Además, se halló un pequeño marco abierto de lectura (ORF por sus siglas en inglés; *Open*

Reading Frame) en el gen GroESL, el cual está ausente en *B. quintana* y *B. henselae* y se estipula que los aminoácidos traducidos a partir de este puedan ser los que confieran la alta actividad mitogénica atribuida a la proteína GroEL de *Bartonella bacilliformis* [36] y probablemente configuren la porción de GroEL que posee la inmunogenicidad necesaria para producir la respuesta inmunológica que ha permitido el desarrollo de la inmunocromatografía del presente estudio.

La prueba de inmunocromatografía para la detección del patógeno causante de la Enfermedad de Carrión desarrollada en el presente trabajo representa un gran avance en el ámbito diagnóstico de esta patología. Abre las puertas a la investigación para su perfeccionamiento, posterior comparación con otros métodos diagnósticos y validación, de manera que pueda ser utilizada en el primer nivel de atención como parte de los programas de vigilancia epidemiológica.

El presente trabajo tiene como limitación principal la necesidad de estudios posteriores en los que se mida el desempeño de la prueba inmunocromatográfica desarrollada con sueros de pacientes con síndrome febril, de manera que, a partir de ello, se pueda optimizar la prueba para lograr su validación.

6. CONCLUSIÓN

La prueba de inmunocromatografía desarrollada en el presente trabajo es la primera realizada para la detección de *Bartonella bacilliformis* y posee una sensibilidad analítica importante, a partir de la cual se puede iniciar su validación con sueros de pacientes para la posterior determinación de la sensibilidad y especificidad estadística.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

El presente proyecto fue financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú), Contrato N° 117-PNICP-PIAP-2015. Proyecto: “Producción de un inmunógeno para el diagnóstico de la Enfermedad de Carrión”, el cual fue presentado y aprobado por dicha institución.

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de interés para la realización del presente proyecto.

REFERENCIAS

1. Sanchez Clemente N, Ugarte-Gil C, Solórzano N, Maguiña C, Pachas P, Blazes D et al. Bartonella bacilliformis: A Systematic Review of the Literature to Guide the Research Agenda for Elimination. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2012;6(10):e1819.
2. Maguiña, C., Guerra, H. and Ventosilla, P. Bartonellosis. Clinics in Dermatology. 2009;27(3), pp.271-280.
3. Kosek M, Lavarello R, Gilman RH, et al. Natural history of infection with Bartonella bacilliformis in a nonendemic population. J Infect Dis 2000; 182:865.
4. Maguina VC, Ugarte-Gil C, Brena CP, et al. Update of Carrion's disease. Rev Med Hered 2008; 19:36.
5. Maguina C, Garcia P, Gotuzzo E, Cordero L, Spach D. Bartonellosis (Carrion's Disease) in the Modern Era. Clinical Infectious Diseases. 2001;33(6):772-779.
6. Chamberlin J, Laughlin L, Romero S, Solórzano N, Gordon S, Andre R et al. Epidemiology of Endemic Bartonella bacilliformis: A Prospective Cohort Study in a Peruvian Mountain Valley Community. The Journal of Infectious Diseases. 2002;186(7):983-990.
7. Pamo O. Daniel Carrion's experiment: the use of self-infection in the advance of medicine. The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh. 2012;42(1):81-86

8. Gonzales C, Maguiña C, Heras F, Conde L. Bartonelosis (Fiebre de la Oroya o Verruga Peruana) ¿Enfermedad ocupacional?. *Medicina y Seguridad del Trabajo*. 2007;209: 35-41.
9. Perú. Ministerio de Salud. 2001. Enfermedad de Carrión. Bartonelosis en el Perú. Lima: Ministerio de Salud, Oficina General de Epidemiología, Instituto Nacional de Salud.
10. Maguiña C. et al. Actualización de la enfermedad de Carrión. *Rev Med Hered*. 2008;19(1):36-41.
11. Maguiña C, Cok J, Gilman R, Osoreo F, Tello A. Estudio prospectivo de la verruga peruana recurrente. *Dermatología Peruana* 2003;13: 189-194.
12. Del Valle Mendoza J, Silva Caso W, Tinco Valdez C, Pons M, del Valle L, Oré V et al. Diagnosis of Carrion's Disease by Direct Blood PCR in Thin Blood Smear Negative Samples. *PLoS ONE*. 2014;9(3):e92283.
13. Sanchez Clemente N, Ugarte-Gil C, Solorzano N, Maguiña C, Moore D. An Outbreak of *Bartonella bacilliformis* in an Endemic Andean Community. *PLOS ONE*. 2016;11(3):e0150525.
14. Zisimopoulou P, Brenner T, Trakas N, Tzartos S. Serological diagnostics in myasthenia gravis based on novel assays and recently identified antigens. *Autoimmunity Reviews*. 2013;12(9):924-930.
15. Callison J, Battisti J, Sappington K, Smitherman L, Minnick M. Characterization and expression analysis of the groESL operon of *Bartonella bacilliformis*. *Gene*. 2005;359:53-62.
16. Padilla C, Gallegos K, Marcelo A, Stella C, Baldeviano C. Expresión y serorreactividad de la proteína recombinante de 43-kDa de *Bartonella Bacilliformis*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 2006;23: 182-187.

17. Anaya E, Mendoza G, García-Uscamayta L, Fernández Y. Prueba de Elisa Indirecto del lisado total de *Bartonella bacilliformis* para el diagnóstico rápido de la enfermedad de Carrión. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 2008;25: 243 – 46.
18. Chamberlin J, Laughlin L, Gordon S, Romero S, Solorzano 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38: 4269-4271.
19. Posthuma-Trumpie G, Korf J, van Amerongen A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008;393(2):569-582.
20. Sajid M, Kawde A, Daud M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2015;19(6):689-705.
21. Koczula K, Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays In Biochemistry*. 2016;60(1):111-120.
22. Garcia-Esteban C, Gil H, Rodriguez-Vargas M, Gerrickagoitia X, Barandika J, Escudero R et al. Molecular Method for *Bartonella* Species Identification in Clinical and Environmental Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007;46(2):776-779.
23. Li DM, Liu YY, Du PC, Song XP, Liu QY. Detection of *Bartonella bacilliformis* by real-time PCR with TaqMan-MGB probe. *Microbiol China*. 2015;42(2): 427-435
24. Stills H. Polyclonal Antibody Production. In: Suckow M, Stevens K, Wilson R, ed. by. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. 1st ed. San Diego; 2012. p. 259 - 274.

25. Fuentes F, Mendoza R, Rivera R. Guía de Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio: Conejo. Lima: Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud. 2010. p. 35 – 37.
26. Simard, C; Richardson, S; Dixon, P; Bélanger, C and Maxwell, P. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. *Can. J. Vet. Res.*, 2000;64: 101-106.
27. Minnick, M., Anderson, B., Lima, A., Battisti, J., Lawyer, P. and Birtles, R. (2014). Oroya Fever and Verruga Peruana: Bartonelloses Unique to South America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
28. Pachas P. Enfermedad de Carrión (Bartonelosis) en el Perú. -Lima: Ministerio de Salud, OGE, INS, 2001. http://bvs.minsa.gob.pe/local/ogei/790_ms-oge110.pdf
29. Ellis BA, Rotz LD, Leake JAD, Samalvides F, Bernable J, et al. (1999) An outbreak of acute Bartonellosis (Oroya fever) in the Urubamba region of Peru, 1998. *Am J Trop Med Hyg* 61: 344–349.
30. Gomes C, Martinez-Puchol S, Pons M, Bazán J, Tinco C, del Valle J et al. Evaluation of PCR Approaches for Detection of *Bartonella bacilliformis* in Blood Samples. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10(3):e0004529.
31. Knobloch J. Analysis and preparation of *Bartonella bacilliformis* antigens. *Am J Trop Med Hyg*. 1988; 39: 173–8. PMID: 3044156.
32. Knobloch J, Schreiber M. Bb65, a major immunoreactive protein of *Bartonella bacilliformis*. *Am J Trop Med Hyg*. 1990; 43: 373–9. PMID: 1700634.
33. TAYE A. Production of Recombinant Protein Pap31 and Its Application for the Diagnosis of *Bartonella bacilliformis* Infection. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1063(1):280-285.

34. Gomes C, Palma N, Pons M, Magallón-Tejada A, Sandoval I, Tinco-Valdez C et al. Succinyl-CoA Synthetase: New Antigen Candidate of *Bartonella bacilliformis*. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2016;10(9):e0004989.
35. Minnick M, Smitherman L, Samuels D. Mitogenic Effect of *Bartonella bacilliformis* on Human Vascular Endothelial Cells and Involvement of GroEL. Infection and Immunity. 2003;71(12):6933-6942.
36. Callison J, Battisti J, Sappington K, Smitherman L, Minnick M. Characterization and expression analysis of the groESL operon of *Bartonella bacilliformis*. Gene. 2005;359:53-62.

ANEXOS

Tabla 1. Esquema de Inmunización con la proteína GroEL en conejos de la raza Nueva Zelanda.

Semana	Inmunizaciones	Ruta	Sangría	Aglutinación
0 (30 oct)	Inmunización #1 (Antígeno particulado)	Sub-cutánea	Sangría preinmune	-/+++
1 (7 oct)	Inmunización #2 (Antígeno particulado)	Intramuscular	Sangría parcial 1	-/+++
2 (14 oct)	Inmunización #3 (Antígeno particulado)	Intramuscular	Sangría parcial 2	-/+++
3 (21 oct)	Inmunización #4 (Antígeno particulado)	Intramuscular	Sangría parcial 3	+ /+++
4 (28 oct)	Inmunización #5 (Antígeno particulado)	Intramuscular	Sangría parcial 4	++ /+++
5 (4 nov)	Inmunización #6 (Antígeno particulado)	Intramuscular	Sangría parcial 5	++ /+++
6 (11 nov)	-	-	Sangría Total	+++ /+++

Figura 1A: Descripción esquemática de la prueba de inmunocromatografía.

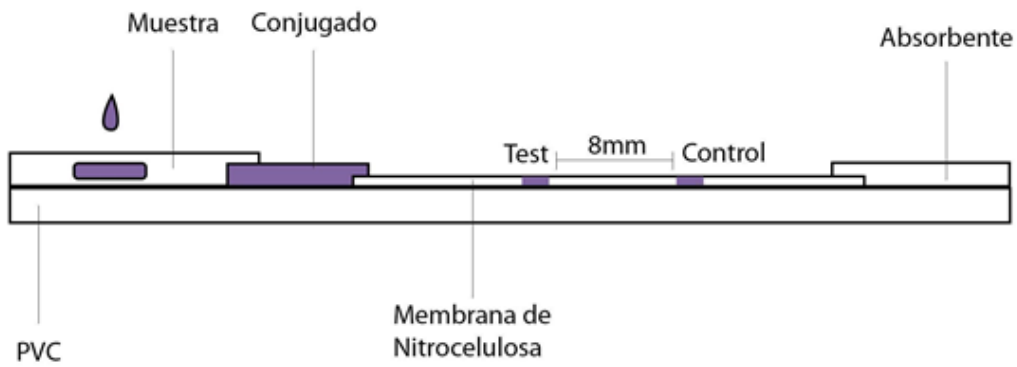


Figura 1B: Representación gráfica del principio de funcionamiento de la prueba de inmunocromatografía.

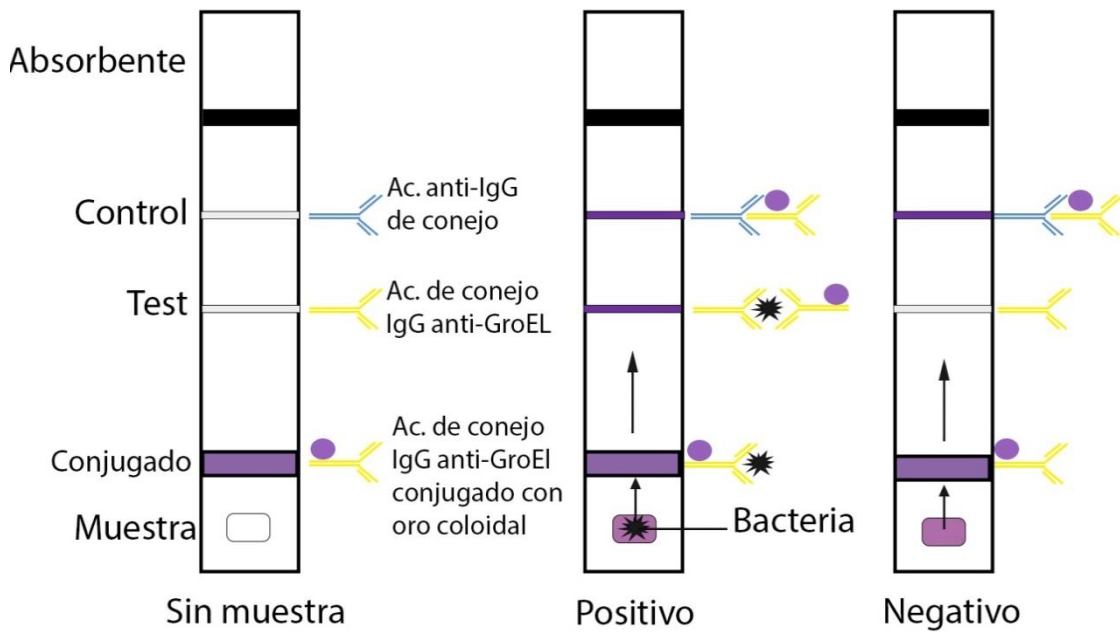


Figura 2. Diagrama ilustrando diferentes resultados de la prueba de inmunocromatografía

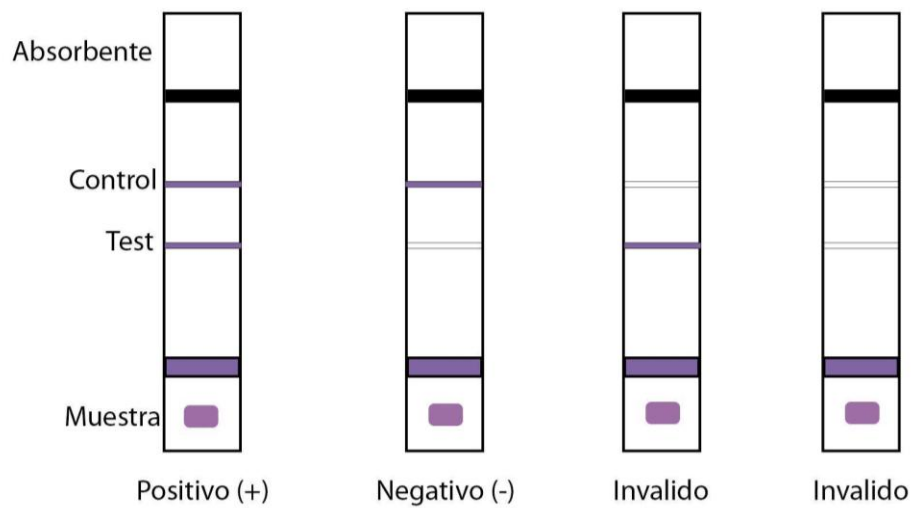


Figura 3. Cultivo de cepa CIP 77.27 ATCC4 a los 30 días. Se observan colonias pequeñas, puntiformes, translúcidas y de borde definido.

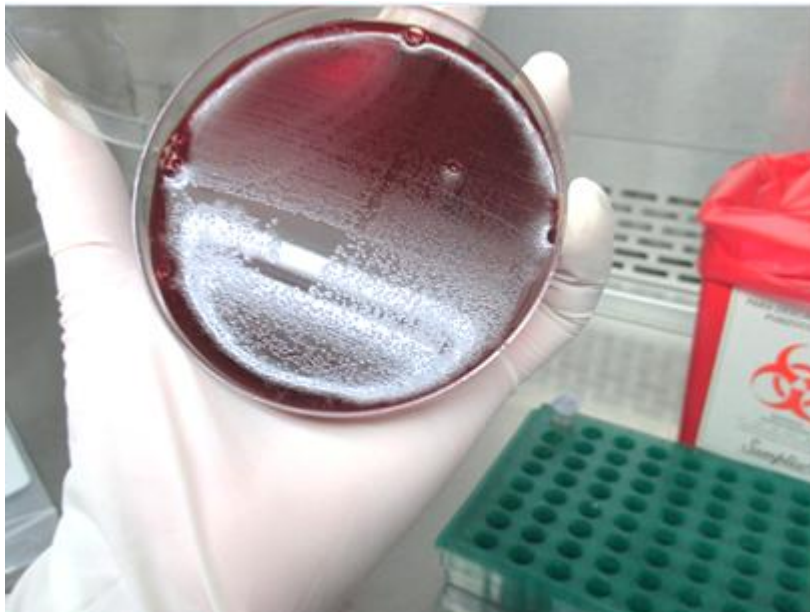


Figura 4. PCR convencional 16S *Bartonella* spp. para la cepa CIP 77.27. Se observan amplicones separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Producto amplificado de 438pb. WM: marcador de peso molecular ADN Ladder. CP: control positivo. CN: control negativo.

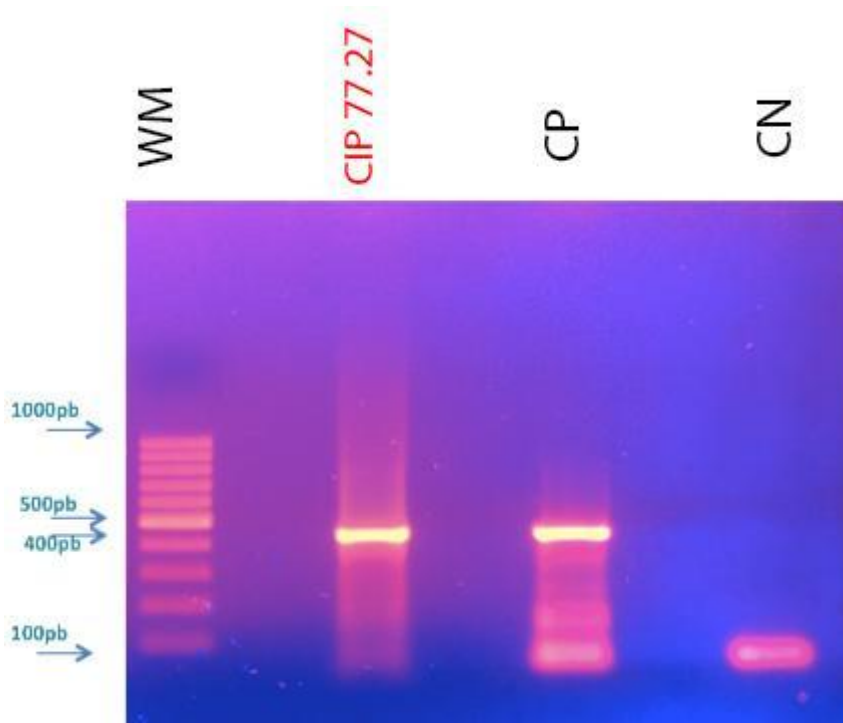


Figura 5. Curvas de amplificación de PCR real time 16S rRNA *Bartonella bacilliformis*. Azul: CIP 77.27 ATCC. Verde: Control positivo. Rojo: Control negativo.

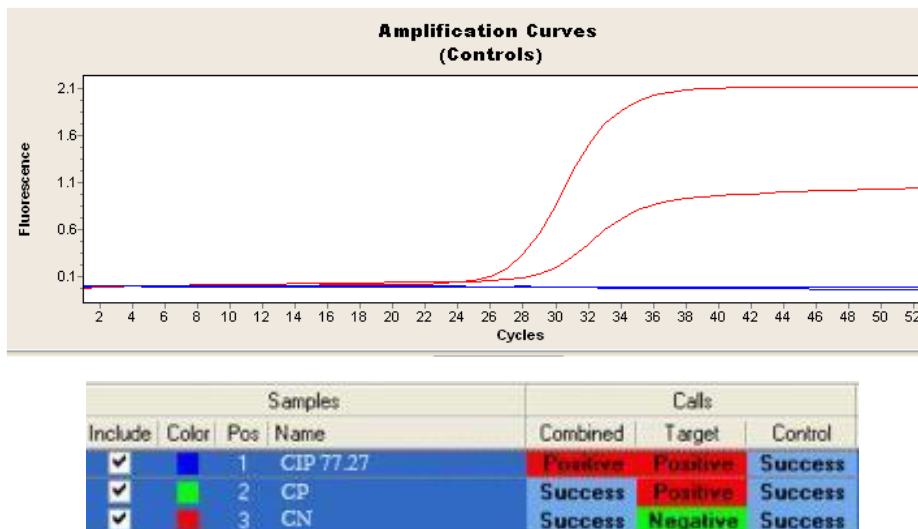


Figura 6. SDS-PAGE con presencia de fracciones de 50 kDa y 23 kDa, correspondiente a las cadenas pesadas y ligeras de IgG

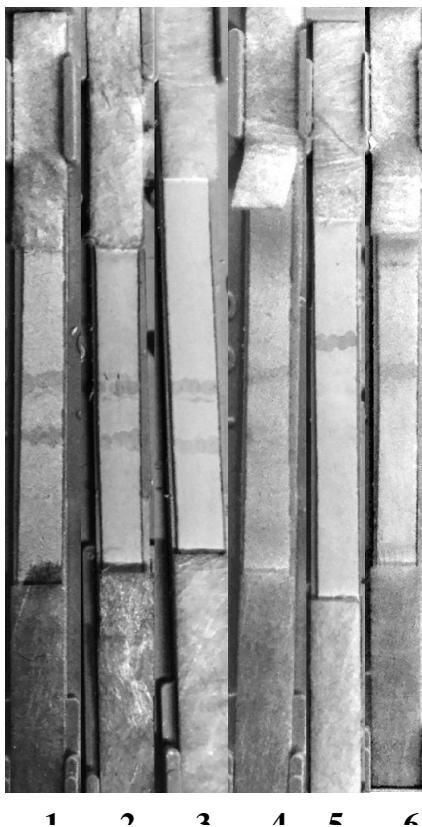
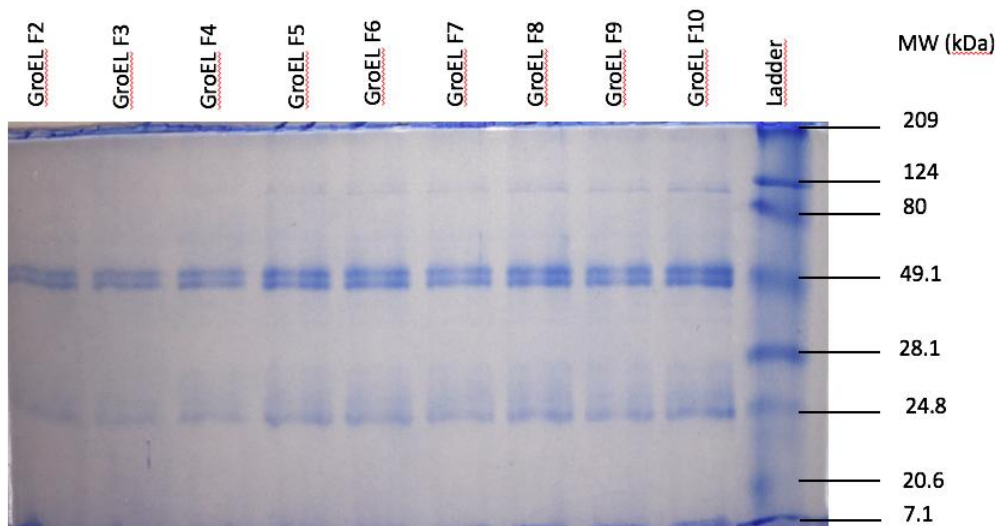


Figura 7. Sensibilidad analítica de la tira inmunocromatográfica. 1: *B. bacilliformis* CIP 77.27 1×10^5 UFC/mL. 2: *B. bacilliformis* CIP 77.27 1×10^4 UFC/mL. 3: *B. bacilliformis* CIP 77.27 1×10^3 UFC/mL. 4: *B. bacilliformis* CIP 77.27 1×10^2 UFC/mL. 5: *B. bacilliformis* CIP 77.27 1×10^1 UFC/mL. 6: Control negativo con PBS 1X.

Figura 8. Prueba de especificidad del inmunoensayo de flujo lateral contra *B. bacilliformis*. 1: Prueba de reacción cruzada con solución bacteriana del grupo 1 comprendido por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus viridans*. 2: Prueba de reacción cruzada con solución bacteriana del grupo 2 comprendido por *Chlamydomphila pneumoniae*, *Escherichia Coli* y *Candida spp.*

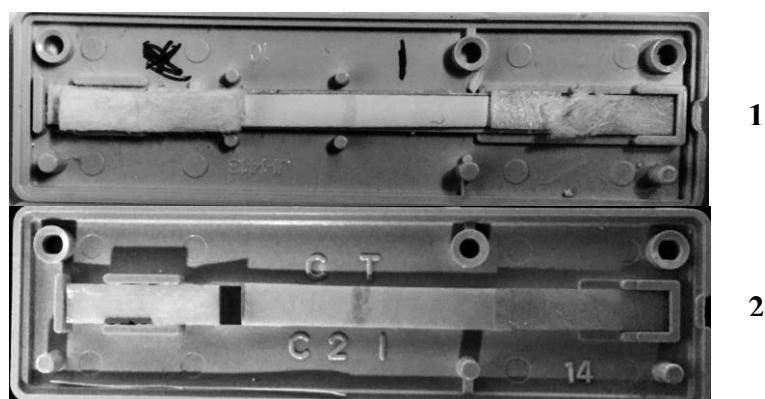


Figura 9. Prueba de estabilidad de la tira inmunocromatográfica después de exposición a 37°C por 30 días.

