



INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA PARA LA INNOVACIÓN TECNOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD DE CARRIÓN Y OTRAS BARTONELOSIS

Giovanna Mendoza Mujica

Resumen

Una de las principales dificultades para la atención oportuna de pacientes afectados por etiologías infecciosas olvidadas como la enfermedad de Carrión, es la nula o escasa disponibilidad de métodos de diagnóstico sensibles y específicos que permitan el reconocimiento oportuno de los casos para su tratamiento inmediato; en este contexto, investigadores del Laboratorio de Metaxénicas Bacterianas del INS vienen desarrollando métodos para la innovación tecnológica del diagnóstico de la enfermedad de Carrión y otras bartonelosis.

Los métodos *in house* diseñados han sido validados con la finalidad de asegurar la calidad y confiabilidad del diagnóstico de estas enfermedades en el INS. La generación de estos métodos de diagnóstico *in house*, hará posible, a corto plazo, la producción de kits comerciales de ELISA y Western Blot para distribuirlos entre los laboratorios regionales, los institutos de investigación nacional e internacional, las universidades y otros centros, haciendo posible el desarrollo de un mayor número de investigaciones. Asimismo, ya se iniciaron las gestiones ante INDECOPI para la obtención de patentes institucionales.

Los proyectos de mejora propuestos tienen sostenibilidad en el tiempo, han sido implementados en el LRN de Metaxénicas Bacterianas del CNSP y, actualmente, están al servicio de la comunidad.

Palabras clave: Enfermedad de Carrión, Bartonelosis, Métodos, Innovación tecnológica

Antecedentes

El Perú es uno de los países con mayor biodiversidad, animal y vegetal, distribuida en los diferentes pisos ecológicos, donde las variadas condiciones de altitud, humedad y temperatura hacen posible la proliferación de numerosas especies de reservorios e insectos vectores, involucrados en la transmisión de agentes patógenos causantes de morbimortalidad.

Un grupo importante de microorganismos transmitidos por vectores, lo constituyen las *Bartonellas*, bacterias involucradas en diferentes cuadros clínicos¹, una de las especies más importantes de este género es *Bartonella bacilliformis*, agente causal de la enfermedad de Carrión (EC), etiología infecciosa vinculada a la pobreza, condiciones de desnutrición, servicios sanitarios deficientes y proliferación de mosquitos

1 Instituto Nacional De Salud (INS)

transmisores del género *Lutzomyia*; afecta a niños y adultos vulnerables, residentes en localidades endémicas ubicadas en valles interandinos de los departamentos de Ancash, Amazonas, Cajamarca, Cusco, Huánuco, La Libertad, Lima y Piura, donde la enfermedad constituye uno de los principales problemas de salud pública^{2,3}.

Los cambios climatológicos causados por el fenómeno El Niño, que ha afectado recientemente al Perú, han originado el incremento de precipitaciones pluviales y de la temperatura, factores que tienen vinculación directa con la proliferación de insectos transmisores de enfermedades; situación que viene favoreciendo la ocurrencia de brotes de numerosas enfermedades metaxénicas como el dengue, la malaria y la EC, con un incremento importante de casos y posibilidades de mayor morbilidad y mortalidad en los pobladores residentes de áreas endémicas^{4,5}.

Realizando el análisis de la problemática de las enfermedades olvidadas como la EC en nuestro país, llegamos a la conclusión que las principales dificultades para la atención oportuna de los pacientes afectados, radica, principalmente, en la carencia de métodos de diagnóstico sensibles y específicos que permitan el reconocimiento temprano de los casos (Figura 1).

Para el diagnóstico de la EC en los establecimientos de salud de localidades endémicas remotas, el método mayormente utilizado consiste en la evaluación microscópica de extendidos sanguíneos coloreados con Giemsa, método de buena especificidad, pero baja sensibilidad⁶, por lo que, en su mayoría, los resultados son negativos y no permiten la confirmación de la enfermedad, por ello, gran porcentaje de pacientes son calificados como casos probables, y se les administra el tratamiento considerando únicamente aspectos clínico-epidemiológicos, sin confirmación por el laboratorio; ello incide en el subregistro de casos y se pierde valiosa información que haría posible conocer las cifras reales de la enfermedad a nivel nacional, e imposibilita, además, el reconocimiento de pacientes con síntomas inespecíficos, en los cuales el diagnóstico es dificultoso, debido a la gran similitud del cuadro clínico con otras enfermedades infecciosas. Los métodos bacteriológicos como el cultivo y las pruebas moleculares, no pueden ser realizados en estos establecimientos, debido al prolongado tiempo de duración de los cultivos y el elevado costo de los equipos y reactivos; los métodos serológicos representaban una buena opción para la confirmación del diagnóstico debido a su fácil procesamiento, resultados en menor tiempo, y su buena sensibilidad y especificidad; sin embargo, el mayor inconveniente para su ejecución era que no se contaba, a nivel nacional e internacional, con pruebas comerciales para el diagnóstico de la EC.

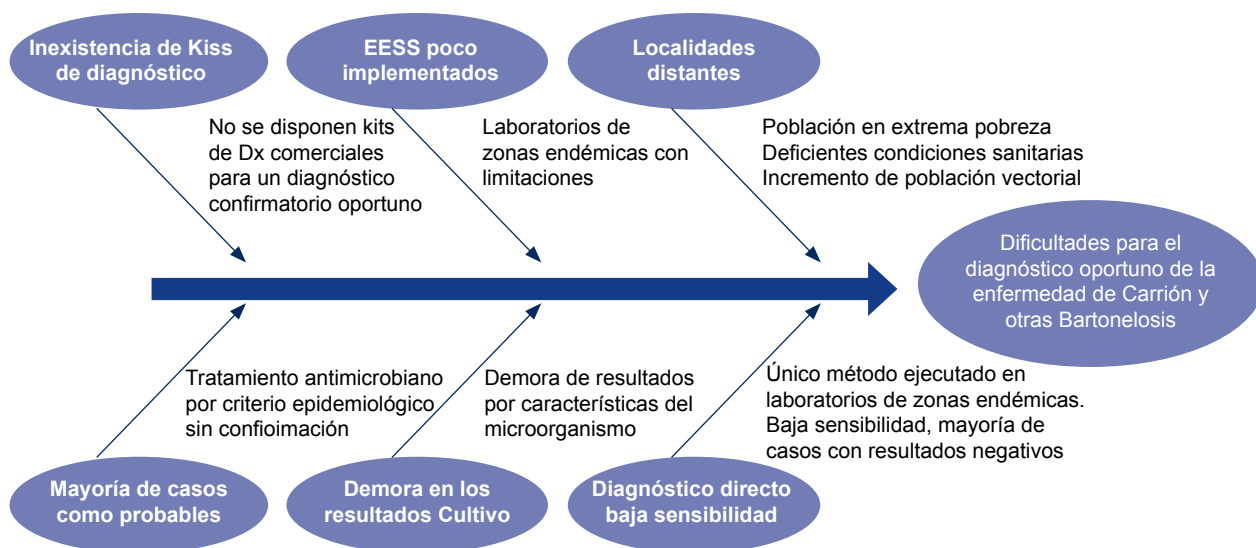


Figura 1. Análisis de la problemática

Iniciativas de mejora y búsqueda de alternativas de solución de los problemas identificados en el diagnóstico de la enfermedad de Carrión y otras bartonelosis

A partir del año 2005 iniciamos la mejora continua de los métodos y procedimientos disponibles en el INS para el diagnóstico de la enfermedad de Carrión, con el único objetivo de ofrecer un mejor servicio a la población afectada por esta etiología olvidada; se plantearon las siguientes estrategias:

Generación de criterios para el reconocimiento de las formas bacterianas de *Bartonella bacilliformis* en extendidos sanguíneos coloreados con Giemsa, lo que ha facilitado notablemente la identificación del microorganismo y mejorado la confiabilidad del diagnóstico directo⁷ (Figura 2).

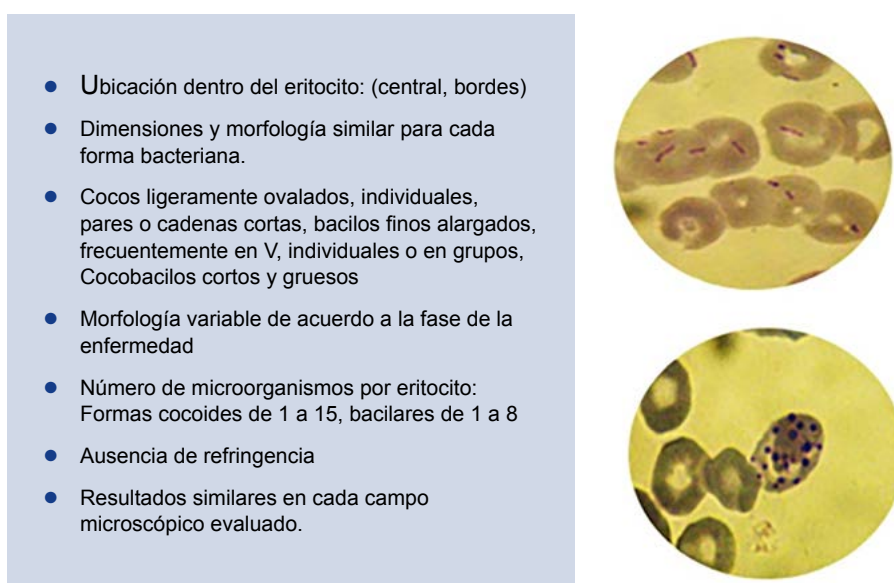


Figura 2. Criterios para la identificación de *B. bacilliformis* en extendidos sanguíneos coloreados

- Producción de medios de cultivo bifásico, con adición de suplementos nutricionales, que hicieron posible mayor número de aislamientos in vitro del agente etiológico de EC, a partir de muestras de sangre total de pacientes afectados, procedentes de los departamentos endémicos del Perú⁸ (Figura 3).
- Organización y ejecución del Programa de Evaluación Externa de la Calidad a los Laboratorios de Referencia Regional, a partir del año 2009, mediante paneles de láminas de extendidos sanguíneos coloreados, y el desarrollo, en colaboración con la Oficina General de Información y Sistemas, del *software* informático PEEC-Barton en el Sistema NETLAB, con la finalidad de monitorear la calidad y confiabilidad de los resultados del diagnóstico directo de la enfermedad de Carrión en los laboratorios de los departamentos endémicos del Perú
- Desarrollo y organización del primer Cepario de *Bartonella bacilliformis* en el Instituto Nacional de Salud, con cepas procedentes de los departamentos endémicos, mantenidas en medio de preservación a temperaturas entre -70 y -80 °C, registradas en los formatos establecidos por el Sistema de Gestión de la Calidad Institucional, constituyendo el material más importante para el desarrollo de los proyectos de innovación.



Figura 3. Medio de cultivo para *B. bacilliformis*

Investigación científica para la generación de la innovación tecnológica de la enfermedad de Carrión y otras bartonelosis

En este contexto, contando con métodos bacteriológicos validados y confiables como base importante de nuevas propuestas, consideramos a la investigación científica como la única herramienta válida para la generación de nuevos conocimientos, en estricto cumplimiento de nuestra misión, visión y lema institucional: “Investigar para proteger la salud”

Por consiguiente, en el Laboratorio de Referencia Nacional de Metaxénicas Bacterianas, planteamos un circuito (Figura 4) para nuestras estrategias y propuestas, a través del diseño y planificación de investigaciones destinadas a la generación de nuevos métodos serológicos *in house* que, una vez validados, hagan posible un diagnóstico confirmatorio oportuno de aquellos pacientes afectados por la enfermedad de Carrión, para así brindar un adecuado tratamiento antimicrobiano, recuperar la salud en el menor tiempo posible, evitando complicaciones que pongan en riesgo la vida.

El primer paso para plantear nuestras propuestas de investigación para la innovación tecnológica del diagnóstico serológico de la EC y otras bartonelosis de manera sostenible, fue la búsqueda bibliográfica de estudios previos, otra tarea importante fue la de analizar y seleccionar las mejores alternativas de diagnóstico, a partir de las experiencias de investigaciones realizadas con diferentes etiologías bacterianas, virales y parasitarias, que hicieron posible finalmente diseñar los pilotos iniciales de nuestros nuevos métodos de diagnóstico *in house*.

Considerando la importancia del tratamiento de la enfermedad y los constantes reportes de fallas en la terapia antimicrobiana, se planteó la primera propuesta de investigación dirigida al diseño y desarrollo de métodos para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de *Bartonella bacilliformis*, a los antimicrobianos más utilizados en el tratamiento de la fase aguda de la enfermedad de Carrión; para ello se ejecutó el proyecto:

“Susceptibilidad antimicrobiana a cloranfenicol y ciprofloxacino de cepas de *Bartonella bacilliformis* procedentes de zonas endémicas del Perú”



Figura 4. Circuito de estrategias

Que hizo posible, mediante numerosas evaluaciones, adecuar los métodos convencionales de disco difusión y E-test para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de *B. bacilliformis*, un microorganismo considerado como “fastidioso” por las características particulares de crecimiento y requerimientos nutricionales (Figura 5).

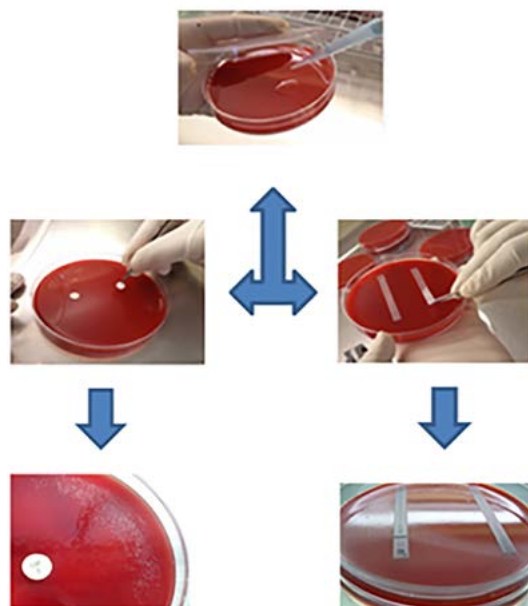


Figura 5. Métodos para la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana

Los resultados obtenidos en la evaluación fenotípica de la susceptibilidad antimicrobiana del microorganismo, llevaron a plantear un nuevo proyecto de investigación, con la finalidad de determinar por biología molecular la resistencia mediada por genes en las cepas de nuestro microorganismo, para ello se ejecutó el estudio:

“Caracterización molecular de cepas de *Bartonella bacilliformis* resistentes a los antimicrobianos”

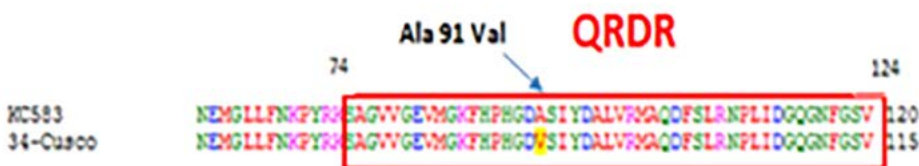
La investigación generó valiosa información de las mutaciones genotípicas presentes en las cepas de *Bartonella bacilliformis* (Figura 6), habiéndose anotado 240 secuencias de genes de resistencia al Gen Bank (los hallazgos de la investigación serán publicados en breve).

Gen *gyrA*

- Mutaciones aminoácidas dentro de la QRDR, no reportadas hasta el momento :



Alineamiento de secuencia aminoácidas de Cepas de *Bartonella bacilliformis* con mutación Gly89Cys



Alineamiento de secuencia aminoácidas de Cepas de *Bartonella bacilliformis* con mutación Ala 91 Val

Figura 6. Mutaciones en gen *Gyr A*-*Bartonella bacilliformis*

Asimismo, esta investigación hizo posible la generación de protocolos in house para el desarrollo de métodos moleculares de PCR convencional y PCR en tiempo real, que vienen siendo validados para su implementación en el Laboratorio de Metaxénicas Bacterianas (Figura 7).

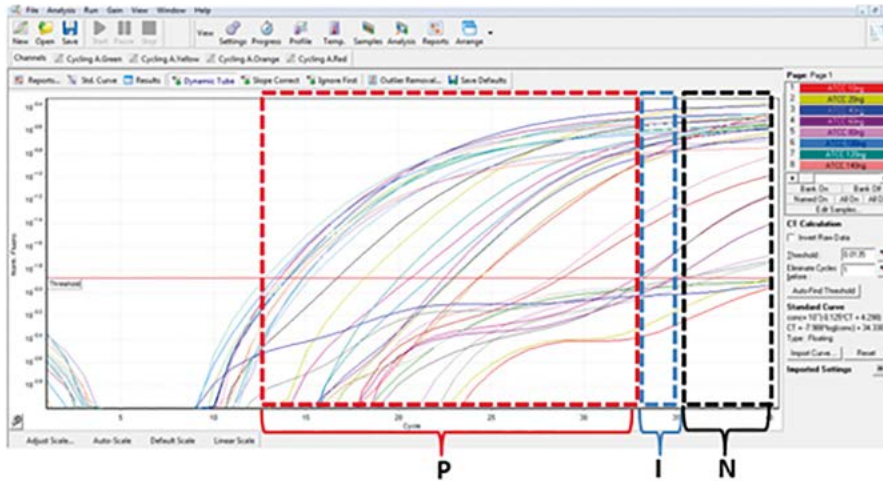


Figura 7: Se muestra las zonas donde las muestras son Positivas, Indeterminadas o Negativas con sus Ct respectivos que fueron calculados con DNA a partir de cepa pura y con sangre determinando 3 zonas:

P: Positivos entre los Ct: 13 – 32.

I: Indeterminados entre los Ct: 33 – 35 (Repetir las muestras si caen en este rango).

N: Negativos por debajo del Threshold o cuando existen muestras con Ct mayores a 35.

Figura 7. PCR en tiempo real-Dx EC

Con la finalidad de contar con métodos de diagnóstico serológico se presentó la propuesta a la convocatoria de fondo concursable, impulsada por el Centro Nacional de Salud Pública, esta fue la oportunidad de plantear las propuestas de investigación, las que, afortunadamente, obtuvieron el primer y segundo puestos del concurso, ello permitió obtener los fondos que, aunque limitados, permitieron la puesta en marcha de dos propuestas de investigación para la innovación tecnológica del diagnóstico de la EC:

“Alternativas para el serodiagnóstico de la enfermedad de Carrion: inmunofluorescencia indirecta y ELISA” (Figura 8)

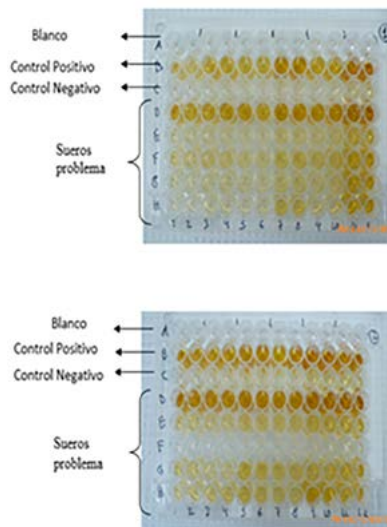


Figura 8. Determinación de anticuerpos IgM e IgG por ELISA

- Inmunoblot para el diagnóstico serológico de formas aguda y eruptiva de la enfermedad de Carrion.

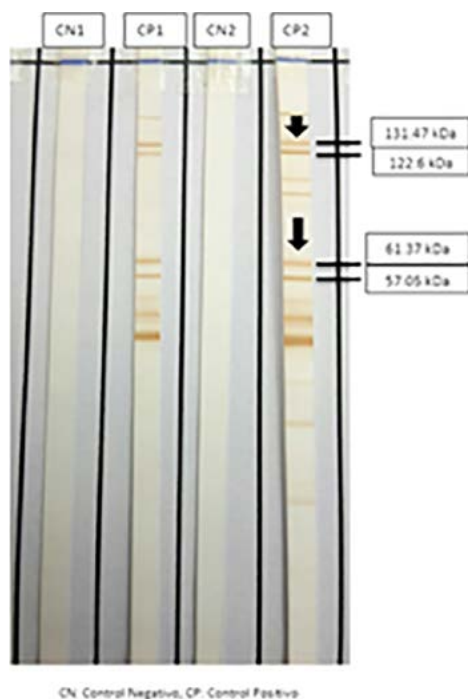


Figura 9. WB para la confirmación del Dx de la EC

Los protocolos de investigación fueron presentados a los Comités de Investigación y Ética de la Oficina General de Investigación y Transferencia Tecnológica, para que, luego de la aprobación, se empezaran a ejecutar las actividades programadas. Todo ello ha permitido contar con dos nuevos e innovadores métodos serológicos in house para el diagnóstico de la enfermedad de Carrion, los cuales han sido validados y están al servicio de los pacientes afectados por la etiología, y constituyen herramientas importantes de diagnóstico, investigación e intervención en los recientes brotes de la enfermedad de Carrion que vienen presentándose en los departamentos de Cajamarca, Ancash, Huánuco y La Libertad, como consecuencia del fenómeno El Niño.

Tabla 1. Número de diagnósticos ejecutados de la enfermedad de Carrion

Laboratorio de metaxenicis bacterianas				
Método de diagnóstico	Motivo	2016	2017	Total
Coloración giemsa bartonelosis	Diagnóstico	755	627	1382
Cultivo y aislamiento bartonelosis	Diagnóstico	731	441	1172
Elisa IGG enfermedad de carrion	Diagnóstico	706	798	1504
Elisa IGM enfermedad de carrion	Diagnóstico	706	798	1504
Pcr enfermedad de carrion	Diagnóstico	174	129	303
Western blot enfermedad de carrion	Diagnóstico	123	94	217
Coloración giemsa bartonelosis	Vigilancia	92	84	176
Cultivo y aislamiento bartonelosis	Vigilancia	92	84	176

Método de diagnóstico	Motivo	2016	2017	Total
Elisa IGG enfermedad de carrión	Vigilancia	105	84	189
Elisa IGM enfermedad de carrión	Vigilancia	105	84	189
Pcr enfermedad de carrión	Vigilancia	90	50	140
Coloración giemsa bartonelosis	Brote	858	476	1334
Cultivo y aislamiento bartonelosis	Brote	793	526	1319
Elisa IGG enfermedad de carrión	Brote	811	527	1338
Elisa IGM enfermedad de carrión	Brote	812	527	1339
Pcr enfermedad de carrión	Brote	554	299	853
Coloración giemsa bartonelosis	Investigación	415	214	312
Cultivo y aislamiento bartonelosis	Investigación	415	215	217
Elisa IGG enfermedad de carrión	Investigación	52	125	177
Elisa IGM enfermedad de carrión	Investigación	1	177	178
PCR enfermedad de carrión	Investigación	231	70	301
Total		8611	6429	15 050

Tabla 2. Número de personas diagnosticadas con enfermedad de Carrión

Laboratorio de metaxenicis bacterianas

Total de personas atendidas		2016	2017	Total
Enfermedad de carrión	Vigilancia	107	86	193
Enfermedad de carrión	Investigación	285	224	509
Enfermedad de carrión	Diagnóstico	1064	1047	2111
Enfermedad de carrión	Brote	1187	652	1839
Total		2643	2010	4653

Posteriormente, el proyecto se presentó a la convocatoria de “Ideas Audaces” del Grand Challenges Canadá y Fondecyt, en donde se obtuvo el financiamiento para perfeccionar el primer piloto, así como la adquisición de equipos para la implementación del laboratorio con herramientas imprescindibles para la producción de antígenos bacterianos.

La investigación:

“Western Blot for diagnosis of a neglected and reemerging illness in endemic and extreme poverty Peruvian areas: Carrion’s Disease”

Permitió ampliar el reconocimiento de los perfiles antigénicos de cepas de *Bartonella bacilliformis* circulantes en el Perú y la producción de antígenos nativos por departamento endémico, es el único proyecto de investigación del INS que logró la prueba de concepto planteada por las entidades auspiciadoras, y fue considerada para el escalamiento que, por algunos inconvenientes en el cumplimiento de los requisitos de postulación, no se hizo realidad.

Considerando evidencias de la circulación de nuevas especies del género *Bartonella* en nuestro país, y reportes cada vez más frecuentes a nivel mundial de infecciones humanas causadas por especies de *Bartonella* (*henselae*, *elizabethae*, *quintana*, *rochalimae* y *clarridgeae*) involucradas en síndromes clínicos humanos, que incluyen angiomatosis bacilar, peliosis hepática, endocarditis bacteriana, enfermedad de

arañazo de gato, entre otras; fue que se planteó un nuevo reto para hacer posible obtener información actualizada de la circulación de estos patógenos en zonas de extrema pobreza del Perú, además de la identificación de los reservorios y vectores involucrados en su transmisión, es así que se generó el proyecto:

“Identificación de *Bartonella* spp involucrada en infecciones humanas, búsqueda de vectores y reservorios en zonas endémicas y de extrema pobreza del Perú”

La experiencia en el diseño de métodos serológicos para el diagnóstico de la enfermedad de Carrión, ha facilitado la generación de un nuevo método serológico *in house* para el diagnóstico de la enfermedad de arañazo de gato, causada por *Bartonella henselae*, haciendo posible determinar la circulación de este agente patógeno causante de fiebre de origen desconocido (FOD) en niños con antecedentes epidemiológicos de mordedura, arañazo o contacto frecuente con gatos infectados.

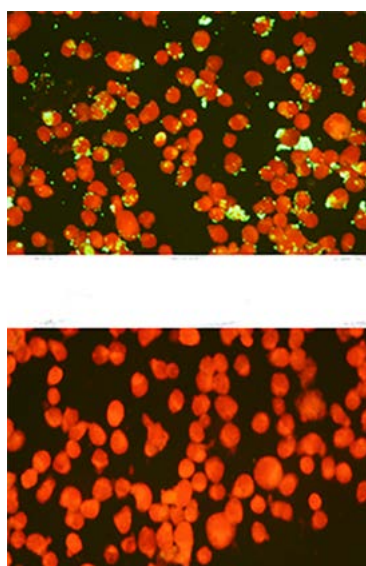


Figura 10. IFI *in house* para el diagnóstico de la EAG

La implementación de este nuevo método de diagnóstico *in house* ha permitido la identificación de personas afectadas por la enfermedad de arañazo de gato (EAG) debido a *Bartonella henselae*; se brindó información científica validada acerca de la circulación de este agente etiológico en el departamento de Lima, y se tiene planificada la difusión del diagnóstico a nivel nacional mediante un protocolo de vigilancia de las Bartonelosis.

Tabla 3. Número de diagnósticos ejecutados - enfermedad de arañazo de gato

Laboratorio de metaxenicas bacterianas

Prueba	Motivo	2016	2017	Total
Inmunofluorescencia Indirecta IgG	Diagnóstico	192	176	368
Inmunofluorescencia Indirecta IgM	Diagnóstico	192	176	368
Inmunofluorescencia Indirecta IgG	Vigilancia	2		2
Inmunofluorescencia Indirecta IgG	Investigación	2		2
Total		388	352	740

Tabla 4. Número de personas diagnosticadas - enfermedad de arañazo de gato**Laboratorio de metaxenicis bacterianas**

Total, de personas atendidas				
Enfermedad de arañazo de gato	Vigilancia	2		2
Enfermedad de arañazo de gato	Investigación	2		2
Enfermedad de arañazo de gato	Diagnóstico	192	178	370
Total		196	178	374

Actualmente, se continúa diseñando nuevas propuestas de innovación, siempre mediante la generación de investigaciones; se ha planteado la creación de las tiras rápidas de diagnóstico, de manera que hasta en el rincón más recóndito del país, el peruano afectado por la enfermedad de Carrión, acceda a un diagnóstico confirmatorio inmediato para su tratamiento en el menor tiempo posible. Asimismo, otra tarea importante es la de generar nuevos métodos para etiologías bacterianas transmitidas por vectores poco estudiados y que, probablemente, estén involucrados en síndromes clínicos no diagnosticados, como Coxiella, Anaplasma y Borrelia.

Conclusiones

- La investigación científica es la herramienta más importante para la generación de nuevos conocimientos e innovación tecnológica.
- Los métodos *in house* diseñados para el diagnóstico de la EC y otras Bartonelosis han sido validados con la finalidad de asegurar la calidad y confiabilidad del diagnóstico realizado por el Laboratorio de Referencia Nacional de Metaxénicas Bacterianas del INS.
- Durante el año 2016 y hasta el 30 de junio del año 2017, se han ejecutado 15 050 pruebas para el diagnóstico de pacientes con signos y síntomas compatibles con la EC, habiendo accedido a este diagnóstico 4653 peruanos residentes en localidades de extrema pobreza.
- Se ha evidenciado la circulación de otras especies del género *Bartonella* como agentes etiológicos de síndromes febriles, mediante el procesamiento de 740 pruebas de diagnóstico de la EAG, permitiendo el reconocimiento de esta enfermedad infecciosa a 374 pacientes, en su mayoría niños, en el período 2016 a la fecha.
- La producción de métodos *in house*, para la EAG ha permitido reducir de manera importante el presupuesto institucional utilizado en la adquisición de kits comerciales de diagnóstico para esta etiología.
- La generación de estos métodos de diagnóstico *in house*, hará posible obtener patentes institucionales, habiéndose iniciado las gestiones en INDECOPI. Se tiene planificada la producción de kits comerciales de ELISA y Western Blot para su distribución entre los laboratorios regionales, institutos de investigación nacionales e internacionales, universidades y otros centros, y así hacer posible otras investigaciones sobre la enfermedad de Carrión.
- Estos proyectos de mejora tienen sostenibilidad en el tiempo, han sido implementados en el LRN de Metaxénicas Bacterianas del CNSP y están al servicio de la comunidad.
- A mediano plazo, se ejecutará la transferencia tecnológica de los métodos *in house* diseñados para Laboratorios de Referencia Regional de los departamentos con mayor endemidad de la EC, lo que permitirá que el paciente residente en localidades remotas, acceda con mayor facilidad y menor tiempo a un diagnóstico confirmatorio oportuno.
- Contar con herramientas de diagnóstico validadas hará posible, en un futuro cercano, el desarrollo de estudios de seroprevalencia y vigilancia a nivel nacional y en países como Ecuador y Colombia, en los que se reportaron casos de la enfermedad años atrás y que actualmente no cuentan con información de la situación real de la enfermedad en sus países.

Bibliografía

1. Maguiña C, García PJ, Gotuzzo E, Cordero L, Spach D H. Bartonellosis (Carrion's disease) in the modern era. *Clin Infect Dis*. 2001; 33(6): 772-779. doi: 10.1086/322614
2. Sánchez N, Ugarte-Gil CA, 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 Negl Trop Dis*. 2012; 6(10): e1819. doi.org/10.1371/journal.pntd.0001819
3. Pachas P. Epidemiología de la Bartonellosis en el Perú. Lima: Instituto Nacional de Salud, Oficina General de Epidemiología; 2001.
4. Zhou J, Lau W K, Masuoka F, Andre R, Chamberlin J, Lawyer P, Laughlin L. El Niño helps spread bartonellosis epidemics in Peru. *Eos, Transactions American Geophysical Union*. 2002; 83(14): 157-161. doi: 10.1029/2002EO000102
5. Huarcaya E, Chinga E, Chávez J, Chauca J, Llanos A, Maguiña C, Gotuzzo E. Influencia del fenómeno El Niño en la epidemiología de la bartonellosis humana en los departamentos de Ancash y Cusco entre 1996 y 1999. *Revista Médica Herediana*. 2004; 15(1): 4-10. doi: <https://doi.org/10.20453/rmh.v15i1.812>
6. Pachas PE, Solorzano N, Chiroque J, Rojas Y, Chancafe J, Tarazona A, et al. Value diagnosis of the thin smear in Human Bartonellosis (Carrion's Disease). In: 53th ASMTH Annual Meeting. Atlanta: ASMTH; 2004. Abstract 1007.
7. Mendoza G. Método para el diagnóstico directo de la enfermedad de Carrión mediante coloración Giemsa. Lima; Instituto Nacional de Salud, Laboratorio de Metaxénicas Bacterianas-CNSP; 2014.
8. Mendoza G. Método de Cultivo y Caracterización bacteriológica de Bartonella bacilliformis. Lima; Instituto Nacional de Salud, Laboratorio de Metaxénicas Bacterianas-CNSP. 2014