

GENOTIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Bartonella bacilliformis* POR AMPLIFICACIÓN DE ELEMENTOS REPETITIVOS MEDIANTE EL USO DE REP-PCR y ERIC-PCR

Carlos Padilla R¹, Gladis Ventura E.²

¹División de Biología Molecular. Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú

²División de Bacteriología. Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú

RESUMEN

Objetivos: Genotipificar los aislamientos de *Bartonella bacilliformis* a través de la amplificación de elementos repetitivos mediante el uso de ERIC-PCR y REP-PCR, y determinar si existe variabilidad genética entre aislamientos de varias zonas endémicas. **Materiales y Métodos:** Se evaluaron mediante el uso del ERIC-PCR y REP-PCR 17 aislamientos de *B. bacilliformis* de Lima, Cusco y Ancash. Los aislamientos fueron realizados durante los años 1998 y 1999. Para el análisis de los patrones de bandas se usó el software GelCompar 4,0. **Resultados:** Fueron identificados en los 17 aislamientos 10 genotipos. Los genotipos D, E y H fueron detectados en Cusco; mientras que los genotipos B, C, G, J e I en Lima; y el genotipo F en Ancash. **Conclusiones:** Nuestros resultados sugieren que REP-PCR y ERIC-PCR son métodos útiles para genotipificar aislamientos de *B. bacilliformis*. La variabilidad genética debe ser tomada en cuenta en estudios epidemiológicos y clínicos de Bartonelosis; así como el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas y de vacunas.

Palabras clave: *Bartonella bacilliformis*; Reacción en Cadena de la Polimerasa; Infecciones por *Bartonella*; Genotipo. (fuente: BIREME)

ABSTRACT

Objective: To genotype *Bartonella bacilliformis* isolates by repeated elements amplification using ERIC-PCR and REP-PCR, and to determine if there is any genetic variability among isolates from several endemic areas. **Materials and Methods:** 17 *B. bacilliformis* isolates from Lima, Cusco and Ancash were assessed using ERIC-PCR and REP-PCR. Fingerprints of the samples were obtained, and they were analyzed using GelCompar 4,0 software. **Results:** 10 genotypes were identified. Genotypes D, E and H were detected in Cusco; while genotypes B, C, G, J and I were detected in Lima; and genotype F was found in Ancash. **Conclusions:** Our results indicate that REP-PCR and ERIC-PCR are useful methods for genotyping *B. bacilliformis* isolates. Genetic polymorphism should be taken into account in epidemiological and clinical studies, as well as for the development of new vaccines and diagnostic methods.

Key words: *Bartonella bacilliformis*, Polymerase Chain Reaction; *Bartonella* infections; Genotype (source: BIREME).

INTRODUCCIÓN

La Bartonelosis es una enfermedad causada por el bacilo gram-negativo *Bartonella bacilliformis* y transmitida por la picadura del mosquito flebótomo del género *Lutzomya*^{1,2} es endémica en el Perú, Ecuador y Colombia¹⁻⁶. En el Perú, los departamentos endémicos para esta enfermedad son: Ancash, Lima, Piura, Cusco, Cajamarca, Amazonas, La Libertad, Huancavelica, Huánuco y Ayacucho².

Existen dos fases clínicas bien diferenciadas de esta enfermedad: la fase aguda caracterizada por anemia hemolítica y la fase crónica caracterizada por la presencia de verrugas, la primera puede ser mortal si no es tratada a tiempo¹⁻³.

Las herramientas moleculares para la tipificación de aislamientos han demostrado ser muy importantes en el estudio de la epidemiología de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, hay pocas metodologías descritas para caracterizar aislamientos de *B. bacilliformis*.

Un reciente informe realizado por Birtles y colaboradores⁷ describe el uso del método de polimorfismo de fragmentos

amplificados (amplified fragment length polymorphism o AFLP) y secuenciamiento de genes para la identificación de genotipos de *B. bacilliformis*; sin embargo, estos métodos requieren varias etapas en su procesamiento. La amplificación de elementos genéticos repetitivos usando los sistemas ERIC-PCR (amplificación de secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias) y REP-PCR (amplificación de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos) también han sido descritas para la caracterización de aislamientos del género *Bartonella*⁸⁻¹¹. Probablemente, al igual que para *B. henselae*; estas técnicas también pueden ser útiles para genotipificar aislamientos de *B. bacilliformis*⁹⁻¹¹.

El presente trabajo tuvo por objetivo genotipificar los aislamientos de *B. bacilliformis* a través de la amplificación de elementos repetitivos mediante el uso de la ERIC-PCR y REP-PCR y determinar si existe variabilidad genética entre las cepas aisladas de varias zonas endémicas de Bartonelosis en el Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

AISLAMIENTOS

Se evaluaron 17 muestras de *B. bacilliformis* de Ancash (2), Lima (6) y Cusco (9), las cuales fueron aisladas entre

Correspondencia: Carlos P. Padilla Rojas. División de Biología Molecular. Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú
Dirección: Cápac Yupanqui 1400. Lima 11, Perú
Telf: 51 1 4719920 Anexo 149 Fax: 51 1 4719920
Correo electrónico: cpadilla@ins.gob.pe cpadillar@hotmail.com

los años 1998 a 1999, como parte del programa de vigilancia de la Bartonelosis (Tabla). Los aislamientos fueron clasificados como *B. bacilliformis* usando secuenciamiento del gen *gltA* de la enzima citrato sintetasa según Norman y colaboradores¹².

EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN genómico se usó 200 mL de cultivo bacteriano usando el kit comercial *Qiamp Tissue Kit* (QIAGEN Inc. Valencia, California.) de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. Se usó 400 mg de proteinasa K (Sigma Inc. St. Louis, MO) y la solución para lisar los cultivos (ATL) de este kit. Las muestras fueron incubadas a 65 °C durante 12 horas y luego el ADN genómico fue recuperado en 50 mL de agua bidestilada libre de ADNsas (Sigma Inc. St. Louis, MO).

ERIC-PCR Y REP-PCR

En la genotipificación de los aislamientos de *B. bacilliformis* se utilizaron las técnicas de REP-PCR y ERIC-PCR. Los oligonucleótidos usados para realizar ERIC-PCR (ERIC1R y ERIC2) y para REP-PCR (Rep1R-Dt y Rep2-D) fueron los mismos que los reportados por Versalovic¹³. El volumen final de las mezclas de reacción fue 25 mL, con 200 mM de cada nucleótido trifosfato (A, C, G y T), 2 U de ADN polimerasa termoestable Amplitaq (PE Applied Biosystems, Foster City, California.), 2,5 mM de MgCl₂ y 1 mM de cada oligonucleótido. Se usó 50 ng de ADN genómico purificado de los aislamientos por reacción.

Los ciclos de amplificación usados para REP-PCR fueron: una denaturación inicial de 95 °C por 7 minutos; seguidos de 30 ciclos de 90 °C por 30 segundos, 43 °C por 1 minuto, y 65 °C por 8 minutos, y una extensión final de 65 °C por 16 minutos.

Los ciclos de amplificación usados para ERIC-PCR fueron: una denaturación inicial de 95 °C por 7 minutos, seguido de 30 ciclos de denaturación a 94 °C por 1 minuto, temperatura de hibridación de 40 °C por 1 minuto, y una extensión de 65 °C por 8 minutos, con una extensión final de 65 °C por 16 minutos.

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, las condiciones de la electroforesis fueron 75 V por 2 horas en solución TAE 1X, los geles se tiñeron con bromuro de etidio, visualizados en una cámara de luz ultravioleta y fotografiados en una cámara automática MP4+ Polaroid (Polaroid Co. Waltham, MA).

Además, para cada experimento se usó como control el ADN genómico purificado de *B. henselae* y *B. vinsonii*.

ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE BANDAS

Para el análisis de los patrones de bandas obtenidas se usó el software *GelCompar 4.0* (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Los patrones producidos por ERIC-PCR y REP-PCR fueron comparados usando el coeficiente de correlación de Pearson, el cual considera el número de bandas y su intensidad. Se usó una tolerancia de 1,2% en la posición de las bandas tal como es para *B. henselae*⁹. Para el agrupamiento de los perfiles se usó el algoritmo UPGMA (siglas de unweighted to pair group method with arithmetic means).

Fueron considerados como un genotipo aquellos aislamientos cuyos perfiles se agruparon en un *cluster* que presentó una similitud superior a 75%.

RESULTADOS

Se obtuvieron perfiles o patrones de banda (fingerprints) usando REP-PCR y ERIC-PCR de los 17 aislamientos de *B. bacilliformis*. Cada perfil presentó múltiples bandas de amplificación. Usando REP-PCR se obtuvieron bandas con tamaños entre 500 pb y 3 500 pb, mientras que usando ERIC-PCR las bandas presentaron un tamaño entre 200 pb y 2 500 pb. Ambas técnicas producen perfiles muy complejos, REP-PCR produce un perfil más complejo (mayor número de bandas) que ERIC-PCR. Ambos sistemas produjeron resultados muy reproducibles en diferentes días, siendo aplicados por diferentes técnicos (datos no presentados).

Ambos métodos presentaron alto grado de resolución entre los aislamientos. Los aislamientos de *B. bacilliformis* fueron agrupados en grupos o *clusters* importantes y las cepas dentro de estos *clusters* presentaban un índice de similitud mayor a 75%. Las cepas de *B. henselae* y *B. vinsonii* que fueron usadas como controles se ubicaron fuera del grupo de cepas de *B. bacilliformis* (Figuras 1 y 2).

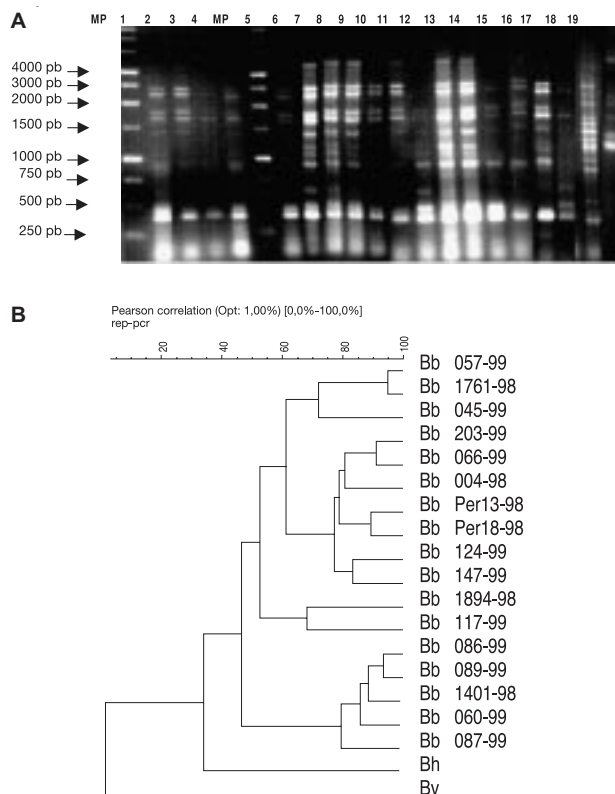


Figura 1. Perfiles obtenidos mediante REP-PCR (A) y dendrograma de similitud entre los perfiles (B) calculado por el programa *Gel Compar II* (Maths Applied). A. carril 1: 086-99, carril 2: 1401-99, carril 3: 087-99, carril 4: 060-99, carril 5: 089-99, carril 6: 057-99, carril 7: 1761-99, carril 8: 045-99, carril 9: 066-99, carril 10: 004-98, carril 11: 203-99, carril 12: Per13-98, carril 13: Per18-98, carril 14: 1894-98, carril 15: 117-99, carril 16: 147-99, carril 17: 124-99, carril 18 *B. henselae*, carril 19: *B. vinsonii*. MP, marcador de peso molecular 1 Kb ladder (Promega Co., Madison, WI). B. Bb, *Bartonella bacilliformis*; Bh, *Bartonella henselae* y Bv, *Bartonella vinsonii*.

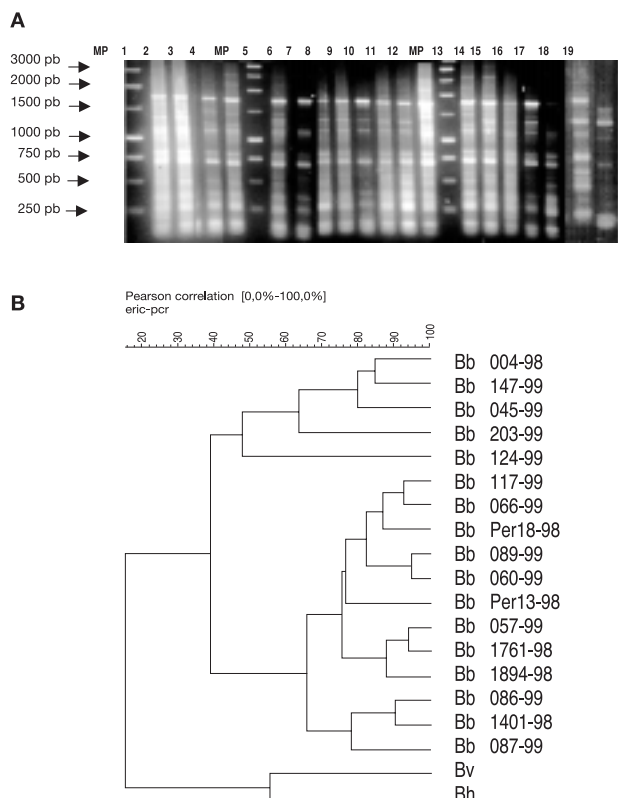


Figura 2. Perfiles obtenidos mediante ERIC-PCR (A) y dendrograma de similaridad entre los perfiles (B) calculado por el programa Gel comprar II (Maths Applied). A. carril 1: Per13-98, carril 2: Per18-98, carril 3: 066-99, carril 4: 117-99, carril 5: 147-99, carril 6: 124-99, carril 7: 086-99, carril 8:1401-99, carril 9: 087-99, carril 10: 060-99, carril 11: 089-99, carril 12: 1894-98, carril 13: 057-99, carril 14: 1761-99, carril 15: 045-99, carril 16: 004-98, carril 17: 203-99, carril 18: *B. henselae*, carril 19: *B. vinsonii*. MP, marcador de peso molecular 1 Kb ladder (Promega Co., Madison, WI). B. Bb, *Bartonella bacilliformis*; Bh, *Bartonella henselae* y Bv, *Bartonella vinsonii*.

Para clasificar mejor los aislamientos, los resultados tanto del ERIC-PCR como del REP-PCR se combinaron de la misma manera como se ha reportado para aislamientos de *B. henselae* y otras bacterias^{9,14-21}, lográndose obtener una agrupación de 10 genotipos (Tabla). Hubo una tendencia de los genotipos a estar asociados al área de origen de los aislamientos. Los genotipos D, E y H fueron detectados en Cusco, mientras que los genotipos B, C, G, J e I en Lima y el genotipo F en Ancash. El genotipo A fue ubicado tanto en Cusco como en Ancash.

DISCUSIÓN

El análisis de variabilidad genética usando los marcadores REP-PCR y ERIC-PCR han sido útiles para genotipificar varios géneros de bacterias¹⁴⁻²¹, siendo aplicados con éxito para caracterizar aislamientos de *B. henselae*⁸⁻¹⁰. Demostramos también su utilidad en la caracterización genética de aislamientos de *B. bacilliformis*, nuestros resultados son compatibles con otros hallazgos obtenidos por AFLP y secuenciamiento de genes⁷. Sin embargo, REP-PCR y ERIC-PCR son técnicas más fáciles de realizar, lo cual le otorga una ventaja frente a otras técnicas de genotipificación.

Los patrones de bandas obtenidos con REP-PCR presentaron mayor resolución (generaron más bandas) que aquellos obtenidos con ERIC-PCR, esto también fue observado en *B. henselae*⁹. Sin embargo, como se ha observado en otros microorganismos, es mejor combinar los resultados de ambos marcadores⁸⁻²¹.

Se pudo observar una gran variedad genética entre aislamientos de *B. bacilliformis*, pudiendo definirse 10 genotipos, los cuales se distribuyen en diversas áreas endémicas de Bartonelosis: los genotipos A, D, E y H en Cusco; los genotipos B, C, G, J y I en Lima; y los genotipos A y F en Ancash.

Sin embargo, debido al pequeño número de aislamientos analizados, no es posible determinar que sólo existan 10

Tabla. Resultados obtenidos mediante métodos de genotipificación de aislamientos de *B. bacilliformis*.

Nº	Código de aislamiento	Procedencia	Fecha de aislamiento*	Genotipo ERIC	Genotipo REP	Genotipo global
1	Per13-98	Cusco, Urubamba	5/98	E4	R3	A
2	Per18-98	Cusco, Urubamba	5/98	E4	R3	A
3	117-98	Lima	11/98	E4	R5	B
4	1894-98	Lima, Yauyos	11/98	E4	R4	C
5	004-98	Cusco, Urubamba	9/98	E1	R3	D
6	1401-98	Cusco, Calca	9/98	E5	R6	E
7	045-99	Ancash	1/99	E1	R2	F
8	057-99	Lima	2/99	E4	R1	G
9	060-99	Cusco, Urubamba	2/99	E4	R6	H
10	066-99	Ancash	2/99	E4	R3	A
11	086-99	Cusco, Quispicanchis	2/99	E5	R6	E
12	087-99	Cusco, Quispicanchis	2/99	E5	R6	E
13	089-99	Cusco, Quispicanchis	2/99	E4	R6	H
14	124-99	Lima	3/99	E3	R3	I
15	147-99	Cusco, Calca	4/99	E1	R3	D
16	203-99	Lima, Cañete	6/99	E2	R3	J
17	1761-99	Lima	11/99	E4	R1	G

(*) mes/año

genotipos de *B. bacilliformis* en el Perú, ni medir asociaciones entre los aislamientos y los datos epidemiológicos. Pero sí es posible determinar que durante el brote de Urubamba de 1998 circuló el genotipo A; mientras que los genotipos D, E y H estuvieron presentes en Cusco en 1999.

Aunque se ha observado diferencias en las manifestaciones clínicas de los casos en Cusco con respecto a otras zonas endémicas como Ancash o Lima⁶, no existe evidencia suficiente de que este fenómeno sea causado por diferencias en los aislamientos analizados de estas zonas, probablemente, estas manifestaciones clínicas sean explicadas por múltiples factores como el polimorfismo de los aislamientos, la variabilidad genética del vector y estado inmunológico de los pobladores peruanos.

La variabilidad genética de aislamientos de *B. bacilliformis* debe ser tomada en cuenta en futuros trabajos clínicos y epidemiológicos, en el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas y en el desarrollo de una vacuna para esta enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la ayuda y cooperación del Dr. José Bernable, de la Bióloga Karina Jaramillo y de la Bióloga Antonia Calvo por la obtención de las muestras para este estudio y también al Dr. Angel Rosas Aguirre.

REFERENCIAS

1. Maguiña C, Gotuzzo E. Bartonellosis. New and Old. Infect Dis Clin North Am 2000; 14(1): 1-22.
2. Ministerio de Salud. Doctrina, normas y procedimientos para el control de la Bartonelosis o enfermedad de Carrion en el Perú. Lima: MINSAL; 1998.
3. Maguiña C, García PJ, Gotuzzo E, Cordero L, Spach DH. Bartonellosis (Carrion's disease) in the modern era. Clin Infect Dis 2001; 33(6): 772-9.
4. Cooper P, Guderian R, Paredes W, Daniels R, Perera D, Espinel M, et al. Bartonellosis in Zamora Chinchipe province in Ecuador. Trans R Soc Trop Med Hyg 1996; 90(3): 241-3.
5. Alexander B. A review of bartonellosis in Ecuador and Colombia. Am J Trop Med Hyg 1995; 52(4): 354-9.
6. Ellis BA, Rotz LD, Leake JA, Samalvides F, Bernable J, Ventura G, et al. An outbreak of acute bartonellosis (Oroya fever) in the Urubamba region of Peru, 1998. Am J Trop Med Hyg 1999; 61(2): 344-9.
7. Birtles RJ, Fry NK, Ventosilla P, Caceres AG, Sanchez E, Vizcarra H, et al. Identification of *Bartonella bacilliformis* genotypes and their relevance to epidemiological investigations of human bartonellosis. J Clin Microbiol 2002; 40(10): 3606-12.
8. Dehio C, Lanz C, Pohl R, Behrens P, Bermond D, Piemont Y, et al. *Bartonella schoenbuchii* sp. nov., isolated from the blood of wild roedeer. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51(Pt 4): 1557-65.
9. Sander A, Ruess M, Bereswill S, Schuppler M, Steinbrueckner B. Comparison of different DNA fingerprinting techniques for molecular typing of *Bartonella henselae* isolates. J Clin Microbiol 1998; 36 (10): 2973-81.
10. Sander A., Bühler C, Pelz K, von Cramm E, Bredt W. Detection and isolation of two *Bartonella henselae* variants in domestic cats in Germany. J Clin Microbiol 1997; 35(3): 584-7.
11. Rodriguez-Barradas MC, Hamill RJ, Houston ED, Georghiou PR, Clarridge JE, Regnery RL, et al. Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. J Clin Microbiol 1995; 33(5): 1089-93.
12. Norman AF, Regnery R, Jamenson P, Greene C, Krause DC. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. J Clin Microbiol 1995; 33(7): 1797-803.
13. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 1991; 19(24): 6823-31.
14. Wong HC, Lin CH. Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. J Clin Microbiol 2001; 39(12):4233-40.
15. Herman L, Heyndrickx M. The presence of intragenically located REP-like elements in *Bacillus sporothermodurans* is sufficient for REP-PCR typing. Res Microbiol 2000; 151(4):255-61.
16. Wieser M, Busse HJ. Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. Int J Syst Evol Microbiol 2000; 50 Pt 3: 1087-93.
17. De la Puente-Redondo VA, del Blanco NG, Gutierrez-Martin CB, Garcia-Pena FJ, Rodriguez-Ferri EF. Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. J Clin Microbiol 2000; 38(3): 1016-22.
18. Jersek B, Gilot P, Gubina M, Klun N, Mehle J, Tcherneva E, et al. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. J Clin Microbiol 1999; 37(1):103-9.
19. Appuhamy S, Coote JG, Low JC, Parton R. PCR methods for rapid identification and characterization of *Actinobacillus seminis* strains. J Clin Microbiol 1998; 36(3): 814-7.
20. Appuhamy S, Parton R, Coote JG, Gibbs HA. Genomic fingerprinting of *Haemophilus somnus* by a combination of PCR methods. J Clin Microbiol 1997; 35(1): 288-91.
21. Tcherneva E, Rijpens N, Naydensky C, Herman L. Repetitive element sequence based polymerase chain reaction for typing of *Brucella* strains. Vet Microbiol 1996; 51(1-2): 169-78.