

# COOPERACIÓN EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA: BARTONELOSIS, ENFERMEDAD ENDÉMICA DEL PERÚ

*Luís Javier del Valle Mendoza*

---

## 1. Introducción:

La Enfermedad de Carrión, es causada por la bacteria *Bartonella bacilliformis*, que se transmite por varias especies del insecto vector del género *Lutzomyia*. No se conoce ningún reservorio animal, aparentemente el hombre es el único. Es una enfermedad endémica en el Perú y actualmente es considerada como re-emergente debido a que su área geográfica de ocurrencia se viene expandiendo. Es importante estudiar marcadores moleculares que sirvan para el diseño de métodos de diagnóstico rápido, efectivos de mayor sensibilidad y especificidad que los actuales, así como evaluar los antibióticos recomendados como medidas terapéuticas contra esta enfermedad, e investigar sobre las proteínas antigénicas de esta bacteria a fin de seleccionar antígenos candidatos para desarrollar una vacuna contra la enfermedad.

## 2. Objetivos:

El objetivo general de nuestros estudios relacionados a la Bartonelosis causada por *Bartonella bacilliformis* es contribuir en el control de la enfermedad. Para ello, se han propuestos 3 objetivos específicos:

- 1) Evaluar la validez del gen *ialB* que codifica la proteína de invasión IalB como marcador específico para la identificación de *Bartonella bacilliformis* (objetivo en el ámbito de diagnóstico de la enfermedad).
- 2) Determinar la resistencia o susceptibilidad a quinolonas en cepas de *Bartonella bacilliformis* (objetivo en el ámbito del tratamiento).
- 3) Establecer la antigenicidad de la proteína de invasión (IalB) y flagelina (FlaA) de *Bartonella bacilliformis* expresadas como proteínas recombinantes (objetivo en el ámbito de la prevención).

## 3. Mapa o diagrama causal:

En el Perú, en los últimos años la Enfermedad de Carrión se ha expandido a nuevas áreas de transmisión, con reportes de brotes durante los años 2006 y 2007 en ciertos departamentos, tales como Lima, Ayacucho, Puno, La Libertad y Cajamarca. Siendo preocupante que a pesar de la endemidad y casuística, hasta la fecha no existan medidas eficaces que permitan diagnosticar, controlar y prevenir la Enfermedad de Carrión.

El estudio genómico y proteómico de *B. bacilliformis* es necesario para evaluar si existe algún gen en la bacteria, que pueda ser usado como marcador específico, según sea o no único de la especie, puede ser aprovechado para

desarrollar métodos de diagnóstico rápido o mejorar las pruebas de laboratorio existentes, de tal forma que el personal de salud tenga a su disposición técnicas más sensibles, específicas y reproducibles que conlleven a un diagnóstico seguro en un menor tiempo.

El manejo terapéutico de la Enfermedad de Carrión se ha diseñado principalmente en base a la evaluación de la respuesta frente a un antibiótico en una serie de casos clínicos sin tener un grupo testigo. Hasta la fecha no se ha realizado un ensayo clínico, doble ciego y randomizado para evaluar la eficacia de un antibiótico sobre otro. De igual modo, son escasos los estudios que demuestran la resistencia *in-vitro* de *B. bacilliformis* a los antibióticos y exclusivamente en base de la experiencia clínica se sabe que cada vez es más frecuente la falla terapéutica del cloramfenicol y de rifampicina. Por esta razón se recomienda que la administración de los antibióticos sea supervisada por el personal de salud y que se asegure el tratamiento completo y en forma gratuita en el 100% de los casos. Frente a estos reportes de resistencia antimicrobiana es que el Instituto Nacional de Salud del Perú (INS) indica un esquema de uso de antibióticos para el tratamiento de la enfermedad, consistiendo básicamente en ciprofloxacino [1], pero existen casos en los que se vuelve a presentar la sintomatología de la fase aguda (bacteriemia) persistiendo por largo tiempo. Sin embargo, se ha demostrado *in-vitro* que estos antibióticos pueden producir fácilmente mutación en *B. bacilliformis*, en comparación con doxiciclina y gentamicina, que serían candidatos alternativos más adecuados para disminuir el porcentaje de adquisición de resistencia antimicrobiana. Por ello, la revisión de los niveles de sensibilidad a ciprofloxacino y su relación con determinadas mutaciones, contribuirán a mejorar el tratamiento de la Enfermedad de Carrión y la vigilancia de la resistencia a antimicrobianos.

Por otro lado, el estudio de proteínas recombinantes de *B. bacilliformis*, que tengan propiedades antigénicas podrán servir como potenciales inmunógenos capaces de inducir respuesta inmune. Este hallazgo será de utilidad para investigaciones orientadas a diseñar a futuro una vacuna recombinante, que sea útil para el control y prevención de esta enfermedad endémica en el Perú.

Este panorama de la Enfermedad de Carrión, plantea de forma indispensable y necesaria realizar investigaciones que permitan diagnosticar, controlar y prevenir esta enfermedad endémica del Perú. En este sentido, la Universidad Politécnica de Cataluña conjuntamente con la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima, Perú), hemos desarrollado algunos proyectos de investigación relacionados al estudio de *B. bacilliformis* para el control de la Bartonelosis en el Perú. Por consiguiente, se considera que la información que se obtenga a partir de la investigación básica en relación a la biología de la bacteria *B. bacilliformis*, servirá de base para mejorar los planteamientos sobre el diagnóstico clínico, esquemas de tratamiento antimicrobiano y otras medidas preventivas, que contribuirán a la vigilancia y lucha contra la infección por *B. bacilliformis*.

#### **4. Exposición del contenido básico:**

La Enfermedad de Carrión es un proceso infeccioso general, no contagioso, causado por la bacteria *B. bacilliformis*, la que se transmite a través de la picadura de varias especies aladas del insecto vector del género *Lutzomyia*, de las cuales la principal especie es *Lutzomyia verrucarum*. Es una enfermedad endémica del Perú, cuyas tasas de incidencia reportadas han fluctuado a lo largo de varias décadas, siendo las Direcciones de Salud de Ancash, Jaén y La Libertad las que actualmente tienen las tasas de incidencia más altas [2,3]. En las áreas endémicas, el 60% o más de la población son seropositivos a la bacteria, y entre 5 a 10% sufren la enfermedad [4]. A pesar del tratamiento antimicrobiano, los reportes de letalidad oscilan entre 7,7 y 15%, incrementándose hasta 30 – 60% cuando hay compromiso neurológico. En las poblaciones no tratadas, la letalidad ha alcanzado un 88% [5].

Clínicamente, esta enfermedad presenta un primer estadio o fase aguda denominada “fiebre de la Oroya”, en donde *B. bacilliformis* invade el eritrocito humano ocasionando una etapa febril anémica de gran gravedad. Si el individuo sobrevive a este estadio, después de un periodo intercalar de duración variable, se presenta la fase eruptiva llamada “verruca peruana”, caracterizada por el desarrollo de erupciones de magnitud diversa, con lesiones de diferente tamaño y profundidad, cuya localización, además de la tumentaria, puede comprometer órganos internos [6-8]

En la actualidad, la Enfermedad de Carrión es considerada una enfermedad re-emergente y una de las enfermedades metaxénicas más importantes en el Perú [3]. Esta situación se ha producido después de los brotes ocurridos en las regiones andinas durante los años 1992-93 y 1998-99, los cuales probablemente están relacionados con otras enfermedades metaxénicas, y con los cambios climatológicos ocasionados por la presencia del fenómeno El Niño. A pesar de esta situación, hasta la fecha no existen medidas de control y prevención eficaces contra esta enfermedad. Frecuentemente, la prevención se ha limitado a la fumigación con DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) para eliminar la población del insecto vector de la bacteria. Sin embargo, la enfermedad se ha mantenido, produciéndose rebrotes ocasionados probablemente por la resistencia del vector al insecticida [9]. Por otro lado, no se acepta la quimioprofilaxis con antibióticos como medida preventiva [5]. A pesar de todos estos antecedentes, hasta el momento no se ha desarrollado una vacuna para prevenir la Enfermedad de Carrión, ni hay publicaciones de trabajos realizados con esta finalidad, y los estudios acerca de los antígenos de *B. bacilliformis* son escasos.

Por otro lado, existen diversas dificultades para un adecuado diagnóstico de la bacteria, básicamente porque no se tienen estandarizadas técnicas más sensibles, específicas y rápidas que las que se vienen utilizando en la detección de este patógeno. La técnica de diagnóstico más empleada es un frotis de sangre, el que tiene baja sensibilidad, y requiere ser confirmado por un hemocultivo, que si bien es más sensible y específico, se lleva a cabo en un promedio de 15 días, alcanzando hasta 45 días antes de ser descartados como negativos [1,10]. Las pruebas de diagnóstico que se emplean en los laboratorios de los centros de salud, no han sido mejoradas, y ello se debe a que no se conocen marcadores específicos (proteínas, secuencias de DNA,

etc.) que podrían ser utilizados en técnicas más eficientes y sensibles (e.g. ELISA, PCR, etc.). Se suma a este problema el inadecuado entrenamiento del personal de salud, la falta de información en la población para reconocer los signos y síntomas, la ubicación geográfica de las poblaciones expuestas, los factores económicos y culturales de las mismas. Toda esta situación entorno al diagnóstico de la Enfermedad de Carrión influye de manera importante en los altos índices de letalidad de la enfermedad.

Frente a la ausencia de una vacuna contra *B. bacilliformis*, el tratamiento antimicrobiano de la Enfermedad de Carrión es de crucial interés. Hasta la fecha existen muy pocas investigaciones sobre la susceptibilidad antimicrobiana en aislados clínicos de *B. bacilliformis*, tampoco hay publicaciones donde se detalle alguna metodología estandarizada y reproducible para su determinación *in-vitro*. Diferentes agentes antibacterianos han sido usados para el tratamiento de infecciones por *B. bacilliformis*, tales como la eritromicina, cloramfenicol, rifampicina entre otros [11,12]. Recientemente en el Perú, para el tratamiento de la Enfermedad de Carrión, las quinolonas en su forma de fluoroquinolona (e.g. ciprofloxacino) fue pautado como antibiótico de primera y/o segunda línea de tratamiento según el caso de la enfermedad [1,11,13]. Las quinolonas son una familia de antibióticos sintéticos de amplio espectro que se caracterizan por su buena penetración intracelular y por esta razón son usados en el tratamiento de infecciones debidas a patógenos intracelulares [14]. Las quinolonas actúan inhibiendo la acción de la DNA girasa (topoisomerasa II) y topoisomerasa IV. La DNA girasa es una enzima tetramérica compuesta por 2 subunidades A y dos subunidades B (A2B2), las cuales son codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente. Las subunidades de la topoisomerasa IV están codificadas por los genes *parC* y *parE* [15].

La administración de ciprofloxacino para el tratamiento de la Enfermedad de Carrión en fase aguda y eruptiva ha sido descrita desde el 2001. Aparentemente, el tratamiento contra la infección por *B. bacilliformis* usando ciprofloxacino había sido exitoso [7,12]. Sin embargo, hasta la actualidad no hay resultados publicados acerca de la experiencia de este tratamiento, además se han encontrado aislados de *B. bacilliformis* resistentes *in-vitro* a ciprofloxacino, sugiriéndose que esta resistencia podría ocurrir en forma natural y sería necesario realizar nuevas pruebas con un mayor número de cepas de origen clínico. Al respecto se ha propuesto que concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de ácido nalidíxico podría ser usado como un marcador genérico de resistencia para la familia de quinolonas en bacterias Gram negativas [15]. Por otro lado, se ha demostrado la existencia de *B. bacilliformis* resistentes a rifampicina y eritromicina [16].

En los últimos años, se han realizado algunas investigaciones relacionadas con aspectos epidemiológicos, clínicos, serológicos, invasión a eritrocitos y otros, para entender la historia natural, patología y biología molecular de las especies de *Bartonella*. Así, mientras la información desarrollada acerca de estos puntos es relativamente extensa, el avance de los conocimientos inmunológicos con respecto a *B. bacilliformis* y en general a las especies de *Bartonella* es escaso. Se conoce muy poco acerca de las macromoléculas de *B. bacilliformis* que

pueden tener capacidad antigénica e inducir respuesta inmune humoral y/o celular; además, los mecanismos inmunológicos que ocurren en el huésped infectado son desconocidos [17].

Por otro lado, se conocen algunas proteínas de *B. bacilliformis* que por su estructura y/o función son interesantes y podrían potencialmente tener capacidad antigénica para inducir respuesta inmune. La evaluación de estas proteínas como potenciales inmunógenos es condición indispensable para desarrollar a futuro una vacuna contra la Enfermedad de Carrión. El cultivo *in-vitro* de *B. bacilliformis* es costoso y el crecimiento bacteriano es escaso y lento, lo que dificulta la extracción y la purificación de proteínas en cantidades suficientes para realizar estudios inmunológicos. Por ello, se ha planteado como método alternativo la obtención de proteínas recombinantes de *B. bacilliformis* expresadas en *E. coli*, para evaluar sus potencialidades como inmunógenos.

Recientemente se ha renovado en el Perú y a nivel internacional, el interés en el estudio de este patógeno a nivel epidemiológico, clínico terapéutico e inmunológico. Una de las razones que motivan este interés científico es el incremento de la incidencia y su aparición en lugares que antes no reportaban la enfermedad, por ejemplo, la costa peruana. Otras razones son el hecho de que la Bartonelosis humana producida por *B. bacilliformis* comparte características histopatológicas con otras enfermedades como la angiomatosis bacilar, causada por otras Bartonelas; las características de ser un microorganismo que infecta intracelularmente, etc. Este panorama de la Enfermedad de Carrión, plantea de forma indispensable y necesaria realizar investigaciones que permitan diagnosticar, controlar y prevenir esta enfermedad endémica del Perú.

## **5. Resultados:**

### **5.1. Marcadores moleculares y diagnóstico de *Bartonella bacilliformis*.**

El diagnóstico directo de *B. bacilliformis*, tanto en fase aguda como en fase tisular, es básicamente a través del frotis de sangre periférica y coloración con los derivados de Leishman, Romanosky, Giemsa o Wright. En las preparaciones se puede observar hasta un 100% de parasitismo de los glóbulos rojos, observando formas bacilares (jóvenes), cocoides (viejas) o cocabacilares. Sin embargo la sensibilidad de esta prueba, es muy variable y baja (30-70% en fase hemática y menos del 10% en fase verrucosa), necesitando ser confirmada por el aislamiento bacteriológico, a través de hemocultivos de sangre total o cultivos de biopsias en medios especiales [5,10].

Técnicas histológicas, inmunohistoquímicas, microbiológicas y serológicas, tales como la detección de anticuerpos, inmunoblot, western blot, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y hemocultivo, son métodos utilizados en el diagnóstico del patógeno que tienen una mejor sensibilidad y especificidad. Sin embargo las pruebas serológicas constituyen la forma más frecuente de diagnóstico, usando para ello inmunofluorescencia indirecta (IFA) e

inmunoabsorción ligadas a enzimas (ELISA), pero se han encontrado en algunos casos reacciones cruzadas con especies del género *Chlamydia* y con *Coxiella burnetti* [18-22].

Se han propuesto varios métodos por PCR para el diagnóstico de *B. bacilliformis*, tales como PCR- Nested, PCR-RFLP, entre otros, los cuales se basan en la detección del gen de la citrato sintasa (*gltA*), genes 16S y 23S del *RNAr*, secuencia intergénica 16S-23S del *RNAr* (ITS), gen  $\alpha$  de la riboflavina sintasa (*ribC*), genes de las proteínas de shock térmico (*groEL*), proteínas que codifica la división celular (*ftsZ*) y gen de la sub-unidad  $\beta$  de la RNA polimerasa (*rpoB*) [23-27]. Sin embargo estas pruebas no están diseñadas para el diagnóstico específico de *B. bacilliformis* en muestras clínicas, además que muchos de estos métodos requieren de una etapa de digestión de los productos de amplificación con enzimas de restricción o de la amplificación y posterior secuenciación del gen para la identificación de la especie de *Bartonella*. Estos métodos de diagnóstico significan etapas adicionales que encarecen y retardan el diagnóstico [24,28].

Recientemente, el gen *ialB* que codifica la proteína de invasión IalB fue propuesto como marcador específico para la detección por PCR de *B. bacilliformis* [24]. Sin embargo, nuestros resultados utilizando cebadores para amplificar gen *ialB* completo por PCR produce un amplicon de 558 pb a partir de DNA genómico obtenido de 5 cepas diferentes de *B. bacilliformis*. La especificidad de los cebadores fue probada con DNA genómico de otras Bartonelas (*B. henselae*, *B. vinsonii* subsp. *vinsonii*, *B. elizabethae*, *B. clarridgeiae*, y *B. bovis*), en este ensayo se demostró que *B. clarridgeiae* CIP 104772 también presenta la secuencia específica para el gen *ialB*. Este resultado indicaría que el gen *ialB* no es un marcador específico de *B. bacilliformis*, y en este sentido, no se puede realizar un diagnóstico específico mediante la detección por PCR del gen *ialB*.

## **5.2. Resistencia antimicrobiana de *Bartonella bacilliformis***

La fase hemática de la enfermedad usualmente era tratada con mucho éxito con el cloramfenicol, y la fase tisular con estreptomycinina o rifampicina. Sin embargo, esos regímenes de antibióticos habían sido determinados empíricamente y las susceptibilidades antibióticas *in-vitro* no se habían caracterizado. Según nuevos reportes, entre las fluoroquinolonas, el ciprofloxacino había sido usado satisfactoriamente en un número limitado de pacientes [5,29].

Nosotros hemos evaluado la resistencia de *B. bacilliformis* a quinolonas. Tres cepas de un total de 5 presentaron una MIC para ciprofloxacino de 0.125 a 0.25  $\mu\text{g/mL}$ , lo cual se debe interpretar como cepas con sensibilidad disminuida, ya que no existe un punto de corte establecido para las especies de *Bartonella*, a diferencia de *E.coli*, donde se considera resistente a ciprofloxacino, si la MIC es mayor o igual a 2. Así, los valores obtenidos para las cepas de *B. bacilliformis* sugiere una pobre interacción entre ciprofloxacino y sus blancos. Se han descrito substituciones de aminoácidos involucrados en el desarrollo de resistencias a quinolonas en *E. coli*, ubicadas en la QRDR (región determinante

de resistencia a quinolonas) de los genes *gyrA* y *parC*. La presencia de una sola mutación en la QRDR del gen *gyrA* usualmente resulta en altos niveles de resistencia a ácido nalidíxico (Nal), pero para obtener altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas se requiere la presencia de mutaciones adicionales en *gyrA* o en otro blanco como *parC* [15]. Un estudio sobre la frecuencia de mutaciones que confieren resistencia a fluoroquinolonas en *B. bacilliformis* sugiere que esta resistencia estaría principalmente establecida por mutaciones puntuales a nivel de la QRDR, cerca al amino terminal de las subunidades A de la DNA girasa (GyrA) y topoisomerasa IV (ParC) [30].

Nuestros resultados en *B. bacilliformis* demuestran la presencia de una alanina (Ala) como el aminoácido silvestre en la posición 91 de la proteína GyrA, equivalente al 83 de *E. coli*. Además, el análisis de la secuencia completa del DNA de *B. bacilliformis* (GeneBank: NC 008783) reveló que el gen *parC* también codifica una Ala en la posición 85, equivalente a la posición 80 de *E. coli* [30]. Los aminoácidos en posición 83 de GyrA y 80 de ParC son las principales mutaciones relacionadas con la adquisición de resistencia a quinolonas en *E. coli*, y de manera general en cualquier microorganismo estudiado [15]. En este sentido, en lo concerniente a *E. coli* se ha descrito que la presencia de Ala en posición 83 de GyrA resulta en un incremento notable en la concentración mínima inhibitoria (MIC) para ciprofloxacino, y en cuanto a la resistencia frente a ácido nalidíxico, ésta es afectada en bajos niveles [31-33]. Este hecho se ha relacionado con los mecanismos de interacción propuestos entre las quinolonas y sus blancos [15].

Nuestros resultados pueden explicar molecularmente los casos de falla terapéutica en los cuales ciprofloxacino fue el antibiótico de elección contra *B. bacilliformis*. En este sentido, es necesario en diferentes áreas endémicas del Perú, diseñar y realizar estudios prospectivos con un número mayor de cepas clínicas aisladas a partir de casos complicados y no complicados comprobados por frotis, cultivo y pruebas moleculares. Este tipo de estudio es una necesidad desde el uso de los antibióticos en la lucha contra *B. bacilliformis*.

### **5.3. Antigenicidad de *Bartonella bacilliformis***

Hasta la actualidad, no se han reportado estudios sobre la antigenicidad de *B. bacilliformis*, se desconocen los inductores de respuesta inmune humoral y/o celular en los individuos afectados con la Enfermedad de Carrión. Por otro lado, se ha demostrado la importancia del flagelo de *B. bacilliformis* para la invasión del eritrocito *in-vitro* [34,35]. El componente principal del flagelo de *B. bacilliformis* fue caracterizado como una proteína de 42 kDa llamada flagelina [6]. Los ensayos *in-vitro* de invasión al eritrocito humano realizados con Bartonellas expuestas a anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra la flagelina, mostraron una disminución significativa tanto en la asociación como en la invasión a eritrocitos humanos, lo que sugiere que los flagelos son un componente importante en la invasividad de *B. bacilliformis* y puede actuar sinérgicamente con la deformina para facilitar la entrada de la bacteria dentro de las invaginaciones celulares que produce la deformina [35].

Por otro lado, se ha determinado que *B. bacilliformis* tiene un locus denominado *ialAB*, que contiene los genes *ialA* e *ialB*, cuyos productos de 170 y 186 aminoácidos, respectivamente, son indispensables para la invasión de *B. bacilliformis* al eritrocito humano. La mutagénesis de *ialB* reduciría hasta 47 a 53% los niveles de asociación bacteriana e invasión al eritrocito humano. *IalB* es una proteína de membrana interna del patógeno [36]. El locus de invasión *ialA* codifica la proteína *IalA* que tiene actividad de dinucleósido polifosfato hidrolasa e hidrolisa diadenosina y diguanosina, con ello contribuye a reducir los niveles de stress mejorando la sobrevivencia bacteriana [37,38].

En este sentido, tanto la flagelina (*FlaA*) y proteína de invasión *IalB* son elementos moleculares importantes para que *B. bacilliformis* pueda invadir a sus células hospederas. Nosotros hemos clonado los genes completos de *flaA* e *ialB* que codifican para estas proteínas y los hemos expresado en *E. coli* para producir proteína recombinante. Estas proteínas fueron inoculadas a conejos obteniéndose respuesta humoral en ambos casos. Los sueros policlonales obtenidos han demostrado ser reactivos en ELISA y western-blot. De esta forma, la preparación de antígenos por tecnología del DNA recombinante es potencialmente prometedora por sus alcances para el desarrollo de una vacuna con *B. bacilliformis*.

## 6. Conclusiones:

Existe la necesidad de establecer un método de detección de *B. bacilliformis* que sea específico, sensible y rápido. Este método de diagnóstico contribuirá a establecer la verdadera casuística de la enfermedad, eliminando los posibles falsos positivos y negativos de la enfermedad.

La falla terapéutica del tratamiento de la enfermedad con antimicrobianos, alienta la investigación sobre la susceptibilidad y resistencia antimicrobiana, para establecer los mecanismos moleculares de estas fallas. Estos estudios deberán ser realizados sobre una amplia variedad de cepas aisladas de casos clínicos y considerando cepas aisladas de todas las zonas geográficas donde se reporta la enfermedad. Existe la necesidad de establecer protocolos de tratamiento basados en las evidencias experimentales de susceptibilidad antimicrobiana.

El desarrollo de una vacuna contra la Bartonelosis producida por *B. bacilliformis* requiere establecer las proteínas bacterianas con mayor capacidad antigénica. Para ello, se necesita realizar un estudio proteómico de la bacteria en sus diferentes células hospederas.

Finalmente, el control integral de la Enfermedad de Carrión en sus aspectos de diagnóstico, tratamiento y prevención requiere de estudios de corte epidemiológico para lo cual es necesario contar con una amplia y variada de colección de cepas clínicas de *B. bacilliformis*. La libre disponibilidad de un cepario de *B. bacilliformis* facilitara el desarrollo de la lucha contra la Bartonelosis producida por *B. bacilliformis*.



## **Agradecimientos:**

Este trabajo ha sido realizado con ayudas: del Centre de Cooperació per el Desenvolupament (CCD) de la Universitat Politècnica de Catalunya entre los años 2005-2008; Agència Catalana de Cooperació al Desenvolupament (ACCD, Convocatoria U2006); Programa de Cooperación Interuniversitaria de la Agencia Española de Cooperación para el Desarrollo (AECID) (A/3795/05, A/4892/06, A/9727/07).

## **7. Bibliografía:**

- [1] MINSA (Ministerio de Salud, Perú). 2006. Norma Técnica de salud para la Atención de la Bartonelosis o Enfermedad de Carrión en el Perú. Norma N° 048-MINSA/DGSP-V.01. Lima, Perú.
- [2] Boletín Epidemiológico. 2004. Ministerio de Salud del Perú. Oficina General de Epidemiología. Semanal N° 09. Lima, Perú.
- [3] Boletín Epidemiológico. 2007. Órgano oficial de difusión técnica de la Dirección General de Epidemiología y la Red Nacional de Epidemiología (RENACE). Ministerio de Salud, Lima-Perú. Vol (16): 22.
- [4] Knobloch, J. et al. 1985. Trop. Med. Parasitol. 36 (4):183-185.
- [5] Maguiña, C. 1998. Bartonelosis o Enfermedad de Carrión. Nuevos aspectos de una vieja enfermedad. A.F.A. Editores Importadores S. A., Lima, Perú.
- [6] Ihler, G. 1996. FEMS Microbiol Letters. 144: 1-11.
- [7] Maguiña, C. and Gotuzzo, E. 2000. Infect. Dis. Clin. N. Am. 14:1-22.
- [8] Burstein, Z. and Mayta, P. 2007. Rev Peru Med Exp Salud Pública 24(2): 103-106.
- [9] Krueger, C.M. et al. 1995. J. Bacteriol. 177(24):7271– 7274.
- [10] Ventura, G. y Padilla, C. 2006. Diagnóstico bacteriológico de la bartonelosis humana o enfermedad de Carrión. Ministerio de Salud – Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.
- [11] MINSA (Ministerio de Salud, Perú). 2003. Normas técnicas para el diagnóstico y atención curativa de la Bartonelosis o Enfermedad de Carrión en el Perú. Lima, Perú.
- [12] Rolain, J.M. et al. 2004. Antimicrob Agents Chemother 48:1921-1933.
- [13] Tarazona, A. et al. 2006. Rev Peru Med Exp Salud Pública 23:188-200.
- [14] Roig, J. et al. 2006. Med Mal Infect. 36: 680-689.
- [15] Ruiz, J. 2003. J Antimicrob Chemother. 51: 1109-1117.

- [16] Biswas, S. et al. 2007. *J Antimicrob Chemother* 59:1065-1070.
- [17] Karem, K. L. 2000. *Critic Rev in Microbiol* 26(3):133-145.
- [18] Birtles, R. et al. 2000. *Mol Cell Probes* 14 (2):79-87.
- [19] Chamberlin, J. et al. 2000. *J Clin Microb* 38(11): 4269-4271.
- [20] Mallqui, V. et al. 2000. *Clin and Diagnostic Laboratory Immun* 7 (1): 1-5.
- [21] Huarcaya, E. et al. 2003. *Rev Diagnóstico* 42 (3): 513-516.
- [22] Padilla, C. et al. 2006. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 23(3): 182-187.
- [23] Padilla, C. et al. 1998. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 15 (1-2): 34-36.
- [24] Padilla C. y Ventura G. 2003. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 20(1): 5-8.
- [25] Renesto, P. et al. 2001. *J Clin Microbiol* 39 (2): 430-437.
- [26] Henríquez, C. et al. 2002. *Rev Med Hered* 13 (2): 58-63.
- [27] Callison, J. et al. 2005. *Gene* 359: 53 – 62.
- [28] Blanco, J. y Raoult, D. 2005. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 23(5): 313-320.
- [29] Sobraques, M. et al. 1999. *Antimicrob Agents Chemother*. 43: 2090-2092.
- [30] Minnick, M.F. et al. 2003. *Antimicrob Agents Chemother*. 47 (1): 383-6.
- [31] Tavio, M.M. et al. 1999. *J Antimicrob Chemother* 44: 735-742.
- [32] Vila, J. et al. 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1731-1733.
- [33] Vila, J. et al. 2001. *J Med Microbiol* 50: 996-1000.
- [34] Benson, L. et al. 1986. *Infect Immun* 54 (2): 347-353.
- [35] Scherer, D.C. et al. 1993. *Infect Immun* 61: 4962 – 71.
- [36] Mitchell, S. and Minnick, M. 1995. *Infect Immun* 63:1552- 62.
- [37] Conyers, G. B. and Bessman, M. J. 1999. *J Biol Chem* 274: 1203-1206.
- [38] Cartwright, J.L. et al. 1999. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 474 – 479.