

Identificación de *Bartonella bacilliformis* por métodos moleculares.

HENRÍQUEZ César, INFANTE Berónica, MERELLO Jenny, GAL LINO María, SANTIVÁÑEZ Livia, MAGUIÑA VARGAS Ciro, GUERRA ALLISON Humberto, BIRTLES Richard y VENTOSILLA Palmira.

SUMMARY

Background: The PCR methodology amplifies a sequence of DNA with the Polymerase enzyme; the sensitivity and specificity is very high. **Objective:** To develop a PCR methodology designed to work on extracts from whole blood samples rather than from isolated, cultured organisms. **Methods.** The whole blood of six patients with clinical and microbiologic diagnosis of acute bartonellosis by *B. bacilliformis* was used. The DNA was extracted with DNAZOL® BD (lysis solution with guanidine detergent), and the extract subjected to PCR using primers 16S and 23S for the Intergenic Transcribed Spacer (ITS). The amplified products were subjected to electrophoresis on 1% agarose gels. **Results:** The concentration of the extracted product with DNAZOL® BD was around 6 ng. The amplified single sized product of 1000 base pairs was identical to that from authentic cultures of *B. bacilliformis* and clearly different from that of other species. The dilutions detected by PCR were 1/5 and 1/10. **Conclusion:** The amplification of the DNA of *B. bacilliformis* extracted with DNAZOL® BD from whole blood of patients with acute bartonellosis using the primers 16S and 23S is possible using this method for a fast etiologic diagnosis. (*Rev Med Hered* 2002; 13: 58-63).

KEY WORDS: PCR, *Bartonella bacilliformis*, DNA ZOL® BD, 16S 23S.

RESUMEN

Introducción: La técnica de PCR amplifica una secuencia de ADN con la enzima polimerasa; es muy sensible y específica. **Objetivo:** Estandarizar una técnica de PCR para identificar *Bartonella bacilliformis* en sangre total de pacientes con bartonellosis aguda. **Material y métodos:** Se usó muestras de sangre total de seis pacientes con diagnóstico clínico y microbiológico de bartonellosis aguda. Se extrajo el ADN de sangre total usando el detergente guanidina DNAZOL® BD. Se amplificó el ADN usando los cebadores de extensión "primers" 16S y 23S del espaciador de transcripción interna (ITS). Se hizo electroforesis de los productos de amplificación en gel de agarosa. Se compararon los pesos moleculares de las bandas observadas en la electroforesis con un marcador de 100 pares de bases. **Resultados:** Se determinó que la concentración de ADN extraído por DNAZOL® BD corresponde alrededor de 6 ng de ADN. El producto amplificado de muestras de sangre total fue alrededor de 1000 pares de bases, idéntico al extraído de los hemocultivos de *B. bacilliformis* y claramente diferente del de otras especies. Las diluciones de las extracciones mejor detectadas por PCR fueron 1/5 y 1/10. **Conclusiones:** El ADN de *B. bacilliformis* extraído con DNAZOL® BD de sangre total de pacientes con bartonellosis aguda es amplificado por PCR utilizando los primers 16S y 23S; es posible usar esta técnica para el diagnóstico etiológico rápido. (*Rev Med Hered* 2002; 13: 58-63).

PALABRAS CLAVE: PCR, *Bartonella bacilliformis*, DNA ZOL® BD, 16S 23S.

* Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt". Universidad Peruana Cayetano Heredia. Laboratorio B: Bacteriología Experimental. Laboratorio C: Biología Molecular.

INTRODUCCION

Bartonella bacilliformis es una bacteria aeróbica Gram negativa, pleomórfica, móvil, que mide 2-3 μm de largo y 0.2 - 0.5 μm de ancho (1,2,3). Penetra y parasita glóbulos rojos, teniendo forma bacilar, cocoide o cocobacilar. Dichas formas se colorean con tinción Wright, Giemsa y Leishman (4,5,6).

B. bacilliformis es el agente etiológico de la Bartonelosis humana, enfermedad de Carrión o Verruga Peruana (7,8,9). Esta es una enfermedad infecciosa, oriunda del Perú, Colombia y Ecuador, que se presenta en los valles interandinos que se ubican entre los 500 a 3200 m.s.n.m., valles occidentales entre los 800 a 3200 m.s.n.m. y valles orientales del norte, donde existen condiciones ecológicas favorables que permiten que vectores del género *Lutzomyia* transmita la enfermedad (10,11,12). Existen zonas endémicas en los Departamentos de Piura, La Libertad, Ancash, Lima, Cajamarca, Amazonas, Junín, Huancavelica y se han reportado casos en Ayacucho y el valle del Mantaro (13,14). El departamento de Ancash es la zona endémica de mayor incidencia, reportándose casos en el Callejón de Huaylas y en el Callejón de Conchucos (15-18). Zonas "nuevas" donde se han reportado brotes se encuentran en San Ignacio (Cajamarca), Churuja (Amazonas) y en el valle de Urubamba, Calca y Quillabamba en Cuzco (19-22), considerándose en la actualidad como una enfermedad reemergente.

En cuanto al diagnóstico de la enfermedad, se tiene un diagnóstico presuntivo por epidemiología, clínica y examen del frotis de sangre. Sin embargo el diagnóstico definitivo depende del crecimiento de colonias en cultivo, cuya duración es de 2 a 4 semanas, todo lo cual resulta laborioso y prolongado.

En cuanto a otros métodos diagnósticos, la búsqueda de anticuerpos contra la *Bartonella* usando técnicas de ELISA e IFI encuentra positividad en más del 60% en pobladores nativos asintomáticos (23-29). Otra ayuda diagnóstica parte de la biología molecular, cuyos avances han permitido la detección más rápida y más eficiente de muchos agentes infecciosos a través de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la polimerasa o PCR (30-33). La técnica de PCR consiste en la amplificación de una secuencia específica de un segmento de ADN en una simple reacción enzimática a través de la enzima ADN polimerasa y dos cebadores de extensión (primers), los cuales sintetizan el fragmento de ADN específico de una secuencia de ADN molde. Así, mínimas cantidades de ADN pueden ser amplificadas e identificadas, constituyéndose en una prueba diagnóstica sensible y rápida.

Previo al uso del PCR se extrae el ADN utilizando medios físicos como la lisis térmica, que lisa bacterias por elevadas temperaturas, o por el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamyl que purifica el ADN y remueve los productos de degradación, lo que conserva el ADN por mayores períodos. Para la extracción de ADN de sangre total se emplean detergentes que destruyen membranas celulares tales como guanidina (DNA ZOL[®]BD). Finalmente, el objetivo de este trabajo fue estandarizar la prueba de PCR para la detección de *Bartonella bacilliformis* en muestras de sangre total de pacientes en fase aguda de bartonelosis.

El ADN extraído por los métodos de lisis térmica, fenol-cloroformo-alcohol isoamyl y DNA ZOL[®] BD dieron un producto de amplificación por PCR de aproximadamente 1000 pares de bases, así como el producto amplificado de muestras de sangre total de pacientes con bartonelosis. Las diluciones mejores detectadas por PCR fueron 1/5 y 1/10 de la extracción de sangre total por DNA ZOL[®] BD. Dicha concentración corresponde aproximadamente a 6 (g de ADN).

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Experimental de laboratorio.

Muestras y cepas

Las muestras fueron obtenidas de pacientes de las áreas epidémicas de Huaral y Yauyos (Lima) y de Ollantayambo (Cusco) y el área endémica de Caraz (Ancash). Fueron utilizadas muestras de sangre total (colectadas en tubos conteniendo solución anticoagulante EDTA) de seis pacientes con diagnóstico clínico de Bartonelosis aguda (fiebre, anemia severa e ictericia) y diagnóstico microbiológico. *Bartonella bacilliformis* fue identificada en frotis teñido con colorante Giemsa y en hemocultivo en agar sangre (medio base agar Columbia).

Extracción del ácido nucleico de colonias a partir de hemocultivos

El ADN total de colonias de *Bartonella bacilliformis* a partir de hemocultivos fue obtenido según los métodos de extracción de ADN por lisis térmica, fenol-cloroformo-alcohol isoamyl y DNA ZOL[®] BD (34-36) (ver Anexos 1, 2 y 3).

Extracción del ácido nucleico de sangre total

El ADN de la sangre total fue purificado según los

métodos de extracción utilizando DNA ZOL® BD (Helena BioSciences). Esta es una solución de lisis compuesta por el detergente guanidina, el cual lisa rápidamente a las células y denatura proteínas, permitiendo la precipitación de ADN.

Procedimiento de amplificación

Para la reacción de amplificación fueron requeridos los siguientes componentes a un volumen de reacción de 20uL: Buffer de reacción, 0,2mM de nucleótidos (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 1 pmol/μl de cebadores de extensión (primers) los cuales anclan en la subunidad 16 S (3') y subunidad 23 S (5') del ADN ribosomal, amplificando la región altamente conservada del Espaciador de Transcripción Interna(ITS), 0,15 mM de MgCl₂ y 1,5 U de la enzima Taq Polimerasa. Se incorporaron al tubo de reacción 6 ng de ADN. Terminada la mezcla de reacción los tubos fueron sometidos a una secuencia de ciclos programados en un Termociclador (P.E.) 480.

Análisis del patrón de bandas electroforéticas

Una cantidad de 8 μl del producto amplificado fue visualizado por medio de una electroforesis a través de un gel de agarosa al 1% (corrido a 80V y 110 mA por 45 minutos en Buffer TAE 1X). Transcurrido el tiempo de corrida fue coloreado el gel con bromuro de etidio y fue expuesto a luz UV para observar las bandas de ADN obtenidas. Finalmente el gel fue fotografiado con una cámara Kodak Digital Science 1D ver 2.03, 1994-1997. Los tamaños (en pares de bases) correspondientes a las bandas fueron determinados por comparación directa con marcadores como λ/Hind III, 100 pb y 1 Kb.

Cuantificación de ADN

A partir de las extracciones obtenidas fueron realizadas las diluciones de 1/5, 1/10, 1/100 y 1/1000. De cada dilución fueron tomadas cantidades de 4, 6, 8 y 10 uL y fue realizada una corrida electroforética en gel de agarosa al 1%, coloreado con Bromuro de Etidio. La cantidad de ADN en ng correspondiente a cada banda fue determinada por comparación directa con los porcentajes de ADN correspondiente a cada banda del marcador λ/Hind III, a través de una fotografía con cámara Kodak Digital Science 1D.

Especificidad de los primers

Para determinar la especificidad de los primers fue obtenido el ADN total de colonias de *Brucella mellitensis*, especie relacionada filogenéticamente a *Bartonellas* (38,39), a partir de cultivo por el método de lisis térmica

y fue amplificado según el método anteriormente mencionado. Así mismo el ADN de la sangre total de personas sin enfermedad fue purificado según el método de extracción utilizando DNA ZOL® BD y también fue amplificado.

RESULTADOS

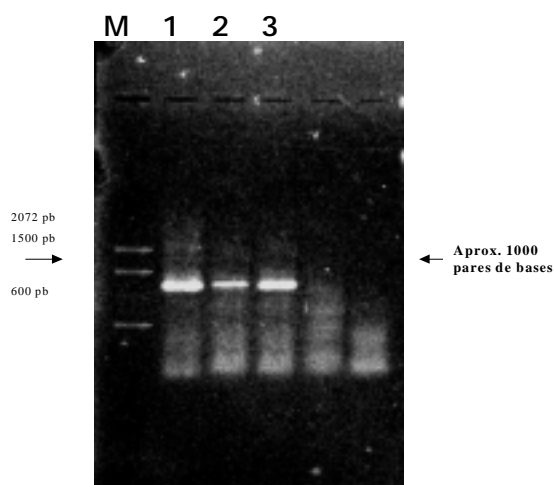
El ADN extraído de colonias a partir de hemocultivos por los métodos de lisis térmica, fenol-cloroformo-alcohol isoamyl y DNA ZOL® BD dieron un producto de amplificación por PCR de aproximadamente 1000 pares de bases (ver Figura N°1).

Asimismo, el producto amplificado de muestras de sangre total de pacientes con bartonelosis aguda utilizando DNA ZOL® BD fue idéntico a aquellos de los hemocultivos de *B. bacilliformis* (ver Figura N°2).

La concentración de ADN a ser usada fue calculada a partir de diferentes diluciones (1/5, 1/10, 1/100 y 1/1000) y las mejores detectadas por PCR fueron 1/5 y 1/10 de la extracción de sangre total obtenido por DNA ZOL® BD. Dicha concentración corresponde aproximadamente a 6 ng de ADN (ver figura N°3).

A través de un método analítico de cuantificación se

Figura N°1: Producto de PCR de *B. bacilliformis* de colonias por los métodos de lisis térmica, fenol-cloroformo-alcohol isoamyl y DNA ZOL® BD



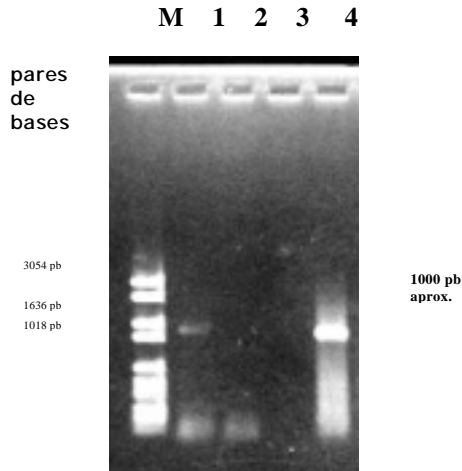
Carril M: Marcador de ADN (100 bp).

Carril 1: Producto de PCR con ADN extraído por lisis térmica

Carril 2: Producto de PCR con ADN extraído con fenol-cloroformo-isoamyl

Carril 3: Producto de PCR con ADN extraído con DNA ZOL® BD.

Figura N° 2: Producto de PCR de *B. bacilliformis* obtenido por extracción de sangre total con DNA ZOL® BD



Carril M: Marcador de ADN (1 Kb).

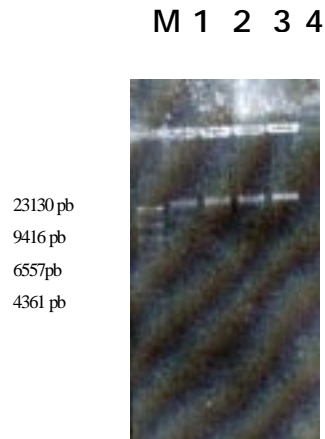
Carril 1: Extracción con DNA ZOL® BD de sangre total de un paciente en la fase aguda de Bartonelosis por *Bartonella bacilliformis*.

Carril 2: Extracción con DNA ZOL® BD de sangre total de un sujeto normal.

Carril 3: Control negativo

Carril 4: Extracción por lisis térmica (100°C por 10 min.) de cultivo de *B. bacilliformis*. (Control positivo)

FIGURA N° 3: Cuantificación de ADN total de extracción de sangre de un paciente en fase aguda de Bartonelosis con DNA ZOL® BD.



M: DNA λ /Hind III (100 ng)

1: Dilución (1/10) 4 μ L 17.16 ng : 4.29 ng/ μ L

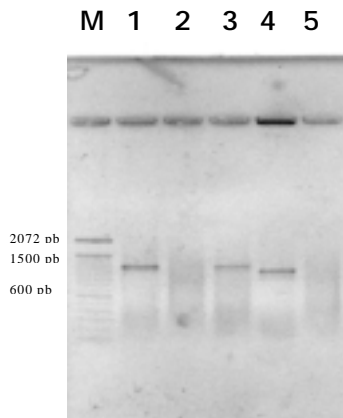
2: Dilución (1/10) 6 μ L 17.21 ng : 2.86 ng/ μ L

3: Dilución (1/10) 8 μ L 20.61 ng : 2.57 ng/ μ L

4: Dilución (1/10) 10 μ L 22.13 ng : 2.21 ng/ μ L

X= 2.985 ng/ μ L

FIGURA N° 4: Producto de PCR de *Bartonella bacilliformis* y *Brucella mellitensis* obtenido de cultivo por el método de lisis térmica.



Carril M: Marcador de ADN (1 Kb).

Carril 1: Extracción por lisis térmica (100°C por 10 min.) de cultivo de *B. bacilliformis*. (Control positivo)

Carril 2: Control negativo

Carril 3: Extracción con DNA ZOL® BD de sangre total de un paciente en la fase aguda de Bartonelosis por *Bartonella bacilliformis*.

Carril 4: Extracción por lisis térmica (100°C por 10 min.) de cultivo de *Brucella mellitensis*.

Carril 5: Extracción con DNA ZOL® BD de sangre total de un sujeto normal.

determinó que la cantidad de ADN total extraído con DNA ZOL® BD de las muestras de sangre es alrededor de 2.98 ng/ μ L (6 ng de ADN crudo). El ADN extraído de sangre total de personas sin enfermedad utilizando DNA ZOL® BD no fue amplificado por los primers anteriormente mencionados. El ADN de *Brucella mellitensis* extraído de cultivo mediante el método de lisis térmica dieron un producto de amplificación por PCR de menos de 1000 pares de bases (ver Figura N°4).

DISCUSION

Se obtuvo el ADN de *B. bacilliformis* a partir de colonias a través del método de lisis térmica, el cual se caracteriza por ser un método sencillo y de bajo costo. Sin embargo la cantidad de otros productos presentes, algunos degradados, como ADNasas, ARNasas, lisozimas entre otros, no permite su conservación por períodos prolongados; por ello se requiere un procedimiento de purificación del producto de extracción.

Para una extracción purificada se aplicó el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamyl que permite la remoción de los productos de degradación, lo que conserva el ADN por mayores períodos. Sin embargo requiere un tiempo prolongado de incubación y una serie

de pasos que podrían contribuir a la contaminación por manipulación o degradación del ADN.

Por ello se utilizó un método alternativo y simple con DNA ZOL[®] que no requiere muchos pasos, siendo rápido y de resultados comparables a los anteriores y posibilitando obtener resultados con mayor eficiencia tanto en tiempo como en calidad. Esto demostró la capacidad del DNA ZOL[®] para extraer el ADN de *Bartonella* de los cultivos y su posterior aplicación en la extracción de ADN a partir de sangre total.

Para la extracción de ADN de sangre total se desarrolló un protocolo de extracción en el cual se realizó un primer paso de lisis a través del detergente guanidina del DNA ZOL[®] BD y posteriormente la purificación del ADN total (ADN humano y de *Bartonella bacilliformis*) a través de la remoción de productos de degradación. Los resultados fueron satisfactorios.

Con respecto a los primers, para probar su especificidad se realizó una extracción de ADN de sangre total de una persona asintomática y foránea a dichas áreas endémicas, no amplificándose el ADN humano. Además se realizó lisis térmica de la bacteria *Brucella mellitensis*, especie relacionada filogenéticamente a *Bartonella* (37,38), amplificándose un producto de menor tamaño al de *Bartonella bacilliformis*, comprobándose de esta manera que podemos discriminar entre otras bacterias e incluso entre otras especies de *Bartonella* (29). La diferencia en tamaño de las bandas se debe al tamaño del ITS.

Asimismo se realizó extracción de ADN de sangre total de 10 pacientes con diagnóstico de bartonelosis en fase crónica (formas verrucosas), no obteniéndose amplificaciones por PCR. Esto podría explicarse por la mínima carga bacteriana en sangre de estos pacientes, siendo el cultivo o el frotis de la sangre de las verrugas o la biopsia de las verrugas el método diagnóstico de elección en estos casos.

Finalmente pensamos que se deben seguir haciendo estudios que permitan obtener técnicas más apropiadas que aporten información importante para el diagnóstico, epidemiología y el futuro control de la enfermedad.

Agradecimientos:

Agradecemos a la DIRES y Salud de las Personas de las jurisdicciones de Yauyos (Dr. Luis Sialer, Blg. Andrés Vicente), Caraz (Blg. Nelson Solorzano, Marlon Flores), Huaraz (Blg. Karina Jaramillo, Dr. Paul Pachas), Cusco

(Dr. Manuel Montoya, Blg. Victor Sucnier, Blga. Martha López, Blg. Edison Casapino) y Acos (Dr. Arturo Reyes, Dr. Martín Alvaro).

Correspondencia:

Dr. Cesar Henríquez
Tupac Amaru N° 1590
La Perla - Callao - Perú

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Anderson B, Neuman M. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* 1997; 10: 203-219.
2. Maguiña C, Gotuzzo E. La enfermedad de Carrión. *Enf Infec y Microbiol Clin* 1988; 6:
3. Roux V, Raoult D. Inter and Intraspecies identification of *Bartonella* (Rochalimae) species. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1573-1579.
4. Maguiña C. Bartonellosis o enfermedad de Carrión. Nuevos aspectos de una vieja enfermedad. AFA. Editores importadores S.A. Lima, Perú. 1998.
5. Mernaugh G. Deformation factor, an extracellular protein Synthesized by *Bartonella bacilliformis* that deforms Erythrocyte Membranes. *Infection and Immunity* 1992; 60: 937-943.
6. Solano M. La Enfermedad de Carrión y la biología de *Bartonella bacilliformis*. *Revista Peruana de Medicina Tropical UNMSM* 1991; 5: 13-18.
7. García U. Bartonellosis: An immunodepressive Disease and the life of Daniel Alcides Carrión. *Am J Clin Pathol* 1991; 95 (Suppl 1): 558-566.
8. García FU, Wojeta J, Broadly N, Davidson M, Hoover L. *Bartonella bacilliformis* stimulates endothelial cells in vitro and is angiogenic in vivo. *Am J Pathol* 1990; 136: 1125-1135.
9. Hinojosa W. Estudio Clínico Epidemiológico sobre 76 casos de Bartonellosis en el Callejón de Huaylas. UNFV Programa Medicina Humana. Huaraz, Setiembre 1977.
10. Birtles R, Canales J, Ventosilla P, Alvarez E, Guerra H, Llanos A, Raoult D, Doshi N, Harrison T. Survey of *Bartonella* species infecting intra - domiciliary animals in the Huayllacallán valley, Ancash, Perú, a region endemic for human Bartonellosis. Comunicación preliminar
11. Cáceres GA. Distribución geográfica de *Lutzomya verrucarum* (Townsend, 1913) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae), Vector de la Bartonellosis Humana en el Perú. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1993; 35: 485-490.
12. Ogasu E, Pérez J, Paz L, Nieto E, Monge J, Guerra H. Identification of bloodmeal sources of *Lutzomya* spp. in Perú. *Ann Trop Med and Parasitol* 1994; 88: 329-335.
13. Gray G. An epidemic of Oroya fever in the Peruvian Andes. *Am J Trop Med* 1990; 42: 215-221.
14. Sánchez M. Algunos aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Carrión en el Perú. *Revista Peruana de Epidemiología* 1986; 1: 6-15.
15. Maguiña C. Estudio de 23 casos de Bartonellosis Humana en San Marcos, Ancash. *Diagnóstico* 1981; 7:
16. Maguiña C. La Verrue Peruvienne chez les Huaylas. *Rev*

- Europ Dermatologie 1990; 2: 594-596.
- 17.Solano M. Investigación de Bartonelosis en el valle de Puchka, provincia de Huari, Ancash -Perú . Rev Per Med Trop UNMSM 1993; 7:13-25.
 - 18.Maguiña C. Estudio de 145 casos de bartonellosis humana. Doctoral thesis. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú. 1993.
 - 19.Maguiña C, Gotuzzo E. Bartonellosis. New and old. Infect Dis Clin North Am 2000; 14: 1-22.
 - 20.Ellis B, Rotz L, Lake J, Samalvides F, Bernable J, Ventura G, Padilla C, Villaseca P, Beati L, Regnery R, Childs J, Olson J, Carrillo C. An outbreak of acute bartonellosis (Oroya fever) in the Urubamba region of Perú, 1998. Am J Trop Med Hyg 1999; 61: 344-349.
 - 21.Montoya M, Maguiña C, Vigo B, Caparó R, Briceño E, Astorga, Ventosilla, Pérez E, Guerra H. Brote epidémico de Enfermedad de Carrión en el Valle Sagrado de los Incas (Cusco). Boletín Sociedad Peruana de Medicina Interna 1998; 11:170-176.
 - 22.Oropeza D. Bartonelosis; reporte de un caso procedente de zona no endémica y presentación inusual. Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna 1994; 7:24-26.
 - 23.Knobloch J. Antibodies to Bartonella bacilliformis as determined by fluorescence antibody test, indirect hemagglutination and ELISA. Ann Trop Med Parasitol 1985; 63: 83-185.
 - 24.Knobloch J. Analysis and preparations of Bartonella bacilliformis antigens. Am J Tropical Medic Hyg 1988; 39:173-178.
 - 25.Knobloch J. Common surface epitope for Bartonella bacilliformis and Chlamydia psitaci. Am J Tropical Med Hyg 1988; 39:427-433.
 - 26.Maguiña C. Estudio electroforético en suero de 16 pacientes portadores de bartonelosis humana en fase eruptiva. Diagnóstico 1986; 17:
 - 27.Solano L. Investigación de anticuerpo antibartonella en la Enfermedad de Carrión o Bartonelosis Humana. Tesis de Doctorado en Medicina Humana UNMSM Lima - Perú. 1993.
 - 28.Chamberlin J, Laughlin L, Gordon S, Romero S, Solórzano N, Regnery R. Serodiagnosis of Bartonella bacilliformis infection by indirect fluorescence antibody assay: test development and application to a population in an area of bartonellosis endemicity. J Clin Microbiol 2000; 33:4269-4271.
 - 29.Ventosilla P, López M, Antúnez de Mayolo A, Guerra H, Merello J, Pérez E, Maguiña C, Montoya M. Bartonella bacilliformis en el Valle Sagrado Cusco, Perú 1998: Aislamiento e identificación por PCR e IFI. X Jornadas Científicas Homero Silva Díaz. 02 de octubre de 1998.
 - 30.Destorges J. The Polymerase chain reaction. N Engl J Med 1990; 18:178-81.
 - 31.Espinoza J. La hélice dorada y la medicina molecular. Diagnóstico 2000; 39:294-301.
 - 32.Arévalo J. El ADN y el diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas. Diagnóstico 2000; 39: 302-312
 - 33.Erlich H. PCR Technology. Principles and applications for DNA amplification. Stockton press, 1989.
 - 34.Xu L. Blakesley R. Isolation of Bacillus genomic DNA with DNA ZOLTM reagent. Focus 1996; 18:73-74.
 - 35.Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory press, 1989.
 - 36.Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K. Current protocols in molecular biology. Greene publishing associates and Wiley-Interscience. 1989.
 - 37.Brenner D, O'Connor S, Hollis D, Weaver R, Stegerwalt A. Molecular characterization and proposal of a neo-type strain for Bartonella bacilliformis. J Clin Microbiol 1991; 29:1299-1302.
 - 38.Birtles R, Harrison T, Taylor A. The causative agent of bacillary angiomatosis. N Engl J Med 1991; 325:1447.