

Identificación morfológica de *Ehrlichia* sp. en las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana, en Venezuela

Irene del Carmen de Tamí¹ e Irene María Tamí-Maury²

Forma de citar Tamí I del C de, Tamí-Maury IM. Identificación morfológica de *Ehrlichia* sp. en las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana, en Venezuela. Rev Panam Salud Publica. 2004;16(5):345-9.

RESUMEN **Objetivo.** Determinar la frecuencia de infección por bacterias del género *Ehrlichia* en una población de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Como se sabe, la infección por VIH suele culminar en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) después de un período variable en que la persona queda expuesta a distintos tipos de infecciones oportunistas, cuya gravedad varía según el deterioro de su sistema inmunitario. La ehrliquiosis humana es una enfermedad infecciosa de reconocimiento reciente que se transmite por garrapatas y que es causada por especies de *Ehrlichia*. Se trata de microorganismos gram-negativos, intracelulares obligados, que muestran tropismo por células sanguíneas (leucocitos y plaquetas). En Venezuela se identificó por primera vez en seres humanos en 1994, con la detección de microcolonias (mórulas) en el citoplasma de plaquetas.

Material y métodos. Para el estudio se reunieron muestras de sangre periférica de 87 pacientes con seropositividad a VIH recibidos en el Laboratorio de Inmunología del Instituto de Oncología y Hematología, en Caracas, Venezuela, que es uno de los centros de referencia nacionales para casos de infección por VIH. Se revisaron retrospectivamente, al microscopio óptico, frotis elaborados con capa blanca sanguínea concentrada, teñidos con colorante de Wright y sellados con resina para su conservación.

Resultado. Se identificó *Ehrlichia* trombocítica en 12 de los 87 sujetos del estudio, es decir, en 13,8%.

Conclusión. La identificación de *Ehrlichia* trombocítica en pacientes seropositivos sugiere la necesidad de tener en cuenta la ehrliquiosis como posible diagnóstico en la población con infección por VIH.

Palabras-chave Ehrlichia, ehrliquiosis, infecciones por VIH, infecciones oportunistas relacionadas con el SIDA

¹ Instituto de Oncología y Hematología (IOH). Ministerio de Salud y Desarrollo Social — Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. Toda correspondencia deberá dirigirse a: Irene de Tamí, calle Caurimare, ramal 3, Quinta Irene, Co-

linas de Bello Monte, Caracas, Venezuela, CP 1050; correo electrónico: itami@telcel.net.ve

² Consulta Odontológica para Pacientes VIH positivos (COPAVIH), Facultad de Odontología, Universidad Santa María, Caracas, Venezuela.

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) suele culminar en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) después de

un período variable, pero por lo general prolongado, en que la persona infectada puede adquirir distintos tipos de infecciones según la gravedad del deterioro de su sistema inmunitario. La depleción de las células CD4+ se traduce en una reducción importante de las defensas del hospedero y deja al organismo muy susceptible a infecciones oportunistas, causadas por componentes de su microbiota normal o por microorganismos externos con los que tiene contacto (hongos, bacterias, virus y parásitos), además de neoplasias por lo demás infrecuentes, como sarcoma de Kaposi o linfoma de células B (1, 2).

Una de las infecciones que pueden sufrir las personas seropositivas a VIH es la ehrliquiosis humana, enfermedad de reconocimiento reciente, causada por especies de *Ehrlichia*. Se trata de una bacteria gramnegativa, hoy clasificada en el orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae, que se ha adaptado a la vida intracelular obligada. Presenta tropismo por células sanguíneas (monocitos, granulocitos o plaquetas) de animales y seres humanos, a las cuales invade, para quedar incluida dentro de una vacuola citoplasmática (fagosoma). Al multiplicarse por fisión binaria en el interior de la vacuola, forma una microcolonia, que es visible al microscopio óptico y que por su aspecto se denomina "mórula". La infección es transmitida por garrapatas, que al alimentarse de la sangre humana contaminan con sus secreciones salivales el sitio de la picadura (mordedura). De esa manera ingresa el microorganismo en el cuerpo humano, para luego desplazarse por el torrente circulatorio, dentro de leucocitos o plaquetas. Ejerce su acción patógena en el propio sistema sanguíneo, en el vascular, el sistema nervioso central, pulmones, riñones, aparato digestivo, hígado y piel, entre otros, con una expresión clínica muy diversa, que puede hacer que el trastorno se confunda con otras enfermedades infecciosas más comunes (3).

Entre las manifestaciones clínicas notificadas figuran fiebre, cefalalgia, mialgia, agotamiento o malestar general, dolor de espalda, exantema, escalofríos, náusea, artralgias, vómito, diarrea, tos y dolor abdominal.

Un alto porcentaje de pacientes con diagnóstico de ehrliquiosis presentan leucopenia o trombocitopenia y algunos, anemia. Las transaminasas hepáticas a menudo se encuentran elevadas. El diagnóstico se confirma idealmente por medio de pruebas especializadas con las cuales todavía no se cuenta en el mercado venezolano. En su defecto, la demostración de mórulas de *Ehrlichia* en el citoplasma de células sanguíneas permite hacer un diagnóstico específico oportuno de la enfermedad (3-6). Este fue el criterio adoptado en el presente estudio.

En Estados Unidos, el primer caso de ehrliquiosis humana se diagnosticó en 1986 en una persona de 51 años picada por garrapata, en una zona rural de Arkansas. El paciente mostró síntomas similares a los de la fiebre moteada de las Montañas Rocosas. En el frotis sanguíneo se identificaron células mononucleares con inclusiones citoplasmáticas compatibles con la descripción de *Ehrlichia canis* (7). En 1990 se aisló y caracterizó *Ehrlichia* causante de ehrliquiosis monocítica humana. Los resultados serológicos, en combinación con la secuencia de ARNr, indicaron que se trataba de una especie similar, pero no idéntica, a *Ehrlichia canis* (8). Se propuso que la nueva especie fuese designada *Ehrlichia chaffeensis*, luego de obtener la secuencia correspondiente a 16S ARNr mediante su amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y su comparación con otras secuencias de especies conocidas (9). En 1994 se identificó una segunda especie, que infecta principalmente a células de la serie granulocítica y que causa la llamada ehrliquiosis granulocítica humana (10); luego se encontró una tercera, *Ehrlichia ewingii*, ya conocida en el campo veterinario, también causante de ehrliquiosis granulocítica humana (11).

En Venezuela, el microorganismo se detectó por primera vez en frotis sanguíneos de seres humanos en 1994. En el citoplasma de plaquetas se identificaron mórulas con características morfológicas semejantes a las observadas en plaquetas de caninos que se estudiaron conjuntamente; el microorga-

nismo se notificó como *Ehrlichia platys* (12). Más tarde, se publicaron los resultados de otra investigación en la que se estudió una población más amplia de animales y seres humanos y se realizó microscopía electrónica de la sangre de un canino con ehrliquiosis en fase aguda de la enfermedad (13). En una tercera publicación se informó de la detección de mórulas en plaquetas mediante el examen de frotis sanguíneos de dos pacientes con un cuadro clínico compatible con la enfermedad. La identificación del ADN del microorganismo, por medio de la RCP, dio bases para pensar que se había identificado en el país una nueva especie propia del ser humano (similar a *Ehrlichia platys* en caninos) (14). En un estudio publicado en fecha más reciente, en el que se investigó la presencia de *Ehrlichia* en un grupo de personas que por diferentes motivos solicitaron la realización del examen (picadura de garrapata por contacto estrecho con animales, aunada o no a síntomas), se encontró una positividad de 37,36% (68/182) (15).

Hay condiciones del hospedero, como edad, estado de nutrición, una variedad de trastornos relacionados con enfermedades malignas y otras enfermedades infecciosas (entre ellas la infección por VIH), así como alteraciones metabólicas, trastornos laborales, psíquicos o estrés, que ocasionan un déficit secundario de la inmunocompetencia. En algunos casos esta deficiencia es transitoria y desaparece con un tratamiento apropiado de la enfermedad primaria; en otros, como en la infección por VIH, tiende a ser progresiva. Estas condiciones hacen al hospedero más vulnerable a las infecciones (16, 17), entre ellas la ehrliquiosis recién descrita.

Con base en los conocimientos mencionados, la experiencia adquirida y el hecho de que la condición de inmunocompetencia del hospedero lo hace más susceptible a infecciones, el objetivo de este trabajo fue identificar *Ehrlichia* en frotis de sangre de pacientes seropositivos a VIH, con la finalidad de conocer la frecuencia con que el microorganismo se presenta en personas con esta infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se procesaron muestras de sangre obtenidas de 87 personas adultas con infección por VIH (13 mujeres y 74 varones), las cuales fueron remitidas para estudio al Laboratorio de Inmunología del Instituto de Oncología y Hematología, adscrito al Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la Universidad Central de Venezuela, en Caracas, por ser este un centro nacional de remisión de personas con infección por VIH.

Para establecer la presencia de *Ehrlichia* en las células sanguíneas, se elaboraron frotis de capa blanca sanguínea según el método que se detalla a continuación.

A partir de una muestra de 5 mL de sangre que se extrajo con el anticoagulante tetraacetato de etilendiamina (EDTA), se elaboró un frotis de sangre periférica (rotulado "A") y se procedió a hacer frotis de capa blanca concentrada (rotulado "B"). Para obtener la capa blanca se esperó a que se produjera una sedimentación espontánea de los eritrocitos (a temperatura ambiental), lo que en general ocurre en un lapso de minutos. Una vez formada (con abundantes leucocitos y plaquetas) la capa blanca, se trasvasó a un tubo Eppendorf (1.5 mL) y se centrifugó por 5 minutos para concentrar los leucocitos y las plaquetas. Se descartó el plasma y se elaboraron los frotis en laminilla (cubreobjetos pulido, sin grasa) con una fracción del sedimento "sin resuspender". Los frotis, teñidos con colorante de Wright y montados en portaobjetos (utilizando resina para su conservación y archivo), se evaluaron minuciosamente al microscopio óptico, utilizando objetivo de inmersión (A: $\times 1\ 000$).

Debido a la dificultad para encontrar mórulas en el frotis de sangre periférica (A), el diagnóstico se realizó en el frotis de capa blanca concentrada (B). No obstante, según se constató al principio del estudio, en casos de intensa bacteriemia es posible ver mórulas en el frotis de sangre periférica (A), donde la morfología de las células sanguíneas está mejor conservada para detectar también alteraciones cualitativas y cuantitativas de los leucocitos, eritrocitos y plaquetas.

Figura 1. Frotis de capa blanca concentrada en zona de abundantes plaquetas, donde se aprecia mórula de *Ehrlichia* en una plaqueta (flecha). Arriba, un linfocito. (Tinción de Wright, $\times 1\ 000$)

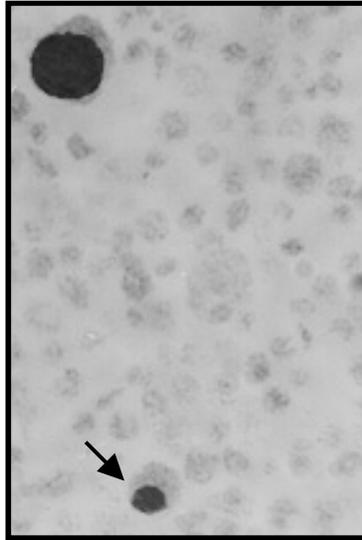
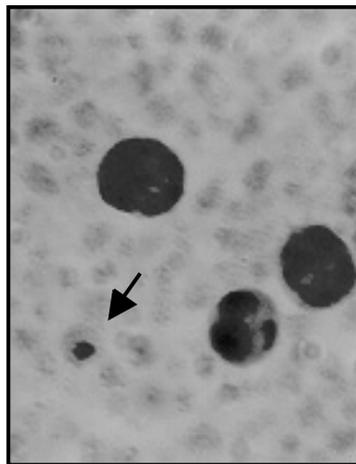


Figura 2. Frotis de capa blanca concentrada en zona de abundantes plaquetas, donde se aprecia mórula de *Ehrlichia* en una plaqueta (flecha). Hay también dos linfocitos y una célula degenerada. (Tinción de Wright, $\times 1\ 000$)



RESULTADOS

En la revisión retrospectiva de los frotis sanguíneos de capa blanca se identificó *Ehrlichia* trombocítica (figuras 1 y 2) en la sangre de 12 de los 87

(13,80%) pacientes estudiados con infección por VIH. El microorganismo se detectó en las muestras de 2 de cada 13 mujeres del estudio (15,38%) y de 10 de cada 74 varones (13,51%).

DISCUSIÓN

La ehrlichiosis es una infección emergente descrita recientemente en seres humanos, que afecta con mayor frecuencia a personas que tienen contacto con animales portadores de garrapatas o que viven en zonas donde estos se encuentran. Desde luego, son más susceptibles a esta enfermedad las personas con inmunosupresión por tratamiento (18, 19) o con inmunodeficiencia adquirida, como en la infección por VIH.

Los resultados del presente trabajo indican la presencia de microorganismos del género *Ehrlichia* en pacientes seropositivos a VIH. Aunque escasos, también los trabajos publicados por otros grupos de investigadores aportan pruebas de su existencia en pacientes infectados por VIH (20–23). Tal situación obliga al personal de salud a mantenerse alerta, ya que estos pacientes corren el riesgo de morir si no reciben tratamiento adecuado, dada su falta de capacidad funcional para controlar la infección.

En Estados Unidos se han descrito dos especies de *Ehrlichia*; la primera presenta tropismo hacia células monocíticas y la segunda hacia granulocitos (3, 4).

En este trabajo se ha señalado la presencia de mórulas en el citoplasma de plaquetas de pacientes con seropositividad a VIH, un dato que hasta el momento no se ha encontrado publicado en la bibliografía revisada, lo cual impide comparar los resultados presentes con los de algún otro estudio similar.

Si bien las personas infectadas por VIH tienen una mayor probabilidad de adquirir diversas infecciones transmitidas por animales, la mayor parte de estas no se adquieren de mascotas (animales de compañía). El riesgo de infectarse a causa del contacto con una mascota es bajo, mientras que los beneficios

psicológicos de poseerla pueden ser importantes; por ello, no hay razón de peso para que los clínicos les prohíban tener un animal en casa a las personas infectadas por VIH. No obstante, se les debe instruir claramente acerca de eventuales riesgos y de las medidas preventivas que permiten reducir la probabilidad de adquirir infecciones a partir de las mascotas (16, 17).

En la literatura revisada se constata que el diagnóstico de ehrliquiosis debe basarse en una adecuada historia clínica que considere sitios de probable exposición a garrapatas, los síntomas y signos que son indicio de infección, y valores alterados compatibles con las diferentes formas de la enfermedad en exámenes regulares de laboratorio, si bien los esfuerzos que se hacen por identificar las mórulas a menudo resultan infructuosos. Aun así, este método

—no obstante ser el único de este tipo con el que se cuenta en Venezuela— permite diagnosticar la ehrliquiosis con especificidad y con la prontitud necesaria, además de detectar el tipo de célula sanguínea invadida y descartar algún otro problema infeccioso. La falta de identificación de mórulas en el frotis no descarta la presencia de ehrliquiosis; la incapacidad de descubrirlas puede deberse a una baja concentración de bacterias en la sangre circulante o a una infección circunscrita que no se detecta en este medio (3).

CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIÓN

Se detectó una frecuencia de 13,80% de *Ehrlichia* trombocítica en pacientes que padecen de infección por VIH.

Este trabajo, al igual que otros anteriores, señala la necesidad de que el médico esté alerta respecto a la posibilidad de ehrliquiosis en estas personas, en particular en las que refieran haber estado expuestas a la picadura de garrapatas.

A los individuos infectados por VIH que mantengan contacto estrecho con animales, el médico les debe advertir de la necesidad de tomar las precauciones necesarias para reducir el riesgo de adquirir infecciones transmitidas por vectores artrópodos, lo cual se logra por medio de un conocimiento preciso de las medidas preventivas pertinentes.

Se recomienda promover el estudio de esta enfermedad recién descrita e identificar las zonas endémicas en el país y en América Latina, lo cual sin duda favorecerá la protección de la salud humana.

REFERENCIAS

- Ramella MR. Infecciones virales. En: Negroni M, ed. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1999.
- Pinching AJ. SIDA e infección por VIH. En: Brostoff J, Scadding GK, Male D, Roitt IM, eds. Inmunología Clínica. Madrid: Mosby/Doyma Libros; 1994;24.1–24.14.
- Dumler JS, Walker DH. Tick-borne ehrliquiosis. *Lancet Infect Dis*. 2001;4:21–8.
- Olano J, Walker D. Human ehrliquiosis. *Med Clin North Am*. 2002;86(2):375–92.
- Dunn BE, Monson TP, Dumler JS, Morris CC, Westbrook AB, Duncan JL, et al. Identification of *Ehrlichia chaffeensis* morulae in cerebrospinal fluid mononuclear cells. *J Clin Microbiol*. 1992;30:2207–10.
- Dumler JS, Brouqui P, Aronson J, Taylor JP, Walker DH. Identification of *Ehrlichia* in human tissue. *N Engl J Med*. 1991;325:1109–10.
- Maeda K, Markowitz N, Hawley RC, Ristic M, Cox D, McDade JE. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic *Rickettsia*. *New Engl J Med*. 1987;316(14):853–6.
- Dawson JE, Anderson BE, Fishbein DB, Sánchez J, Goldsmith C, et al. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* from a patient diagnosed with human ehrliquiosis. *J Clin Microbiol*. 1991;29(12):2741–5.
- Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrliquiosis. *J Clin Microbiol*. 1991;29:2838–42.
- Chen S, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol*. 1994;32:589–95.
- Buller RS, Arens M, Hmiel SP, Paddock CD, Sumner JW, Rikhisa Y, et al. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrliquiosis. *N Engl J Med*. 1999;341:148–55.
- Tamí I, García F, Tamí M, Arcia R. Ehrliquiosis en animales y humanos en Venezuela. *Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas (SVBE)*. 1994;3:19–24.
- Tamí I, Martínez I, Tamí M, Redondo C, Finol H, Simonovis N. Identification of *Ehrlichia* species in blood smear. *Infect Dis in Clin Pract*. 1996;5:555–7.
- Tamí I, Jordán L. Identificación de mórulas de *Ehrlichia* en plaquetas de sangre humana en Venezuela. *Antibiótico e Infección*. 2002;10(3):123–8.
- Tamí I. Ehrliquiosis humana: *Ehrlichia* trombocítica en sangre periférica. *Rev Soc Venez Microbiol*. 2003;23:135–41.
- Fica A. Enfoque del paciente con infección por VIH por el médico internista. En: Sepúlveda C, Afani A, ed. SIDA. Santiago, Chile: Editorial Mediterráneo; 2002;596–613.
- Negroni M. Relación agente infectante-hospedero. En: Negroni M, ed. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1999;179–86.
- Safdar N, Love RB, Maki DG. Severe *Ehrlichia chaffeensis* infection in a lung transplant recipient: a review of ehrliquiosis in the immunocompromised patient. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:320–3.
- Sadikot R, Shaver MJ, Reeves WB. *Ehrlichia chaffeensis* in a renal transplant patient. *Am J Nephrol*. 1999;19:674–6.
- Williams WJ, Johnson SC. Evolución natural de la infección por VIH, tratamiento antirretroviral y cuidados preventivos. En: Gates R, ed. Secretos de la infectología. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana Editores; 1999; 74–81.
- Paddock CD, Suchard DP, Grumbach KL, Hadely WK, Kerschmann RL, Abbey NW, et al. Brief report: fatal seronegative ehrliquiosis in a patient with HIV infection. *N Engl J Med*. 1993;329:1164–7.
- Paddock CD, Folk SM, Shore GM, Machado LJ, Huycke MM, Slater LN, et al. Infections with *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in persons coinfecting with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 2001;33(9):1586–94.
- Talbot TR, Comer JA, Bloch KC. *Ehrlichia chaffeensis* infections among HIV-infected patients in a human monocytic ehrliquiosis-endemic area. *Emerg Infect Dis*. [publicación periódica en línea] 2003 Sept [citada 2004 Oct 12];9(9): [12 pantallas]. Hallada en: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol9no9/02-0560.htm>

Manuscrito recibido el 3 de marzo de 2004. Aceptado para publicación, tras revisión, el 27 de septiembre de 2004.

**Morphologic identification
of *Ehrlichia* sp. in the platelets
of patients infected with the
human immunodeficiency
virus in Venezuela**

ABSTRACT

Objective. To determine the frequency of infection by bacteria of the genus *Ehrlichia* in a population of patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV). As is widely recognized, HIV infection is usually followed by the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) after a variable period during which the individual can develop different types of opportunistic infections whose severity depends on his/her immune status. Human ehrlichiosis is a newly-recognized tick-borne infectious disease caused by *Ehrlichia* spp., which are obligate intracellular, Gram-negative bacteria showing tropism for blood cells (leukocytes and platelets). In Venezuela, the disease was first recognized in humans in 1994, when intra-cytoplasmic microcolonies (morula) were found in human platelets.

Methods. We collected peripheral blood samples from 87 HIV-positive persons that were received at the Immunology Laboratory of the Oncology and Hematology Institute in Caracas, Venezuela, one of the country's referral centers for cases of HIV infection. Slides prepared from buffy coat that had been stained with Wright's solution and sealed with resin for preservation were examined retrospectively under the light microscope.

Results. *Ehrlichia* spp. were found in the platelets of 12 of the 87 (13.8%) patients whose slides were examined.

Conclusion. The presence of *Ehrlichia* sp. in the platelets of HIV-positive patients suggests that ehrlichiosis should be among the differential diagnoses of opportunistic infection in this group of patients.

Estoy convencido de que sirviéndole a mi pueblito natal,
le sirvo a la provincia, al departamento y a la patria
misma. Porque si cada abeja pone una gota de miel en
su celdilla, tendremos listo el panal.

[I am convinced that if I serve my native village, I serve
the province, the state, and the entire country. Because if
every bee leaves a drop of honey in its cell, the entire hive
will be ready.]

Luis Tablanca
Poeta colombiano / Colombian poet