

EVIDENCIA SEROLÓGICA DE EHRlichIOSIS HUMANA EN ANCASH, PERÚ

Elizabeth Anaya ^{1,a}, Cecilia Morón ^{1,b}, Karina Jaramillo ^{2,a}, Leonardo Mendoza ^{3,a}, Raúl Román ^{1,c}

RESUMEN

Se desarrolló y estandarizó una prueba de inmunofluorescencia indirecta para detección de IgG e IgTotal para el diagnóstico de Ehrlichiosis humana. Se utilizó como antígeno, a células DH82 infectadas con *Ehrlichia chaffeensis* cepa *Sapulpa*, se consideró una dilución de 1/64 como positivo. Se evaluó 130 sueros de pacientes febriles negativos para Rickettsiosis y enfermedad de Carrion procedentes de Ancash, que ingresaron al Instituto Nacional de Salud entre los años 2004 a 2006. Se encontró que 12 (9,2%) sueros fueron positivos a Ehrlichiosis. Teniendo en cuenta que es una enfermedad emergente y con el desarrollo de esta prueba, es recomendable iniciar estudios epidemiológicos y de vigilancia de la Ehrlichiosis en el Perú.

Palabras clave: *Ehrlichia*; Técnica de inmunofluorescencia indirecta; Seroprevalencia; Perú (fuente: DeCS BIREME).

SEROLOGICAL EVIDENCE OF HUMAN EHRlichIOSIS IN ANCASH, PERU

ABSTRACT

We developed and standardized an indirect immunofluorescence test for detection of IgG and IgTotal for diagnosing human Ehrlichiosis. It was used as antigen to DH82 infected cells with *Ehrlichia chaffeensis* Sapulpa strain; it was considered a dilution of 1/64 as positive. We evaluated sera from 130 febrile patients negative for Rickettsiosis and Carrion disease from Ancash, who entered at Instituto Nacional de Salud (Lima, Peru) between 2004 and 2006. We found that 12 (9.2%) sera were positive for Ehrlichiosis. Given that Ehrlichiosis is an emerging disease and with the development of this test, it should start monitoring and epidemiological studies of Ehrlichiosis in Peru.

Key words: *Ehrlichia*; Fluorescent antibody technique, indirect; Seroprevalence; Peru (source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

La Ehrlichiosis es un nombre genérico para designar a las infecciones causadas por bacterias intracelulares obligadas de la familia Anaplasmataceae, entre los que destacan seis especies que causan infecciones en humanos, la *Ehrlichia chaffeensis* agente responsable de la Ehrlichiosis monocítica humana (EMH), el *Anaplasma phagocytophilum* causante de la anaplasmosis granulocítica humana (AGH), así mismo, se ha detectado pacientes infectados con *E. ewingii*, *E. canis*, *E. equi* y *Neorickettsia sennetsu* ^(1,2). Estas infecciones pueden ser fatales si es que no son tratadas oportuna y adecuadamente.

Estos organismos son transmitidos por garrapatas de la familia Ixodidae, en varias regiones del mundo.

Hay evidencias serológicas de Ehrlichiosis humana en Argentina ⁽³⁾, Brasil ⁽⁴⁾, Chile ⁽⁵⁾ y Venezuela ⁽⁶⁾ y, hasta la actualidad, no se han incriminado qué especies de garrapatas son los vectores de la Ehrlichiosis en estos países. A la fecha, no hemos encontrado reportes sobre casos humanos en Perú, aunque sí hay casos de Ehrlichiosis canina en Lima ⁽⁷⁻⁹⁾.

La Ehrlichiosis se presenta como un cuadro febril inespecífico, que suele acompañarse de cefalea y mialgias, el exantema está presente en menos de la mitad de pacientes adultos, pero es más común en niños. Ocasionalmente, pueden presentar meningitis, neumonitis, insuficiencia renal e ictericia ^(10,11). Este cuadro clínico tan variado e inespecífico, así como la rareza de los casos, hace que sea considerado en el diagnóstico diferencial de pacientes febriles con antecedentes de exposición o picadura por garrapatas.

¹ Laboratorio de Metaxénicas Bacterianas, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

² Laboratorio Referencial Regional, Dirección Regional de Salud Ancash. Huaraz, Perú.

³ Laboratorio de Entomología, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

⁴ Laboratorio de Anatomopatología, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

^a Biólogo; ^b Médico patóloga; ^c Técnico de laboratorio.

El contacto con sangre de animales infectados, el empleo de hemoderivados (transfusiones) y la transmisión perinatal son vías excepcionales de adquisición de la enfermedad. La mayor incidencia de estas infecciones se produce en los meses en los que las diferentes especies de garrapatas implicadas en la transmisión de estas bacterias están más activas (primavera-verano y principio de otoño) ⁽¹²⁾. Se debe recordar que los vectores pueden transmitir otras enfermedades como la enfermedad de Lyme, encefalitis centroeuropea o las babesiosis, por lo que se puede dar el caso de que coexista más de una enfermedad en el paciente picado por garrapatas y observarse manifestaciones clínicas de más de una de ellas ^(13,14).

En el Perú, debido a la ausencia de reportes de Ehrlichiosis humana, no se tiene disponibles pruebas diagnósticas específicas, por lo que el Laboratorio de Metaxénicas Bacterianas del Instituto Nacional de Salud (INS) ha desarrollado dos pruebas de inmunofluorescencia indirecta para detectar el IgTotal e IgG con el apoyo de la *University Texas Medical Branch*, para luego evaluar la seroprevalencia de Ehrlichiosis en sueros de pacientes con sospecha de Rickettsiosis provenientes de Ancash.

EL ESTUDIO

Se desarrolló dos pruebas diagnósticas de IFI con IgTotal e IgG para el diagnóstico de Ehrlichiosis a partir de la cepa referencial de *Ehrlichia chaffeensis* cepa *Sapulpa* del Laboratorio Referencial de la UTMB (*University Texas Medical Branch*).

PRODUCCIÓN DE ANTÍGENO DE *E. chaffeensis*

Se utilizó cultivos celulares DH82 incubados a 34 °C (incubadora, Memmert) en frascos de 75 cm² para cultivo celular (Falcon) con una monocapa formada en 80% enriquecida con medio EMEM (medio mínimo esencial con sales de Earles, GIBCO) y 10% de suero bovino fetal (SBF), al que se añadió una suspensión del antígeno criopreservado de *Ehrlichia chaffeensis* diluido 1:15 en *buffer* sucrosa-fosfato-glutamato estéril, se incubó a 34 °C por una hora, agitando suavemente cada 15 min, luego se agregó medio EMEM con 5% de SBF sin antibiótico, y se incubó a 34 °C por 15-20 días ⁽¹⁵⁾.

Se examinó el cultivo con ayuda de un microscopio de luz invertida (Carl Zeiss) hasta observar el efecto citopático (ECP) en 90 a 100%, se desprendió las células infectadas con un barredor de células (*cell scrappers*), y se centrifugó por 10 min a 5000 rpm, se recuperó el *pellet*, se resuspendió en PBS y centrifugó, repitiendo

el proceso dos veces más ⁽¹⁵⁾. Se observó que el ECP óptimo se produce entre el día 12 al 15 ^(15,16), donde se encuentra infección en 80% de células.

Finalmente el *pellet* se diluyó en PBS 1X y se realizó el conteo de células en microscopio de luz invertida (400x) con Cámara de Neubauer, la concentración de antígeno apropiada fue de 1,5 x 10⁷ células/mL, con la que se impregnó en las láminas IFI. Se dejó secar a temperatura ambiente y dentro de la cabina de flujo laminar. Posteriormente se fijó con acetona fría y se guardó a -20 °C.

CONJUGADOS Y SUEROS

Para la prueba IFI se usó el conjugado *Anti-human IgTotal* e IgG (cadena completa) elaborado en cabra, ligado a isotiocianato de fluoresceína (SIGMA), se preparó las diluciones del conjugado con *buffer* PBS y azul de Evans ⁽¹⁵⁾; la dilución óptima del conjugado para IgTotal fue 1:100 y para IgG fue 1:40.

Para la titulación de los sueros, se usaron sueros positivos y negativos proporcionados por el Laboratorio Referencial de la UTMB. Se diluyó los sueros controles de 1:64 a 1:256 con PBS al 3% de leche descremada. Las diluciones se dispensaron 10 µL a cada pocillo. Se incubaron por 30 min a 37 °C y se lavaron por tres veces ⁽³⁾. A partir de título 1:64 los sueros son considerados reactivos para Ehrlichiosis.

PRUEBAS DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA IgG E IgTOTAL

Se descongeló las láminas 30 min antes de realizar la prueba. Se diluyó el suero del paciente en *buffer* diluyente de muestra (PBS + leche descremada al 3%), y se agregó 10 µL del suero diluido a cada círculo de la lámina y luego se incubó en cámara húmeda a 37 °C por 30 min. Seguidamente se retiró las láminas de la cámara húmeda y se lavó tres veces con PBS pH 7,2 por diez minutos cada vez, se dejó secar a temperatura ambiente o por cinco minutos a 37 °C; una vez seco se agregó 10 µL del conjugado por cada círculo de la lámina y se incubó por 30 min en cámara húmeda a 37°C. Se volvió a repetir el proceso de lavado y secado descrito anteriormente para el suero y se procedió al montaje para observar al microscopio de inmunofluorescencia con objetivo 40x (Leica DMLS).

SEROPREVALENCIA DE EHRLICHIOSIS

Se realizó un estudio transversal con los sueros de pacientes con sospecha clínica de Rickettsiosis (paciente con fiebre, cefalea intensa y mialgias, con

o sin exantema) procedentes de los establecimientos de salud de Ancash que fueron remitidos al Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú) durante los años 2004 al 2006. A todos los casos se les descartó la presencia de Rickettsiosis con anticuerpos IgTotal (IgM+IgG+IgA) e IgG contra el antígeno rickettsial con la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) ⁽¹⁸⁾; así como de enfermedad de Carrión con gota gruesa y cultivo ⁽¹⁹⁾.

HALLAZGOS

Las pruebas IFI IgG e IgTotal desarrolladas en el INS, identificaron como positivos todos los sueros positivos proporcionados por el Laboratorio Referencial de la UTMB y como negativos a todos los que eran negativos (n=4). Se evaluó la concordancia entre las pruebas IFI IgG e IgTotal, encontrando un Kappa de 0,91 (p<0,001).

Con estas pruebas, se evaluó 130 sueros de pacientes febriles de Ancash enviados para descarte de Rickettsiosis, encontrando 12 positivos, lo que da una seroprevalencia de 9,2% (12/130) de Ehrlichiosis humana.

DISCUSIÓN

Se logró desarrollar una prueba IFI a nivel local, para el diagnóstico de Ehrlichiosis, su estandarización fue adaptada a las condiciones de laboratorio relacionadas con el tipo de línea celular, medio de cultivo celular, temperatura de incubación, *buffer* de muestra, agente bloqueador y conjugado. La línea celular de elección fue DH82, por ser una línea más sensible, el medio de cultivo celular es EMEM con sales de Earle's con 5% de suero bovino fetal ⁽¹⁵⁾. Trabajar con un antígeno de *E. chaffeensis* es una ventaja debido a que hay más probabilidad de infección en menor tiempo ^(3,10). Con relación al *buffer* diluyente de muestra, se empleó leche descremada deshidratada en lugar de suero albúmina bovina obteniendo buenos resultados con un menor costo.

Si bien no se evaluó la sensibilidad de las pruebas IFI desarrolladas en el INS, para determinar los puntos de corte de las diluciones se usó cuatro sueros positivos y negativos, evaluados en la *University Texas Medical Branch*; en la evaluación posterior se encontró que las pruebas IFI locales tuvieron los mismos resultados. Futuros estudios deben determinar la sensibilidad y especificidad de esta prueba en comparación con el PCR u otras técnicas diagnósticas.

Este reporte evidencia serológicamente la presencia de Ehrlichiosis humana en Ancash, hallazgo relevante

considerando que la sintomatología de esta enfermedad puede ser similar a otras infecciones endémicas como la enfermedad de Carrión, Rickettsiosis, leptospirosis, entre otras.

En la investigación de pacientes febriles en el Perú, en el mejor de los casos, se ha llegado a un diagnóstico etiológico del 65% de los casos ⁽²⁰⁾, por lo que tener una prueba diagnóstica útil para la Ehrlichiosis humana, así como el conocimiento de su presencia en el país, contribuirá a una mejor vigilancia de los pacientes febriles.

Se debe realizar estudios que evalúen la epidemiología de la Ehrlichiosis humana en el Perú, particularmente cuando se conoce que existen casos en perros, con reportes de prevalencia de Ehrlichiosis canina de 16% en algunos distritos de Lima ⁽⁷⁾.

Fuente de financiamiento

Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú. Código del proyecto OGITT: 2-01-05-02-054.

Conflictos de intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH.** Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(3): 589-95.
2. **Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS.** Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis.* 2007; 45(Suppl 1): S45-51.
3. **Ripoll CM, Remondegui CE, Ordonez G, Arazamendi R, Fusaro H, Hyman MJ, et al.** Evidence for rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in subtropical territory of Jujuy, Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61(2): 350-54.
4. **da Costa PS, Valle LM, Brigatte ME, Greco DB.** More about human monocytotropic ehrlichiosis in Brazil: serological evidence of nine new cases. *Braz J Infect Dis.* 2006; 10(1): 7-10.
5. **López J, Rivera M, Concha JC, Gatica S, Loeffelholz M, Barriga O.** Ehrlichiosis humana en Chile, evidencia serológica. *Rev Med Chile.* 2003; 131(1): 67-70.
6. **Martinez MC, Gutierrez CN, Monger F, Ruiz J, Watts A, Mijares VM, et al.** *Ehrlichia chaffeensis* in child, Venezuela. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(3): 519-200.
7. **Adrianzen J, Chávez A, Casas E, Li O.** Seroprevalencia de la dirofilariosis y Ehrlichiosis canina en tres distritos de Lima. *Rev Investig Vet Peru.* 2003; 14(1): 43-48.
8. **Hoyos L, Li O, Alvarado A, Suarez F, Díaz D.** Evaluación del examen hematológico en el diagnóstico de Ehrlichiosis canina. *Rev Investig Vet Peru.* 2007; 18(2): 129-35.

9. **Vinasco J, Li O, Alvarado A, Diaz D, Hoyos L, Tabachi L, et al.** Molecular evidence of a new strain of *Ehrlichia canis* from South America. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(8): 2716-19.
10. **Eng TR, Harkess JR, Fishbein DB.** Epidemiologic, clinical, and laboratory findings of human ehrlichiosis in the United States. *JAMA.* 1990; 264(7): 2251-58.
11. **Fishbein DB, Dawson JE, Robinson LE.** Human ehrlichiosis in the United States, 1985 to 1990. *Ann Intern Med.* 1994; 120(9): 736-43.
12. **Blanco JR, Oteo JA.** Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2002; 8(12): 763-72.
13. **Oteo JA, Brouqui P.** Ehrlichiosis y anaplasmosis humana. *Enf Infecc Microbiol Clin* 2005; 23(6): 375-80.
14. **Thomas V, Anguita J, Barthold SW, Fikrig E.** Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis alters murine immune responses, pathogen burden, and severity of Lyme arthritis. *Infect Immun.* 2001; 69(5): 3359-71.
15. **Infectious Diseases Reference Laboratory, University of Texas Medical Branch.** IFA procedure for detection of antibodies to *Ehrlichia chaffeensis*. Texas: UTBM; 2003.
16. **Nicholson WL, Comer JA, Sumner JW, Gingrich-Baker C, Coughlin RT, Magnarelli LA, et al.** An indirect immunofluorescence assay using a cell culture-derived antigen for detection of antibodies to the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(6): 1510-16.
17. **Anaya E, Morón C, Arias P, Chauca J, Román R.** Evaluación de pruebas de ELISA e inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos IgM contra Rickettsiosis. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2008; 25(3): 336-39.
18. **Ventura G, Padilla C.** Diagnóstico bacteriológico de la Bartonelosis humana o enfermedad de Carrión. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2006.
19. **Carpenter CF, Gandhi TK, Kong LK, Corey GR, Chen SM, Walker DH, et al.** The incidence of ehrlichial and Rickettsial infection in patients with unexplained fever and recent history of tick bite in Central North Carolina. *J Infect Dis.* 1999; 180(3): 900-3.
20. **Troyes L, Fuentes L, Troyes M, Canelo L, García M, Anaya E, et al.** Etiología del síndrome febril agudo en la provincia de Jaén, Perú 2004-2005. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2006; 23(1): 5-11.

Correspondencia: Blga. Elizabeth Anaya, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.
Dirección: Cápac Yupanqui 1400, Lima 11.
Teléfono: (511) 617 6200 anexo 2134
Correo electrónico: eanaya@ins.gob.pe; elizanaya@yahoo.es

Suscríbete en forma electrónica y gratuita a los contenidos de la Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, ingresa a www.ins.gob.pe, selecciona el icono de la revista y envíanos tus datos.

The screenshot shows the homepage of the Instituto Nacional de Salud (INS) website. At the top, there is a banner with the text 'Suscríbete en forma electrónica y gratuita a los contenidos de la Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, ingresa a www.ins.gob.pe, selecciona el icono de la revista y envíanos tus datos.' Below the banner, the website header includes the logo of the Ministerio de Salud del Perú and the Instituto Nacional de Salud, along with the tagline 'Investigar para proteger la salud'. The main navigation bar contains links for Inicio, Contáctenos, Mapa del Sitio, @INS, Intranet, Consulta Documentos, and Tour Virtual. A search bar is also present. The left sidebar features a vertical menu with categories such as Investigación y Ética, Vigilancia Laboratorial, Capacitación, Productos, Servicios, Publicaciones, Acerca del INS, and Transparencia INS. The main content area is divided into several sections: 'Imagen de la Semana' featuring a photo of a public event; 'Noticias' with a headline about the formation of a committee for natural products; 'Temas de Actualidad' with a section on 'MORDEDURA DE ARÁÑAS'; 'Novedades' listing various courses and laboratory updates; and 'Cursos y eventos'. On the right side, there are icons for 'Servicios Web' (NETLab, Ensayos Clínicos, Fichas, etc.) and a 'Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública' icon. At the bottom, there are buttons for 'Educando a la Familia' and 'Notas de Prensa', and contact information for the communications department.