

EHRlichIA VE ATLARIN MONOSİTİK EHRlichIOSIS'i

EHRlichIA AND MONOCYTIC EHRlichIOSIS OF THE HORSE

Sibel ÖZKÖK¹

GİRİŞ

Ehrlichiosis; küçük, pleomorfik, mononükleer veya polimorf nükleer lökositlerin sitoplazmik fagozomlarında parazit olarak yaşayan bakterilerin (obligat intrasellüler) yol açtığı bir hastalıktır. Etken *Ehrlichia* genusunun bir üyesidir; takım *Ehrlichia*, aile *Rickettsiaceae*'dir (1). Rickettsiales alt sınıfında üç familya vardır: *Rickettsiaceae*, *Bartonellaceae*, *Anaplasmataceae*. *Rickettsiaceae* familyası da üç takım içerir: *Rickettsiaceae*, *Ehrlichieae*, *Wolbachieae*.

Ehrlichia genusunda yer alan mikroorganizmalar insanlar da dahil olmak üzere tüm memeliler için patojendirler. Köpek, inek, koyun, at, keçi ve insanda hastalık yaparlar.

Etken kanda bulunan retikülo endotelial hücrelere yerleşir; eritrositlere yerleşmez. Sitoplazmada gelişebilir, çekirdekte gelişemez. Lökositlerde tek veya yoğun inklüzyon şeklinde (morula) sitoplazma içine yerleşirler. Gram negatif ve hareketsizdirler. Vektör kenelerde gelişebilirler. Bir vakada da trematoddan tespit edilmiştir. Bazı türlerin vektörleri henüz bilinmemektedir.

DNA'nın G+C oranı bilinmemektedir. *Ehrlichia* Romanowsky metoduyla boyandığında mavimsi-mor renk alır.

Tavuk embriyosu ve hücre kültürlerinde üretilmemişlerdir. Bazı türler monosit kültürlerde üretilmiştir. Genel olarak kanın monosit hücre kültürleri, insan monosit hücre kültürleri, P388D1 hücre kültürü (murin makrofaj), U937 hücre kültürü (insan histiyosit), intestinal glandüler epitel hücreleri ve makrofajlarda üretilmektedir.

Yapılan çalışmalar sonucunda *ehrlichia*ların, klamidyalardan daha çok riketsiyalara yakın olduğu kanısına varılmıştır. Enerji metabolizması konusunda *ehrlichia*'ların riketsiyalara benzediği, klamidyalara benzemediği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Weisburg ve arkadaşlarının 16s RNA sekansları üzerinde yaptıkları çalışmaların sonucunda *ehrlichia*ların riketsiyalar ile arasında özel bir ilişkinin olduğu, ancak klamidyalarla olmadığı saptanmıştır.

*Ehrlichia*ların gelişim ile ilgili siklusları klamidyalarınkine oldukça benzer, ancak klamidyalarda elementer ve retiküler cisimcikler ayırt edilebildiği halde *ehrlichia*larda bu ayırım yapılamaz (2).

Amerika'da 1992 yılında, *E.canis* ve *E.chaf-feensis* ile yakın antijenik ilişkisi olan yeni bir tür, *E.ewingii* sp.nov., saptanmıştır (3). Aynı zamanda Minnesota ve Wisconsin'de yaşayan köpeklerde yapılan bir çalışmada *E.ewingii*'nin granülositik ehrlichiozisin etkeni olmadığı, ancak *E.equi* ile yakın ilişkisi olan bu etkenin insanlardaki enfeksiyonun enzootik siklusuna iştirak eden zoonoz bir etken olduğu bildirilmiştir (4).

Amerika'da yapılan bir başka çalışmada, *E.risticii*'nin neden olduğu enfeksiyonda etkenin kaninotropik özellik gösterdiği görülmüş ve bu nedenle de köpeklerin taşıyıcı olabileceği düşünülmüştür (5). Bir başka çalışmada *E.platys*'in köpeklerde enfeksiyöz siklik trombositopeni yaptığı (6,7) ve potansiyel biyolojik vektörün *Rhipicephalus sanguineus* olduğu bildirilmiştir (8 - 10).

¹Etilik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, ANKARA.

Geliş tarihi: 19.07.2000 Kabul ediliş tarihi: 01.03.2001

Yazışma adresi: Sibel ÖZKÖK, Etilik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Ankara

Norveç'te yapılan bir çalışmada, *E.phagocy - tophila*'nın koyun ve sığırların yanında insanlarda da enfeksiyon yaptığı saptanmıştır (11). *E.equi* ve *E.phagocytophila*'nın vektörünün *Ixodes dammini* olduğu bildirilmiştir (12), ancak Amerika'da rastlanılan bir insan granülositik ehrlichiozis vakasında biyolojik vektörün *Ixodes scapularis* olduğu saptanmıştır (13).

Yine Amerika'da ehrlichiozis üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda, insan monositik ehrlichiozisin (HME) etkeninin *E.chaffeensis* olduğu, granülositik ehrlichiozisin etkeninin ise *E.equi* veya *E.phagocytophila* olduğu ya da bu etkenlerle yakın antijenik ilişki içinde olan başka bir etkenin olduğu bildirilmiştir (14). Japonya'da, 1995 yılında, vahşi farelerden *E.chaffeensis* ile yakın antijenik ilişkisi olan *E.muris sp.nov.* adında yeni bir türün izole edildiği bildirilmiştir ve daha sonra da insan ehrlichiozisine neden olan yeni bir suş, *E.chaffeensis sp.nov.*, saptanmıştır (15,16).

ATLARIN MONOSİTİK EHRLICHİOSİSİ (EME, POTOMAC HORSE FEVER)

Atların monositik ehrlichiozisi ateş, depresyon, iştahsızlık, ekstremitelerde distal ödem, kolik, hafif şiddette ishal ve laminitis ile karakterize bir hastalıktır.

EME, ilk kez Maryland'da 1979 yılında bir hastalık sendromu olarak tanımlanmıştır. Hastalığa yakalanan atlar üzerinde yapılan çalışmalarda etkenin enfeksiyöz bir ajan olduğu görülmüştür. Serolojik muayeneler sonucunda riketsiyal bir etken olduğu saptanmış ve deneysel enfeksiyon oluşturulan atların dokularından identifiye edilmiştir. Hastalığın orijinal adı Potomac Horse Fever'dir. Amerika'nın ve Kanada'nın bazı bölgelerinde aynı hastalık Atların Monositik Ehrlichiosis'i olarak tanıtılmış ve bunun daha bilimsel olduğu düşünülmüştür. Aynı zamanda bu isim etkenin genusunun ve yerleşiminin *E.equi*'den (atları da ehrlichiosis etkeni) farklı olduğunu da açıkça göstermektedir (17).

EME'nin etkeninin antijenik özellikleri incelendiğinde *Ehrlichia* genusuna ait yeni bir tür olduğu görülmektedir. Etkenin ismi, (*E.risticii*), riketsiyalar ve riketsiyal hastalıklarla ilgili sayısız bilimsel araştırmalarından dolayı Miodrag Ristic'in anısına

sonradan verilmiştir. EME, atların ehrlichial koliti olarak da bilinmektedir (9).

Amerika'nın değişik bölgelerinde, Kanada'da, Fransa'da ve dünyanın diğer bölgelerinde yapılan seroprevalans çalışmalarında elde edilen veriler hastalığın bu bölgelerde görüldüğünü kanıtlamıştır. Günümüzde ise atçılıkta önemli kayıplara neden olan bir hastalık haline gelmiştir (9).

ETİYOLOJİ

E.risticii gram negatif, pleomorfik bir bakteridir. Gelişimi için monositleri tercih eder ve 0.4-0.75 µm uzunluğundadır. Mikroorganizmalar bir veya birden fazla intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri şeklinde vakuoller içine yerleşirler.

Ultrasüruktürel olarak iki farklı morfolojik formu vardır. Küçük formları (0.2-0.4 µm çapında) elektron mikroskopta yoğun olarak görülürler ve bazıları ikiye bölünebilirler. Mikroorganizmanın birçok küçük formu konakçı membranının oluşturduğu vakuoller tarafından hapsedilirler. Büyük formları ise (0.6-1.5 µm çapında) daha az elektron yoğunluğuna sahiptirler ve organizmalar konakçı membranı ile tek tek kuşatılırlar.

E.risticii ilk önce at ve köpek monositlerinde daha sonra da sürekli hücre kültürleri P388D1 (murin makrofaj) ve U937'de (insan histiyosit) in vitro olarak üretilmektedir. Doku kültürlerinde üretilmesi için L-glutamin gereklidir. Mikroorganizmanın in vitro üretimini antibiyotikler inhibe eder.

E.risticii ile insan patojeni olan *E.sennetsu* arasında çok yakın antijenik ilişki vardır.

E.risticii ile yapılan deneysel enfeksiyonlarda köpek, kedi, fare ve insan dışındaki primatlarda da başarılı olunmuştur (9).

EPİDEMİYOLOJİ

Atların monositik ehrlichiosis'i mevsimsel bir hastalıktır. Enfeksiyonların çoğu temmuz ve ağustos aylarında görülmektedir. Bunun dışında sporadik olarak kış aylarında da görülmüştür (18). EME'nin epidemiyolojisi henüz tam olarak açıklanamamıştır (19). Holland ve ark.(17) 1985 yılında etkeni izole etmeyi başarmışlardır. Doğal ve deneysel olarak enfekte edilen atların

reenfeksiyona karşı dirençli oldukları gözlenmiştir. İyileşen hayvanlardan *E.risticii*'nin izolasyonu başarılı olmamıştır ve bu nedenle de iyileşen hayvanlar enfeksiyonun taşıyıcısı değildirler (18).

EME'nin mevsimsel sınırlar içerisinde kalması hastalığın bulaşmasının kan emen arthropotlarla olduğunu göstermektedir. *E.risticii*'nin bulaşması da bir vektör aracılığı ile olmaktadır. Ancak araştırmacılar arthropodun taşıyıcılığını veya atlara bulaşmasını açıklayamamışlardır (20).

Kedi, tilki ve vahşi tavşanların *E.risticii*'ye karşı antikor taşıdıkları bulunmuştur (21). Endemik bir bölge olan Maryland'da, 1985 yılında kediler üzerinde IFA testi kullanılarak yapılan çalışmalar kedilerin % 26.4'ünün doğal olarak *E.risticii*'ye karşı antikor taşıdıklarını göstermiştir. Kedi ve atlar arasındaki bu yakın ilişki nedeniyle kedilerin *E.risticii* için doğal konakçı oldukları düşünülmektedir (18).

Connecticut, California, Florida, Idaho, Illinois, Kentucky, Maryland, Michigan, Minnesota, New Jersey, New York, Ohio, Oregon, Pennsylvania, Wisconsin, Ontario, ve Kanada'daki atlarda IFA testi ile EME hastalığı serolojik olarak saptanmıştır (22). Yurdumuzda varlığı henüz bildirilmemiştir.

SEMPTOMLAR

Hastalığın klinik bulgularından birisi ishaldir. İshal, atların yaklaşık % 40-45'inde klinik olarak görülmekte ve orta şiddetten çok sulu hale kadar değişiklik gösterebilmektedir.

Yapılan son çalışmalar enfekte gebe atlardan fetüse *E.risticii*'nin transplasental geçişinin olduğunu göstermektedir. Hastalık tam olarak tanımlanmadan daha öncesinde de EME'nin kısıraklarda düşük yapma insidensini arttırdığı görülmüştür.

E.risticii'nin değişik organ ve dokulara afinite si vardır. Bunlar büyük kolon duvarı, küçük kolon, çekum, ileum, mezenterim ve kolon lenf nodülleridir. Fakat buralarla sınırlı kalmaz. Etken öncelikle büyük kolonda olmak üzere çekum ve ince bağırsağın lamina propria ve submukozasındaki kripta epitellerinin sitoplazmasında bulunan makrofajlardan tanımlanmıştır. Elektron

mikroskopta bu organların mast hücrelerinde de mikroorganizmalara sıkça rastlanmıştır (9).

TANI

A)Klinik Tanı:

Enfekte atlarda aşağıdaki semptomlardan biri veya birkaçı birlikte görülür: ateş, depresyon, iştahsızlık, ekstremitelerde distal ödem, kolik, hafif şiddette ishal. Hastalık, korona benzeri virus enfeksiyonu, equine rhinopneumonitis' ve leptospira enfeksiyonları ile karışabilir (9).

B)Laboratuvar İncelemeleri:

Enfekte hayvanlardan alınan kan ve dışkı örnekleri laboratuvara gönderilir (9).

1)Mikroskopi:

Etken, ışık mikroskopunda tek tek, küme şeklinde veya konakçı hücrelerinin fagozomal vakuollerinde inklüzyon (morula) şeklinde bulunur.

Mikroorganizma gram negatiftir. Wright-Giemsa boyama ile mavimsi-mor (erguvani) renkte boyanır. Elektron mikroskopta mikroorganizmalar sitoplazmik vakuoller içerisinde bir veya birden fazla görülürler. Değişik derecelerde pleomorfizm gösterirler. Yuvarlak, oval veya çomak şekilli ve 0.4-0.75 µm eninde, 0.5-1.2 µm boyundadırlar. Bakteri çift plazma membranıyla çevrilidir ve dalgalı bir hücre duvarına sahiptir (9).

2)Kültür:

Klasik kültür ortamı %1 L-glutamin ve %10 fetal sığır serumu (ısı-inaktif) ilavesiyle oluşan Medium 199'dur, pH sodyum bikarbonat ile (%5 w/v) 7.2-7.4'e ayarlanır. Optimal üreme, 37-38°C'de normal atmosferik koşullar veya %5 CO₂'li ortamda konakçı hücrelerine bağımlı olarak meydana gelir.

E.risticii obligat intrasellüler bir bakteridir. Başta at hücre kültürleri olmak üzere kanın monosit hücre kültürlerinde, murin makrofaj hücre kültürü P388D1'de veya insan histiyosit hücre kültürü U937'de kolaylıkla in vitro üretilebilir (9).

3)Hayvan Deneyi:

E.risticii ile fare, köpek, kedi ve insan dışındaki primatlarda (Rhesesus maymunu) deneysel enfeksiyonun başarılı olduğunu görülmüştür. Hastalığın klinik bulguları bunlardan yalnızca fare ve kedilerde oluşmaktadır. Seroepidemiolojik

çalışmalar *E.risticii*'nin tilki ve vahşi tavşanlarda da enfeksiyon oluşturduğunu göstermiştir (23).

4) Serolojik Testler:

Ehrlichia'nın teşhisinde ELISA testi kullanılmaktadır. İndirekt floresan antikor testi (IFA) ve ELISA enfekte atlarda *E.risticii*'ye karşı gelişen antikorları saptar (17, 20, 24). IFA testi ile yapılan çapraz reaksiyon çalışmaları *E.risticii*'nin *E.canis*'ten daha çok *E.sennetsu* ile antijenik ilişkisi olduğunu göstermiştir. Yapılan diğer çalışmalarda da granülositik equine patojeni olan *E.equi* ile *E.risticii* arasında çapraz reaksiyon olmadığı ortaya çıkmıştır (2).

5) Diğer Testler:

E.risticii ile *E.sennetsu* antijenlerinin Western blot analizlerinde 11 ortak polipeptidi belirlenmiştir. Bunların dördününün dominant antijenik komponent olduğu düşünülmektedir. Rikihisa ve ark. (24) yürüttükleri çalışmalarda iki midilliye canlı *E.sennetsu* ile deneysel inokülasyon yapılmış ve asemptomatik bir enfeksiyon oluşmuş. Western-blotting analizi ve IFA testi ile *E.sennetsu* ve *E.risticii*'ye karşı kuvvetli bir humoral yanıt saptanmıştır.

PCR yöntemi *E.risticii*'nin saptanması için kullanılan oldukça spesifik ve duyarlı bir metoddur (21, 25).

SAĞALTIM

Penisilin, streptomisin, gentamisin, rifampin, tetrasiklin ve oksitetrasiklin gibi antibiyotiklerin düşük konsantrasyonları *E.risticii*'nin üremesini engeller. Tetrasiklin ve oksitetrasiklin daha etkilidir. Çeşitli çalışmalarda 5-10 gün boyunca 3 mg/ gün tetrasiklin uygulanmış ve EME'li atların tedavisinde etkili olduğu görülmüştür. Sıvı ve elektrolit tedavisi gibi ilave tedaviler de yapılabilmektedir (9).

Tablo 1: *Ehrlichia*'nın taksonomisi (Fishbein DB, 1990).

ALT SINIF	<i>Rickettsiales</i>
FAMİLYA	<i>Rickettsiaceae</i>
TAKIM	<i>Ehrlichiae</i>
GENUS	<i>Ehrlichia</i>
TÜRLER	<i>E.canis</i> (Karnivorların ehrlichiosis'i) <i>E.sennetsu</i> (Sennetsu fever) <i>E.risticii</i> (Potomac horse fever, Atların monositik ehrlichiosis'i) <i>E.equi</i> (Tek tırnaklıların ehrlichiosis'i) <i>E.phagocytophila</i> (koyunlarda tick-borne fever)
ŞÜPHELİ TÜRLER	<i>E.bovis</i> <i>E.platys</i> (köpeklerde enfeksiyöz siklik trombositopeni) <i>E.ovina</i> <i>E.kurlovi</i>

Tablo 2: *Ehrlichia* genusundaki türlerin ayırıcı karakterleri (Ristic M, 1990)

Türler ve buldukları yerler	Hastalık	Deneysel konakçıları	Coğrafik dağılım
MONOSİT			
<i>E.canis</i> ^a	Karnivor ehrlichiosis'i Tropikal kanin pansitopeni	Karnivorlar	Tüm dünya
<i>E.sennetsu</i> ^b	Sennetsu fever	Fare, köpek, maymun	Japonya, Malezya
<i>E.risticii</i> ^c	Atların monositik ehrlichiosis'i (Potomac horse fever)	Fare, köpek, maymun, kedi	Amerika, Kanada, Fransa
GRANÜLOSİT			
<i>E.equi</i> ^c	Tek tırnaklı ehrlichiosis'i	Eşek, koyun, keçi, maymun, isviçre köpek, kedi	Amerika, İsviçre
<i>E.phagocytophila</i> ^d	Tick-borne fever	kobay, fare	İngiltere

^a Evcil ve vahşi karnivorlar; vektör: *Rhipicephalus sanguineus*

^b İnsan

^c Atlar (özellikle evcil atlar)

^d Ruminantlar; vektör: *Ixodes ricinus*

KAYNAKLAR

1. Huxsoll DL. The historical background and global importance of Ehrlichiosis. In: Williams JC, Kakoma I, eds. Ehrlichiosis. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990: 1-8.
2. Ristic M, Huxsoll DL. Tribe II Ehrlichieae Philip 1957, 948^{AL}. In: Krieg NR, Holt JG, eds. Bergey's Manual of Systematic bacteriology: London: Baltimore. 1984: 704-709.
3. Anderson BE, Greene CE, Jones DC, Dawson JE. *Ehrlichia ewingii* sp.nov., the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. Inter J System Bacteriol 1992; 42: 299-302.
4. Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ, Dumler JS. Geographic, clinical, serologic and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. J Clin Microbiol 1996; 34: 44-48.
5. Kakoma I, Hansen RD, Anderson BE, et al. Cultural, molecular and immunological characterization of the etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis. J Clin Microbiol 1994; 32: 170-175.
6. Bradfield JF, Vore SJ, Pryor WH. *Ehrlichia platys* infection in dogs. Lab Anim Sci 1996; 46: 565-568.
7. Chang WL, Pan MJ. Two step polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia platys* in canine infectious cyclic thrombocytopenia. J Chin Vet Scien 1996; 22: 9-16.
8. Fishbein DB. Human ehrlichiosis in the United States. In Williams JC and Kakoma I (eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990; 100-111.
9. Holland CJ. Biologic and pathogenic properties of *Ehrlichia risticii*: The etiologic agent of Equine Monocytic Ehrlichiosis. In Williams JC and Kakoma I, eds. Ehrlichiosis. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990; 68-77.
10. Simpson RM, Gaunt SD, Hair JA, Kocan KM, Henk WG, Casey HW. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. Am J Vet Res 1991; 52: 1537-1541.
11. Stuen S. Human ehrlichiosis in Norway. Norsk-Veterinaertidsskrift. 1996; 108: 245.
12. Telford SR III, Dawson JE, Katavolos P, Warner CK, Kolbert CP, Persing DH. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. Proc National Acad Scien 1996; 93, 6209-6214.
13. Reed KD, Mitchell PD, Persing DH, Kolbert CP, Cameron V. Transmission of human granulocytic ehrlichiosis. JAMA 1995; 273: 23.
14. Dumler RS, Bakken JS. Ehrlichial diseases of humans: emerging tick-borne infections. Clin Infect Dis 1995; 20: 1102-1110.
15. Wen B, Rikihisa Y, Mott J, et al. *Ehrlichia muris* sp.nov., identified on the basis of 16s rRNA base sequences and serological, morphological and biological characteristics. Inter J System Bacteriol 1995; 45: 250-254.
16. Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. J Clin Microbiol 1991; 29: 2838-2842.
17. Holland CJ, Ristic M, Cole AI. Isolation, experimental transmission and characterization of causative agent of Potomac Horse Fever. Science 1985; 227: 522-4.
18. Dawson JE, Abeygunawardena I, Holland CJ, Buese MM, Ristic M. Susceptibility of cats to infection with *Ehrlichia risticii*, causative agent of equine monocytic ehrlichiosis. Am J Vet Res 1988; 49: 2096-100.
19. Rikihisa Y. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial disease. Clin Microbiol Rew 1991; 4: 286-308.
20. Atwill ER, Mohammed HO, Dubovi E, Lopez J. Retrospective evaluation of factors associated with the risk of seropositivity to *Ehrlichia risticii* in horses in New York State. Am J Vet Res 1992; 53: 1931-4.
21. Biswas B, Mulherjee D, Mattingly-Napier BL, Dutta SK. Diagnostic application of Polymerase Chain Reaction for detection of *Ehrlichia risticii* in Equine Monocytic Ehrlichiosis (Potomac Horse Fever). J Clin Microbiol 1991; 29: 2228-33.
22. Ristic M, Holland CJ, Dawson JE, Sessions J, Palmer J. Diagnosis of equine monocytic ehrlichiosis (Potomac Horse Fever) by indirect immunofluorescence. JAMA 1986; 189: 39-46.
23. Stephenson EH. Experimental ehrlichiosis in: nonhuman primates. In Williams JC and Kakoma I (eds). Ehrlichiosis. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990; 93-9.
24. Rikihisa Y, Ewing SA, Fox JC, Siregar AG, Pasaribu FH, Malole MB. Analyses of *Ehrlichia canis* and canine granulocytic ehrlichia infection. J Clin Microbiol 1992; 30: 143-8.

ÖZKÖK. *EHRlichia* VE ATLARIN MONOSİTİK *EHRlichiosis*'İ