

Erlihioze

Ehrlichioses

Miroslav Petrovec*, Stanka Lotrič Furlan**, Tatjana Avšič Županc***

Deskriptorji
erlihioza
Ehrlichia

Descriptors
erlichiosis
Ehrlichia

Izvleček. Erlihioze so zoonoze, ki jih prenašajo klopi in povzročajo obligatne znotrajcelične bakterije iz rodu *Ehrlichia*. Ločimo monocitno erlihiozo, ki jo povzroča *Ehrlichia chaffeensis*, in granulocitno erlihiozo, ki jo povzroča humana granulocitna erlihija. Obe bolezni se kažejo z vročino, levkopenijo, trombocitopenijo in zvišano aktivnostjo transaminaz. Pri zdravljenju so zelo učinkoviti tetraciklini. Avtorji priporočajo, da zdravniki pri vsakem bolniku z vročinsko boleznijo, ki v anamnezi navaja vbod klopa, v diferencialni diagnozi upoštevajo tudi možnost okužbe z erlihijo.

Abstract. Ehrlichioses are zoonotic tick-borne infections that are caused by obligate intracellular bacteria of the genus *Ehrlichia*. Human ehrlichiosis fall into the following two groups: infections caused by *Ehrlichia chaffeensis* and granulocytic ehrlichiosis due to human granulocytic ehrlichia. Both types are associated with fever, leukopenia, thrombocytopenia and elevated serum aminotransferase levels. Therapy with tetracyclines is highly efficacious. The authors suggest that ehrlichiosis be considered in the differential diagnosis of any febrile patient with history of recent tick bite.

Uvod

Erlihioze so zoonoze, ki jih prenašajo klopi. Povzročajo jih erlihije, rikecijam podobni gram-negativni kokobacili, ki jih najdemo znotraj belih krvnih celic. Prvič so bile opisane leta 1935 kot povzročitelj hemoragične bolezni pri psih v Alžiriji, in so dobile ime po nemškem mikrobiologu Paulu Ehrlichu (*Ehrlichia canis*) (1). Značilen je njihov tropizem za (bele) krvne celice. V grobem ločimo monocitne vrste erlihij, ki okužijo monocite in povzročajo monocitno erlihiozo, in granulocitne erlihije, ki okužijo granulocite in povzročajo granulocitno erlihiozo. Nekatere erlihije, ki povzročajo bolezni pri živalih, lahko okužijo tudi trombocite in enterocite. Bolezen se pri človeku kaže kot vročinsko stanje po vbodu klopa ali pa kot huda multisistemska okužba s posledicami na številnih organih.

Erlihioze so bile kot različne živalske bolezni, vse od odkritja njihovega povzročitelja problem veterinarske medicine. V zadnjem desetletju je postala erlihioza v Združenih državah Amerike zelo pogosta bolezen, ki jo prenašajo klopi, z letno incidenco od 3 do 330 primerov na 100.000 prebivalcev na nekaterih hiperendemičnih področjih. S študijem razširjenosti erlihij v klopah so ugotovili, da so klopi z erlihijami prekuženi skoraj tako pogosto kot z *Borrelia burgdorferi* (2, 3). Prva poročila o bolnikih, okuženih z monocitno ali granulocitno vrsto erlihij, prihajajo tudi iz Evrope (4, 5).

* Miroslav Petrovec, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1105 Ljubljana.

** Stanka Lotrič Furlan, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center, Japljeva 2, 1105 Ljubljana.

*** Doc. dr. Tatjana Avšič Županc, dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1105 Ljubljana

Zgodovinski prikaz

Prvo znano okužbo z erlihijami pri ljudeh so dokazali na Japonskem leta 1953 pri bolniku z boleznijo, podobno infekcijski mononukleozii. Povzročitelja so uspešno osamili na laboratorijskih miškah in ga poimenovali *Rickettsia sennetsu*. Opazili so, da kaže novoodkriti povzročitelj veliko navzkrižno serološko reaktivnost z *Ehrlichio canis*. Mikroorganizme so našli v vakuolah obdanih z membrano znotraj mononuklearnih fagocitov. Vse to je bila osnova za reklasifikacijo in preimenovanje v *Ehrlichio sennetsu*. Bolezen se pojavlja zelo redko in je omejena na področje Daljnega vzhoda (6).

Leta 1987 so v ameriški zvezni državi Arkansas prvič opisali okužbo pri gozdnem delavcu po vbodu klopa, ki je bila po klinični sliki podobna mrzlici Skalnega pogorja (povzročitelj *Rickettsia rickettsii*), v krvi pa so našli značilne morule v levkocitih (7). Okužbo z erlihijo so potrdili s serološkimi preiskavami, kjer so kot antigen uporabili *E. canis*, čeprav so kasneje z retrogradnimi serološkimi preiskavami dokazali, da je šlo za okužbo z *Ehrlichio chaffeensis*. Novo vrsto monocitne erlihije – *Ehrlichio chaffeensis* (poimenovano po vojaški bazi Fort Chaffee, Arkansas) so prvič uspešno izolirali iz krvi ameriškega rekruta leta 1990 (8). Dokazano je, da je v ZDA *E. chaffeensis* od leta 1987 do konca 1995 povzročila več kot 400 primerov erlihioze pri ljudeh (9).

V letu 1994 so prvič opisali 12 bolnikov s klinično sliko, podobno erlihiozi, in dokazali novega povzročitelja erlihioze pri ljudeh – humano granulocitno erlihijo (10, 11). Leta 1996 so prvič osamili granulocitno erlihijo na celični kulturi levkemičnih celic človeka (12).

Bioške in ekološke značilnosti rodu Ehrlichia

Povzročitelji erlihioz so obligatni znotrajcelični gramnegativni polimorfni kokobacili, ki so po svojih lastnostih podobni rikacijam. Skupna značilnost vseh erlihij je nagnjenost k okužbi krvnih celic gostitelja (predvsem belih krvničk) in prenos s klopom (6).

Družina *Ehrlichia* predstavlja samostojno družino v redu *Rickettsiales*. Razdeljena je v tri genetske skupine na osnovi primerjav nukleotidnega zaporedja, ki kodira gen za 16S ribosomsko ribonukleinsko kislino (rRNA), serološke reaktivnosti in bioloških značilnosti (13). Nekateri avtorji razvrščajo erlihije tudi po tropizmu za določeno vrsto krvnih celic, vendar ta razvrstitev ni skladna z genetskimi skupinami niti z navzkrižno serološko reaktivnostjo (14).

Vsaka genetska skupina je poimenovana po zgodovinskem prototipu erlihije. Tako danes ločimo: genetsko skupino *E. canis*, genetsko skupino *E. equi* in genetsko skupino *E. sennetsu*. V vsaki genetski skupini je vsaj ena erlihija, ki povzroča bolezen pri človeku (tabela 1).

Erlihije prenaša vsaj šest različnih vrst klopov. Zanesljivo prenaša *E. chaffeensis* klop *Amblyomma americanum*, humano granulocitno erlihijo pa klop *Ixodes scapularis* (2, 15). Erlihije se v klopah lahko prenašajo transstadialno, kar pomeni, da lahko klop ostane po sesanju krvi na okuženem gostitelju kužen za vse življenje. Erlihije se po danes znanih podatkih ne prenašajo transovarialno, zato mora biti v določenem ekosistemu ves čas na voljo dovolj veliko število kronično okuženih gostiteljev (15).

Tabela 1. Biološke značilnosti erlihij in njihova razdelitev v genetske skupine.

	Gostitelj	Način prenosa	Tarčna celica	Bolezen
<i>E. canis</i>	psi	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	monociti/makrofagi	monocitna erlihioza pri psih
<i>E. chaffeensis</i>	človek, srnjad	<i>Amblyomma americanum</i> , <i>Dermacentor variabilis</i>	monociti/makrofagi	monocitna erlihioza pri človeku
<i>E. ewingii</i>	psi	<i>A. americanum</i>	polimorfonuklearni levkociti	granulocitna erlihioza pri psih
<i>E. muris</i>	voluharice	neznan	monociti/makrofagi	–
<i>E. equi</i>	konji	<i>Ixodes spp.</i>	nevtrofilci	granulocitna erlihioza pri konjih
<i>E. phagocytophila</i>	ovce, govedo, srnjad	<i>Ixodes ricinus</i>	nevtrofilci	granulocitna erlihioza pri govedu, ovcah in srnah
<i>Humana granulocitna erlihija</i>	človek, srnjad, glodalci (?)	<i>I. scapularis</i>	nevtrofilci	granulocitna erlihioza pri človeku
<i>E. platys</i>	psi	neznan	trombociti	ciklična trombocitopenija pri psih
<i>E. sennetsu</i>	človek	uživanje surovih rib?	monociti / makrofagi	vročinska bolezen, podobna mononukleozii
<i>E. risticii</i>	konji	neznan	monociti, enterociti, mastociti	Potomac horse fever

Kot najpomembnejši gostitelj monocitne erlihije *E. chaffeensis*, je v ZDA opisana srna (*Oidocoileus virginianus*). Med 1269 živalmi te vrste iz 17 držav ZDA, ki so jih zajeli z epizootološko raziskavo, je bilo 43 % seropozitivnih srn (16). Eksperimentalno so dokazali, da so srne občutljive za okužbo z *E. chaffeensis*. Nobena od živali klinično ni kazala znakov bolezni. S serološkimi preiskavami, z verižno reakcijo s polimerazo in s poskusom osamitve erlihij na celični kulturi so ugotovili, da so erlihije prisotne v krvi vsaj 14 dni po eksperimentalni okužbi. V istem poskusu so poskušali okužiti srne tudi z *E. canis*, vendar pri nobeni od poskusnih živali ni prišlo do bakteriemije niti do serološkega odgovora (17). V ekološki krog so verjetno vključeni tudi mali gozdni sesalci in druge vrste divjih in domačih sesalcev, saj je znano, da se klopi v zgodnjem razvojnem stadiju hranijo predvsem na malih sesalcih (2, 15).

Naravni gostitelj granulocitnih erlihij (*E. equi*, *E. phagocytophila* in humane granulocitne erlihije) ni znan, predvidevajo pa, da so v razvojni krog vključene srne in mali gozdni sesalci (18). Čeprav granulocitne erlihije povzročajo bolezen pri govedu in konjih, je malo verjetno, da so te živali njihov primarni naravni gostitelj.

Klinična slika

Monocitne in granulocitne vrste erlihij povzročijo pri človeku različno hude klinične oblike bolezni. Okužba je lahko asimptomatska, lahke oblike ali pa težke s hudo multior-

gansko prizadetostjo in smrtnim izidom (19). Prospektivne raziskave ogrožene populacije so pokazale, da je razmerje med klinično izraženimi in asimptomatskimi okužbami z erlihijami vsaj 1 : 3 (20, 21).

Klinični znaki okužbe so ne glede na vrsto erlihije, ki povzroči okužbo, podobni, kar kaže na skupni patogenetski mehanizem okužb z erlihijo. Večina bolnikov ima zvišano telesno temperaturo, glavobol, bolečine v mišicah ali sklepah, anoreksijo, lahko pa se pojavijo tudi prebavne težave, kašelj in prizadetost osrednjega živčevja. Večina bolnikov zbolijo med aprilom in septembrom, v času največje aktivnosti klopov. Inkubacijska doba bolezni je približno 7 dni. Obolevajo predvsem ljudje, ki so zaradi svojega poklica ali rekreacije bolj izpostavljeni klopom. Pogosteje obolevajo moški in starejši ljudje (22). V ZDA je imelo 90 % bolnikov pred začetkom bolezni enega ali več klopov (23). Povprečna starost bolnikov je višja kot pri drugih boleznih, ki jih prenašajo klopi (22).

Klinični simptomi in znaki pri okužbah z erlihijami so prikazani v tabeli 2.

Tabela 2. Pogostost kliničnih simptomov in znakov pri bolnikih z erlihiozo (– ni podatka) (22, 24).

Simptomi in znaki	Monocitna erlihioza (%)	Granulocitna erlihioza (%)
Vročina	97	100
Glavobol	81	85
Utrujenost	84	98
Bolečine v mišicah	68	98
Slabost	48	39
Bruhanje	37	34
Kašelj	26	29
Driska	25	10
Izpuščaj	36	2
Bolečina v trebuhu	22	–
Povečane bezgavke	25	–
Zmedenost	20	17

Med 237 bolniki z monocitno erlihiozo v ZDA, ki so bili od leta 1985 do 1990 prijavljeni Centru za nadzor bolezni (CDC), je bilo 62 % zdravljenih v bolnišnici (22). Pri tretjini bolnikov se v prvem tednu bolezni pojavi izpuščaj, ki je makulozen ali papulozen in le redko petehialen. Nekateri bolniki imajo bolečine v trebuhu in drisko. Lahko so povečane bezgavke in jetra, redkeje je povečana vranica. Pri polovici bolnikov so z rentgenskimi preiskavami našli vnetne infiltrate na pljučih (25).

S težjo obliko bolezni pogosteje zbolijo starejši bolniki in imunsko oslabiljeni (26). Čim daljše je obdobje od začetka bolezni do zdravljenja, težja je klinična slika in pogostejši so zapleti. Zaplete so opisali pri 16 % bolnikov (23). Nastopijo po prvem tednu bolezni. Fichtenbaum je prikazal 4 bolnike s klinično sliko toksičnega šoka (27). Lahko pride do odpovedi ledvic, krvavitev v črevesje, pojavijo se znaki diseminirane intravaskularne koagulacije (23), holestaza, holangitis (28) in motnje zavesti z meningitisom (29, 30).

V skupini 61 bolnikov, ki jih je opisal Wong, je 7 (11 %) bolnikov potrebovalo umetno ventilacijo zaradi akutne dihalne stiske (31). Lahko se pojavi tudi rabdomioliza (32), miokarditis (33, 34) in endokarditis (35).

Hude sekundarne okužbe (z virusi in glivami) so opisane predvsem pri hudih in smrtnih primerih bolezni (10, 26). V endemskem področju so ugotovili istočasne okužbe z *B. burgdorferi* (36).

Otroci se okužijo redkeje kot odrasli. Običajno je pri njih napoved poteka bolezni zelo dobra (37). Tudi pri otrocih pogosteje zbolevalo dečki. Najpogostejši znak je visoka vročina, ki včasih preseže 40 °C, drugi simptomi in znaki so podobni tistim, ki jih opazimo pri odraslih bolnikih. Izpuščaj je pogostejši pri otrocih kot pri odraslih, saj se pojavi kar pri 65 % otrok, zbolelih za erlihiozo (38–40).

Patogeneza in patomorfološke spremembe

Patogeneza erlihioze še ni zadovoljivo pojasnjena. Iz dosedanjih opisov je razvidno, da imajo erlihijske okužbe drugačen patogenetski mehanizem od riketsijskih.

Erlihijske prenese v telo klop z vbodom. Drugi načini prenosa niso dokazani, čeprav približno ena tretjina bolnikov ne navaja vboda klopa. Po vbodu prenese kri erlihijske v druge organe (jetra, vranica, kostni mozeg). Tu okužijo posamezne vrste belih krvnih celic, odvisno od vrste erlihijske. Humana granulocitna erlihijska najverjetneje okuži mileoidnega predhodnika, in ne zrelih granulocitov (18, 41).

Ni povsem jasno, ali erlihijske neposredno poškodujejo celice ali sprožijo zaporedje vnetnih in imunskih dogodkov ali gre za prepletanje obeh mehanizmov. Prevladujejo motnje v delovanju mononuklearnih fagocitov. Granulomsko vnetje je značilen odgovor na okužbo z mikroorganizmi (kot so riketsije, mikobakterije, listerije), ki se razmnožujejo znotraj makrofagofagocitnega sistema in jih fagocitne celice niso sposobne uničiti. Pri 75 % pregledanih bolnikov, okuženih z *E. chaffeensis*, so našli nekazeozne granulome v kostnem mozgu, granulomsko vnetje ali histiocitne infiltrate. Različno izražene oblike granulomskega vnetja kažejo na to, da na razvoj erlihijske okužbe v največji meri vpliva imunska sposobnost bolnika (42).

Levkopenijo v periferni krvi razlagajo z razpadom krvnih celic (najverjetneje v vranici, jetrih in bezgavkah), na kar kaže relativni porast populacije monocitnih fagocitov, vključno s hemofagocitnimi makrofagi. Kostni mozeg je običajno hipercelularen, opisani pa so tudi primeri, pri katerih so našli normo- in hipocelularni kostni mozeg (42).

Jetra so prizadeta pri več kot 80 % bolnikov (22). V jetrih so našli žariščne nekroze, granulome podobne tistim pri vročici Q, in znake holestatskega hepatitisa (28, 43). Obžilni infiltrati z limfociti in histiociti so lahko v vseh prizadetih organih (pljučih, vranici, bezgavkah, ledvicah, srcu in možganskih ovojnicah) (42).

Kronične okužbe z erlihijskimi so pogost pojav pri živalih (govedu, drobnici, psih, srnah), še posebej, če te niso zdravljene (44). Ali se lahko pri človeku razvije kronična okužba z granulocitno ali monocitno erlihijsko, ni znano. Do sedaj sta opisani dolgotrajni okužbi le pri dveh bolnikih (43, 45, 46).

Laboratorijske preiskave

Rezultati laboratorijskih preiskav so neznaki. Prve dni okužbe imajo bolniki levkopenijo z limfopenijo (50–60 %), trombocitopenijo (68–90 %) in anemijo (50 %). Vrednosti jetrnih transaminaz in laktatne dehidrogenaze so povišane pri 75 do 90 % bolnikov (23). Limfopenija se že po 2 do 3 dneh uspešnega zdravljenja spremeni v limfocitozo (47).

Pri bolnikih, ki so imeli prizadeto osrednje živčevje, so našli povečano koncentracijo beljakovin v možganski tekočini in limfocitno pleocitozo (30).

Diagnoza

Pri bolniku z vročinsko boleznijo, ki ima levkopenijo in/ali trombocitopenijo ter povišane aktivnosti jetrnih encimov in navaja vbod klopa v zadnjem mesecu, moramo pomisliti na erlihiozo. Pomagamo si z epidemiološkimi podatki (vbod klopa, letni čas, endemsko področje). Bolniki, pri katerih ni bila postavljena pravilna diagnoza in se zdravljenje ni pravočasno začelo s tetraciklini, so imeli hujšo klinično sliko in več zapletov med potekom bolezni.

Mikrobiološka diagnostika erlihioze

Kljub podobni klinični sliki gre pri monocitni in granulocitni erlihiozi za dve različni bolezni, ki ju povzročata dva različna povzročitelja. To dejstvo je treba upoštevati pri laboratorijski diagnostiki erlihioze, saj z metodami, ki jih uporabljamo za dokazovanje monocitne erlihioze, ne moremo dokazati okužbe z granulocitno vrsto erlihij in obratno (41).

Laboratorijsko lahko dokažemo okužbo z erlihijami:

- s pregledom krvnega razmaza, obarvanega po Giemsi ali Wrightu, v katerem iščemo značilne morule znotraj makrofagov ali nevtrofilnih granulocitov,
- s serološkimi preiskavami na protitelesa proti določeni vrsti erlihij,
- s pomnoževanjem gena erlihij, ki kodira zapis za 16S rRNA s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR),
- s poskusom osamitve erlihij na celični kulturi in
- z različnimi imunohistološkimi in imunocitokemičnimi tehnikami.

Krvni razmaz

S svetlobnim mikroskopom lahko v razmazu periferne krvi obarvanem po Giemsi ali Wrightu, najdemo značilne morule – skupke erlihij v fagosomu znotraj fagocitno sposobnih celic (monocitov/makrofagov ali nevtrofilcev). Kljub temu, da je bil prvi bolnik v ZDA odkrit s pomočjo značilnih morul znotraj monocitov, velja za monocitno erlihiozo, da krvni razmaz ni primerna metoda za dokaz okužbe, saj je morule mogoče najti le pri 20 % pregledanih vzorcev (9).

Nasprotno so pri okužbi z granulocitno vrsto erlihij dokazali morule kar v 80 do 100 % pregledanih vzorcev (10). Bakken priporoča na endemskih področjih krvni razmaz kot najhitrejšo in najbolj uporabno presejalno metodo za ugotavljanje okužbe z granulocitno erlihijo (24). Wormser nasprotno poroča, da je bilo med sedmimi primeri serološko potrjene granulocitne erlihioze samo v enem primeru mogoče dokazati morule znotraj granulocitov (48).

Serološka diagnostika erlihioz

Dokazovanje protiteles proti erlihijam, ki povzročajo bolezní pri človeku, je bilo do leta 1990, ko so prvič osamili *E. chaffeensis*, omejeno na določanje protiteles z nadomestnimi antigeni erlihij, ki povzročajo bolezní pri živalih. Za rutinsko diagnostiko monocitne erlihioze uporabljamo metodo indirektné imunofluorescence (IF) (za katero je danes na voljo standardiziran antigen), ki je razmeroma enostavno izvedljiva, vendar zahteva veliko previdnost pri vrednotenju rezultatov. Za pravilno razlago moramo dobro poznati navzkrižno serološko reaktivnost med posameznimi vrstami erlihij.

Pri vrednotenju seroloških izvidov je pomembno tudi poznavanje dinamike tvorbe protiteles. Povprečni čas, ko bolniki razvijejo največji titer protiteles, je šest tednov po začetku bolezní. Serološki odgovor je v prvih dveh tednih mogoče dokazati pri 68 % bolnikov, vendar pri večini bolnikov po 17 do 30 tednih ne moremo več dokazati protiteles. Pri tem tem naj bi igrala pomembno vlogo hitra odstranitev povzročitelja iz krvi in s tem zmanjšanje antigeneskega spodbujanja imunskega sistema (49).

Z metodo Western blot so dokazali, da je serološki odgovor uperjen proti erlihijskim beljakovinom. Z isto metodo so odkrili, da imajo erlihije vsaj 20 različnih beljakovin, ki se razlikujejo po velikosti od 20 do 200 kilodaltonov (kD). Med njimi so nekatere značilne samo za določeno vrsto erlihij, druge pa so skupne vsem erlihijskim vrstam (50–52).

Serološka diagnostika ni primerna pri imunsko oslabljenih bolnikih. Opisan je primer bolnika, okuženega z virusom HIV, pri katerem se je okužba z *E. chaffeensis* končala s smrtjo, ne da bi bolnik razvil protitelesa (26). Diagnozo so potrdili z verižno reakcijo s polimerazo. Tudi zelo zgodnje zdravljenje lahko zavre in celo prepreči nastanek protiteles (18). V vseh večjih raziskavah so odkrili, da nekateri bolniki z ustrežno klinično sliko erlihioze nikoli ne razvijejo protiteles proti erlihijam, čeprav so z verižno reakcijo s polimerazo v njihovi krvi dokazali dele erlihijskega genoma (22–24, 45).

Navzkrižna serološka reaktivnost med *E. chaffensis* in humano granulocitno erlihijo je zelo slaba (24). Za dokaz granulocitne erlihioze pri človeku so zato v vseh dosedanjih seroepidemioloških raziskavah kot antigen uporabljali bele krvne celice živali, okužene z *E. equi* ali *E. phagocytophilo*. Po nedavni uspešni osamitvi povzročitelja na celični kulturi lahko upravičeno pričakujemo, da bo tudi za diagnostiko granulocitne erlihioze kmalu na voljo standardiziran antigen (12).

Po priporočilu Centra za nadzor bolezní v Atlanti vrednotimo kot pozitiven rezultat 4-kratni porast titra protiteles proti *E. chaffensis*, določenih z IF, ali enkratni titer protiteles, ki je večji od 1 : 128. Za granulocitno erlihiozo velja kot pozitiven rezultat, če v obdobju okrevanja v serumu dokažemo protitelesa proti *E. phagocytophili* ali *E. equi* v titru večjem od 1 : 80 (23).

Osamitev erlihij na celični kulturi

Osamitev erlihij na celični kulturi je izredno težavna in dolgotrajna metoda, zato so do danes uspešno osamili samo 5 različnih vrst erlihij. *E. chaffeensis* so le redko uspeli osamiti iz kliničnih vzorcev (8, 53). Za osamitev so uporabili celično kulturo pasjega histio-

citoma DH82. Z različnimi metodami so uspeli erlihije prilagoditi tudi na druge celične kulture (celice Vero, celice mišjega zarodka, celice človeških fibroblastov, celice HeLa) (54).

Goodmanu je uspelo leta 1996 na tkivni kulturi levkemičnih celic človeka HL60 osamiti granulocitno vrsto erlihij (12).

Metoda je izredno zahtevna in dolgotrajna in jo v raziskovalne namene izvajajo le v najboljše usposobljenih laboratorijih.

Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (PCR – polymerase chain reaction) je metoda, s katero lahko s pomočjo encima temperaturno obstojne DNA polimeraze pomnožimo izbrani del zaporedja v molekuli DNA. Metoda je v zadnjih letih pokazala številne uporabne možnosti tudi v mikrobiološki diagnostiki. S to metodo lahko pomnožimo del genoma, značilnega za iskani mikroorganizem, in tako neposredno dokažemo njegovo prisotnost. Metoda omogoča odkrivanje povzročiteljev, ki jih ni mogoče osamiti na celični ali bakterijski kulturi (npr. virus hepatitisa C) (55, 56). Pri dokazovanju bakterij, se je kot posebno primeren izkazal del bakterijskega genoma, ki vsebuje zapis za rRNA v manjši (16S) podenoti ribosomov. Gen za 16S rRNA se v evoluciji zaradi svojih funkcijskih lastnosti (prevajanje DNA) ne spreminja enako na vseh svojih delih. Sestoji iz visoko ohranjenega dela, skupnega vsem živim organizmom, in spremenljivega dela, ki se lahko razlikuje celo znotraj zelo sorodnih vrst organizmov. Zaradi teh lastnosti je gen za 16S rRNA idealen molekularni označevalec za filogenetske raziskave v bakteriologiji. Na osnovi primerjav podobnosti zaporedja za 16S rRNA med posameznimi organizmi se je razvila nova veda – molekularna filogenija (57).

Verižna reakcija s polimerazo je med vsemi diagnostičnimi metodami edina, s katero lahko opredelimo erlihije na ravni vrste. Metodo so najprej uporabili za natančno filogenetsko in taksonomsko uvrstitev erlihij, ki so povzročile bolezen pri človeku. Dokazali so, da gre v primeru *E. chaffeensis* za povsem novo vrsto erlihije. Tudi za dokaz erlihij v kliničnih vzorcih uporabljamo metodo PCR, kjer pomnožujemo značilni odsek DNA, ki kodira zapis za 16S rRNA. Da dokažemo erlihijsko okužbo, uporabimo začetne oligonukleotide, ki pomnožijo del genoma, ki je skupen vsem erlihijskim vrstam. V drugi reakciji (t. i. nested PCR) uporabimo PCR pridelek prve reakcije, in znotraj tega izberemo začetne oligonukleotide, ki pomnožujejo samo za določeno vrsto značilen odsek, in tako natančno določimo vrsto erlihije. Uspešnost dokaza je odvisna od števila okuženih belih krvnih celic in od tega, ali je bil vzorec odvzet dovolj zgodaj v poteku bolezni (10). Občutljivost metode PCR je med 80 in 87 %, specifičnost reakcije pa je ob pravilno izvedenem postopku 100 % (58, 59).

Dele genoma erlihij so uspešno pomnožili iz različnih vzorcev. Kot izhodišni material so uporabili kri bolnikov in živali, likvor, lizat klopotov in okužene celične kulture. Erlihijsko DNA so uspeli dokazati tudi v serumu bolnikov, kar je odraz sproščanja erlihij iz okuženih celic (46).

Imunohistološke in imunocitokemične metode

Imunohistološke tehnike uporabljamo za dokaz erlihij v tkivnih in citoloških vzorcih. Z označenimi antierlihijskimi protitelesi lahko natančno lokaliziramo erlihije v posameznih tkivih.

vih ali celicah. Metodi sta primerni predvsem za študij patogeneze in za dokazovanje okužbe z erlihijami v avtopsijskih vzorcih (42, 60).

Priporočila za laboratorijsko diagnostiko erlihioze

Za diagnostiko **monocitne erlihioze** je danes na voljo standardiziran antigen *E. chaffeensis* s katerim lahko s pomočjo indirektna imunofluorescence (IF) dokažemo protitelesa IgG ali IgM. Krvni razmaz je za diagnostiko monocitne erlihioze preslabo občutljiva metoda, saj so erlihijske morule našli le v 20 % pregledanih vzorcev. Pri bolnikih z motnjami imunskega odgovora je nenadomestljiva metoda verižna reakcija s polimerazo, s katero dokazujemo predel genoma, ki je značilen samo za *E. chaffeensis* (9).

Serološka diagnostika **granulocitne erlihioze** je danes omejena na redke raziskovalne laboratorije, kjer dokazujejo serološki odgovor proti živalskim vrstam granulocitnih erlihij (*E. phagocytophila*, *E. equi*). Dokler ne bo na voljo standardiziranega antigena novoodkritih humane granulocitne erlihije, serološke preiskave ne bodo dostopne kliničnim laboratorijem. Krvni razmaz lahko uporabimo kot najhitrejšo in najbolj uporabno presejalno metodo pri sumu na granulocitno erlihiozo (24). Trenutno najbolj zanesljiva in uporabna je kljub visoki ceni in tehnični zahtevnosti metoda verižne reakcije s polimerazo.

Diferencialna diagnoza

V začetni fazi je erlihiozo težko ločiti od virusnih bolezni. Pri bolnikih z izpuščajem moramo pomisliti na okužbo z virusom Epstein-Barr, škrlatinko, rdečke, ošpice, vaskulitis zaradi imunskih kompleksov, meningokokcemijo, sepsa, rikecizio in hemoragično mrzlico z renalnim sindromom. V endemskem področju jo je treba ločiti od vročice Skalnega pogorja (61). Pri erlihiozi ima le ena tretjina bolnikov izpuščaj, ki je redko petehialen.

Če bolniki bruhaajo in imajo drisko, je treba pomisliti na virusne ali bakterijske črevesne okužbe. Pri motnjah zavesti in seroznem meningitisu je treba izključiti lymsko boreliozo, meningokokcemijo, klopni meningoencefalitis in druge virusne meningitise. Pri bolnikih z okvaro jeter upoštevamo pri diferencialni diagnozi tudi virusni hepatitis, leptospirozo, toksoplazmozo in babezijo.

Zdravljenje

Zdravilo izbora so tetraciklini. Odmerek tetraciklina je 25 do 50 mg/kg na dan, doksiciklina pa 100 mg 2-krat na dan (61). Zdravljenje naj traja 7 dni podobno kot pri vročici Skalnega pogorja, lahko tudi 10 dni. Zdravljenje s tetraciklinom zaradi stranskih učinkov ni priporočljivo pri otrocih, nosečnicah in bolnikih, preobčutljivih na tetraciklin. Za zdravljenje teh bolnikov nekateri priporočajo rifampin, ni pa kliničnih izkušenj (23). Uspeh se pokaže že v prvih dveh dneh zdravljenja. Pri nezdravljenih bolnikih je vročina trajala od 17 do 51 dni (45). Veliko bolnikov ozdravi tudi spontano (23). Smrtnost je pri monocitni erlihiozi 2–3 %, dvakrat večja je pri granulocitni erlihiozi (23).

Prvega bolnika v ZDA so zdravili s kloramfenikolom, ki ni bil učinkovit (7). Ugotovili so, da je *E. chaffeensis in vitro* občutljiva na doksiciklin in rifampin. Kloramfenikol, ciprofloksacin, eritromicin, kotrimoksazol, penicilin in gentamicin so se *in vitro* izkazali za neučinkovite (62).

Preprečevanje erlihioze je omejeno na uporabo repelentov, osebne zaščite (primerna obleka in obutev), natančno pregledovanje telesa po vrnitvi iz gozda in odstranjevanje prisesanih klopov. Dokazano je, da uporaba repelentov močno zmanjša možnost okužbe z erlihijami (20). Preventivne uporabe antibiotikov po vbodu klopa v endemskem področju ne priporočajo (61).

Erlihioza v Evropi

Granulocitna in monocitna erlihioza sta opisani tudi pri bolnikih v Evropi. Prvi primer okužbe z monocitno erlihijo *E. chaffeensis* v Evropi so opisali na Portugalskem (4). V seroepidemiološki raziskavi v severni Švici, ki je zajela 70 ljudi z dokazanim vbodom klopa vrste *Ixodes*, so odkrili 12 (17,1 %) preiskovancev, ki so imeli v serumu protitelesa proti antigenu granulocitne erlihije *E. equi*, v titru, večjem od 1 : 100 (63). Okužbe z monocitno in granulocitno erlihijo so opisane tudi v Španiji, Belgiji in Veliki Britaniji (5, 64, 65).

Sklep

Bolezni, ki jih prenašajo klopi predstavljajo v Sloveniji pomemben zdravstveni problem. Zaradi rekreacije, gospodarskih in kmetijskih dejavnosti je velik del prebivalcev izpostavljen klopom in s tem različnim boleznim, ki jih klopi prenašajo. V Sloveniji predstavljata glavnino bolezni, ki jih prenašajo klopi, klopni meningoencefalitis in lymska borelijoza. Seroepidemiološka raziskava, ki je zajela slovenske gozdne delavce, je pokazala, da moramo v Sloveniji pri diagnostiki upoštevati tudi nekatere manj znane in redke povzročitelje bolezni (66).

Upravičeno lahko domnevamo, da je erlihioza prisotna tudi v Sloveniji. V podporo tej trditvi naj naštejemo nekaj dejstev:

- *E. phagocytophila* je bila v Evropi kot povzročitelj bolezni pri živalih opisana že leta 1937,
- bolniki z monocitno in granulocitno erlihiozo so opisani v nekaterih drugih evropskih državah,
- velika razširjenost primernih gostiteljev in prenašalcev erlihioze pri nas – malih gladalcev, srn in klopov vrste *Ixodes*,
- visoka incidenca drugih bolezni, ki jih prenašajo klopi (lymska borelijoza, klopni meningoencefalitis),
- visok delež vzročno neopredeljenih vročinskih stanj v poletnih mesecih in
- dokazane dvojne okužbe z lymsko borelijozo in erlihiozo na endemskih področjih.

Izkušnje iz Združenih držav so tudi za naše področje zelo dragocene, zato priporočamo, da zdravniki pri vsakem bolniku z vročinsko boleznijo, ki v anamnezi navaja vbod klopa, v diferencialni diagnozi upoštevajo tudi možnost okužbe z erlihijo.

Literatura

1. Donatien A, Lestoquard F. Existence en Algerie d'une rickettsia du chien. *Bul Soc Pathol Exot* 1935; 28: 418–9.
2. Pancholi P, Kolbert CP, Mitchell PD, et al. *Ixodes-dammini* as a potential vector of human granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis* 1995; 172: 1007–12.

3. Magnarelli LA, Andreadis TG, Stafford KCd, Holland CJ. Rickettsiae and *Borrelia burgdorferi* in ixodid ticks. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2798–804.
4. Morais JD, Dawson JE, Greene C, Filipe AR, Galhardas LC, Bacellar F. First European case of ehrlichiosis. *Lancet* 1991; 338: 633–4.
5. Sumption KJ, Wright DJM, Cutler SJ, Dale BAS. Human Ehrlichiosis in the UK. *Lancet* 1995; 346: 1487–8.
6. Rikihisa Y. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 286–308.
7. Maeda K, Markowitz N, Hawley RC, Ristic M, Cox D, McDade JE. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *N Engl J Med* 1987; 316: 853–6.
8. Dawson JE, Anderson BE, Fishbein DB, et al. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2741–5.
9. Dawson JE, Warner CK, Standaert S, Olson JG. The interface between research and the diagnosis of an emerging tick-borne disease, human ehrlichiosis due to *Ehrlichia chaffeensis*. *Arch Intern Med* 1996; 156: 137–42.
10. Bakken JS, Dumler JS, Chen SM, Eckman MR, Van Etta LL, Walker DH. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? *JAMA* 1994; 272: 212–8.
11. 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: 589–95.
12. Goodman JL, Nelson C, Vitale B, et al. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 209–15.
13. Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2838–42.
14. Olson JG, Dawson JE. *Ehrlichia*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of clinical microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, 1995: 686–9.
15. Anderson BE, Sims KG, Olson JG, et al. *Amblyomma americanum*: a potential vector of human ehrlichiosis. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49: 239–44.
16. Dawson JE, Childs JE, Biggie KL, et al. White-tailed deer as a potential reservoir of *Ehrlichia* spp. *J Wildl Dis* 1994; 30: 162–8.
17. Dawson JE, Stallknecht DE, Howerth EW, et al. Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2725–8.
18. Walker DH, Dumler JS. Emergence of the ehrlichioses as human health problems. *Emerging Infectious Diseases* 1996; 2: 18–29.
19. Telford SR, Lepore TJ, Snow P, Warner CK, Dawson JE. Human granulocytic ehrlichiosis in Massachusetts. *Ann Intern Med* 1995; 123: 277–9.
20. Yevich SJ, Sanchez JL, DeFraités RF, et al. Seroepidemiology of infections due to spotted fever group rickettsiae and *Ehrlichia* species in military personnel exposed in areas of the United States where such infections are endemic. *J Infect Dis* 1995; 171: 1266–73.
21. Standaert SM, Dawson JE, Schaffner W, et al. Ehrlichiosis in a golf-oriented retirement community. *N Engl J Med* 1995; 333: 420–5.
22. Fishbein DB, Dawson JE, Robinson LE. Human ehrlichiosis in the United States, 1985 to 1990. *Ann Intern Med* 1994; 120: 736–43.
23. Dumler JS, Bakken JS. Ehrlichial diseases of humans: emerging tick-borne infections. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1102–10.
24. Bakken JS, Krueth J, Wilsonnordskog C, Tilden RL, Asanovich K, Dumler JS. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. *JAMA* 1996; 275: 199–205.
25. Eng TR, Harkess JR, Fishbein DB, et al. Epidemiologic, clinical, and laboratory findings of human ehrlichiosis in the United States, 1988. *JAMA* 1990; 264: 2251–8.
26. Paddock CD, Suchard DP, Grumbach KL, et al. Brief report: fatal seronegative ehrlichiosis in a patient with HIV infection. *N Engl J Med* 1993; 329: 1164–7.
27. Fichtenbaum CJ, Peterson LR, Weil GJ. Ehrlichiosis presenting as a life-threatening illness with features of the toxic shock syndrome. *Am J Med* 1993; 95: 351–7.

28. Moskovitz M, Fadden R, Min T. Human ehrlichiosis: a rickettsial disease associated with severe cholestasis and multisystemic disease. *J Clin Gastroenterol* 1991; 13: 86–90.
29. Dimmitt DC, Fishbein DB, Dawson JE. Human ehrlichiosis associated with cerebrospinal fluid pleocytosis: a case report. *Am J Med* 1989; 87: 677–8.
30. Harkess JR, Stucky D, Ewing SA. Neurologic abnormalities in a patient with human ehrlichiosis. *South Med J* 1990; 83: 1341–3.
31. Wong S, Grady LJ. Ehrlichia infection as a cause of severe respiratory-distress. *N Engl J Med* 1996; 334: 273.
32. Shea KW, Calio AJ, Klein NC, Cunha BA. Rhabdomyolysis associated with Ehrlichia-chaffeensis infection. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 1056–7.
33. Williams JD, Snow RM, Arciniegas JG. Myocardial involvement in a patient with human ehrlichiosis. *Am J Med* 1995; 98: 414–5.
34. Vanek NN, Kazi S, Cepero NM, Tang S, Rex JH. Human ehrlichiosis causing left-ventricular dilatation and dysfunction. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 386–7.
35. Brouqui P, Raoult D, Durand JM. Ehrlichia species as possible causative agents of blood culture-negative endocarditis. *J Clin Microbiol Infect* 1996; 1: 148–29.
36. Barton LL, Luisiri A, Dawson JE, Letson GW, Quan TJ. Simultaneous infection with an Ehrlichia and Borrelia burgdorferi in a child. *Ann NY Acad Sci* 1990; 590: 68–9.
37. Barton LL, Rathore MH, Dawson JE. Infection with Ehrlichia in childhood. *J Pediatr* 1992; 120: 998–1001.
38. Edwards MS, Jones JE, Leass DL, Whitmore JW, Dawson JE, Fishbein DB. Childhood infection caused by Ehrlichia canis or a closely related organism. *Pediatr Infect Dis J* 1988; 7: 651–4.
39. Edwards ME. Ehrlichiosis in children. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 1994; 5: 143–7.
40. Rathore MH. Infection due to Ehrlichia canis in children. *Southern Med J* 1992; 85: 703–5.
41. Dumler JS, Bakken JS. Ehrlichial diseases of humans – emerging tick-borne infections. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1102–10.
42. Dumler JS, Dawson JE, Walker DH. Human ehrlichiosis: hematopathology and immunohistologic detection of Ehrlichia chaffeensis. *Hum Pathol* 1993; 24: 391–6.
43. Dumler JS, Sutker WL, Walker DH. Persistent infection with Ehrlichia chaffeensis. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 903–5.
44. Buhles WC, Jr., Huxsoll DL, Ristic M. Tropical canine pancytopenia: Clinical, hematologic, and serologic response of dogs to Ehrlichia canis infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. *J Infect Dis* 1974; 130: 357–67.
45. Roland WE, McDonald G, Caldwell CW, Everett ED. Ehrlichiosis-a cause of prolonged fever. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 821–5.
46. Dumler JS, Bakken JS. Human granulocytic ehrlichiosis in Wisconsin and Minnesota: a frequent infection with the potential for persistence. *J Infect Dis*; 173: 1027–30
47. Caldwell CW, Everett ED, McDonald G, Yesus YW, Roland WE. Lymphocytosis of gamma/delta T cells in human ehrlichiosis. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 761–6.
48. Anonymous. Human granulocytic ehrlichiosis – New York, 1995. *MMWR* 1995; 44: 593–5.
49. Dumler JS. Serodiagnosis of Human Ehrlichioses. *Clinical Immunology Newsletter* 1994; 14: 65–8.
50. Brouqui P, Dumler JS, Raoult D, Walker DH. Antigenic characterization of ehrlichiae: protein immunoblotting of Ehrlichia canis, Ehrlichia sennetsu, and Ehrlichia risticii. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1062–6.
51. Chen SM, Dumler JS, Feng HM, Walker DH. Identification of the antigenic constituents of Ehrlichia chaffeensis. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 52–8.
52. Rikihisa Y, Ewing SA, Fox JC. Western immunoblot analysis of Ehrlichia chaffeensis, E. canis, or E. ewingii infections in dogs and humans. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2107–12.
53. Dumler JS, Chen SM, Asanovich K, Trigiani E, Popov VL, Walker DH. Isolation and characterization of a new strain of Ehrlichia-chaffeensis from a patient with nearly fatal monocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1704–11.
54. Brouqui P, Birg ML, Raoult D. Cytopathic effect, plaque formation, and lysis of Ehrlichia chaffeensis grown on continuous cell lines. *Infect Immun* 1994; 62: 405–11.

55. Poljak M, Avšič Županc T, Seme K. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Med Razgl* 1994; 33: 379–400.
56. Seme K, Poljak M, Avšič Županc T. Sodobna diagnostika okužbe z virusom hepatitisa C. *Med Razgl* 1994; 33: 89–103.
57. Wilson KH. Detection of culture-resistant bacterial pathogens by amplification and sequencing of ribosomal DNA. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 958–62.
58. Everett ED, Evans KA, Henry RB, McDonald G. Human ehrlichiosis in adults after tick exposure. Diagnosis using polymerase chain reaction. *Ann Intern Med* 1994; 120: 730–5.
59. Dumler JS, Asanovich KM, Bakken JS, Richter P, Kimsey R, Madigan JE. Serologic cross-reactions among Ehrlichia equi, Ehrlichia phagocytophila, and human granulocytic Ehrlichia. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1098–103.
60. Yu X, Brouqui P, Dumler JS, Raoult D. Detection of Ehrlichia chaffeensis in human tissue by using a species-specific monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 3284–8.
61. Walker DH, Dumler JS. Ehrlichia chaffeensis (human ehrlichiosis) and other ehrlichiae. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE, eds. *Principles and practice of infectious diseases*. New York: Churchill Livingstone, 1995: 1747–52.
62. Brouqui P, Raoult D. In vitro antibiotic susceptibility of the newly recognized agent of ehrlichiosis in humans, Ehrlichia chaffeensis. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2799–803.
63. Brouqui P, Dumler JS, Lienhard R, Brossard M, Raoult D. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Lancet* 1995; 346: 782–3.
64. Saz JV, Dawson JE, Bacellar F, Merino FJ, Filipe AR. Human ehrlichiosis in Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 1994; 12: 357–8.
65. Pierard D, Levchenko E, Dawson JE, Lauwers S. Ehrlichiosis in Belgium. *Lancet* 1995; 346: 1233–4.
66. Avšič Županc T, Petrovec M, Jelovšek M, Strle F. Medicinsko pomembni arbovirusi v Sloveniji. *Zdrav Vestn* 1995; 64: Suppl III: 15–9.

Prispelo 24. 5. 1996