ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ И ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ГРАНУЛОЦИТАРНОГО АНАПЛАЗМОЗА ЧЕЛОВЕКА

В.Ю. Тетерин[1], Э.И. Коренберг[2], В.В. Нефедова[2], Н.Н. Воробьева[1], В.И. Фризен[3]

[1] Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера, Пермь;
[2] Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва;
[3] Краевая клиническая инфекционная больница, Пермь

Enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction in the laboratory diagnosis of human granulocytic anaplasmosis

V.Yu. Teterin[1], E.I. Korenberg[2], V.V. Nefedova[2], N.N. Vorob'ova[1], V.I. Frizen[3]

[1] Perm State Medical Academy named by academician E.A. Wagner, Perm;
[2] Research Institute of Epidemiology and Microbiology named by N.F. Gamaleya, Moscow;
[3] Perm Regional Hospital of Infectious Diseases, Perm

Резюме. *Проведена диагностика гранулоцитарного анаплазмоза человека с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) у 332 пациентов, находившихся на лечении в краевой клинической инфекционной больнице г. Перми в весенне-летний период 2010 г. с острыми лихорадочными заболеваниями после присасывания клещей. В динамике болезни исследовано 845 сывороток крови тест-системами ООО «Омникс» ГАЧ-ИФА-IgM и ГАЧ-ИФА-IgG, а также 952 пробы сухих пятен крови методом «nested» ПЦР с использованием праймеров ge3a1-ge10r2 и ge9f3-ge2r4 для амплификации генетического материала A. phagocytophilum. Определены оптимальные сроки использования ИФА и ПЦР. Обоими методами анаплазмоз подтвержден у 79 пациентов (ИФА — у 68, ПЦР — у 25). В целом, серодиагностику, в частности ИФА, и ПЦР следует рассматривать не как альтернативные, а как взаимодополняющие друг друга методы лабораторной диагностики анаплазмоза.*

Ключевые слова*: гранулоцитарный анаплазмоз человека, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция.*

Abstract. *With the help of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR) in 332 patients with acute feverish illness after a tick bite, treated at the Perm Regional Hospital of Infectious Diseases in the spring-summer period of 2010, the diagnostics of human granulocytic anaplasmosis was performed. By Omnix's test-systems HGA-ELISA-IgM and HGA-ELISA-IgG 845 serum, as well as by «nested» PCR, using primers ge3a1-ge10r2 and ge9f3-ge2r4 for A. phagocytophilum genetic material amplification, 952 samples of dried blood spots were studied in the dynamics of the disease. The optimal period for the use of ELISA and PCR was determined. Anaplasmosis was confirmed by both methods in 79 patients (ELISA — in 68, PCR — in 25). In general, serodiagnosis, particularly ELISA, and PCR should be regarded not as alternative but as complementary to each other's methods of laboratory diagnosis of anaplasmosis.*

Key words*: human granulocytic anaplasmosis, enzyme-linked immunoassay, polymerase chain reaction.*

Введение

Впервые гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ) был диагностирован в США в 1991 г., а его этиология уточнена в 1994 г. [1, 2]. В 2002 г. в Предуралье в крови диких рыжих полевок (*Clethrionomys glareolus*) была обнаружена ДНК возбудителя анаплазмоза — *A. phagocytophilum* [3], что свидетельствовало о существовании в России природных очагов ГАЧ. Одновременно появились первые описания клинической картины анаплазмоза в России, лабораторно подтвержденного серологически методом иммуноферментного анализа (ИФА) при тестировании сывороток крови пациентов с антигеном лошадиных эрлихий (*E. equi*) [4]. Клиническая характеристика анаплазмоза в Пермском крае, выявленного с помощью новых отечественных рекомбинантных тест-систем для ИФА, была получена в 2006 г. [5—7]. К настоящему времени случаи ГАЧ диагностированы во многих регионах Российской Федерации [8—11], однако изученность этой инфекции остается недостаточной. Наиболее сложную задачу представляет лабораторная диагностика анаплазмоза, которая может осуществляться выделением возбудителя на культуре ткани, микроскопическим и серологическим методами, а также полимеразной цепной реакцией (ПЦР) [12].

При микроскопии мазков периферической крови, окрашенных по Райту, в цитоплазме нейтрофилов можно обнаружить морулы анаплазм и эрлихий, которые отличаются разнообразием форм и размеров [1, 13]. Этот метод недостаточно специфичен и требует большой осторожности при оценке его результатов [12, 14, 15]. Изоляция возбудителя на культуре клеток промиелоцитарной лейкемии HL-60 высокоэффективна, однако методика недоступна большинству лабораторий, так как требует наличия соответствующей культуры клеток и длительного времени (от нескольких дней до двух недель) [16]. Наиболее распространенный способ лабораторного подтверждения ГАЧ — серологическая верификация. Она может осуществляться непрямой реакцией иммунофлюоресценции (нРИФ) [17], методом ИФА [6, 18], а также иммуноблоттингом [19]. В настоящее время нРИФ используют реже, в основном из-за ее недостаточной специфичности [20, 21]. В нашей стране чаще прибегают к ИФА [5, 9—11]. Применение рекомбинантного антигена для ИФА, приготовленного с использованием поверхностного белка 44-kDa (HGE-44) возбудителя анаплазмоза, позволило значительно повысить специфичность (98%) и чувствительность (87%) этого метода [18]. Иммуноблоттинг до сих пор не имеет широкого распространения из-за значительных экономических затрат, трудоемкости и перекрестных результатов с моноцитарным эрлихиозом человека [19].

Антитела к анаплазмам у переболевших могут выявляться на протяжении ряда лет, независимо от проведенной ранее этиотропной терапии [17, 22]. Поэтому серологическое подтверждение заболевания основывается на четырехкратном и более нарастании титра иммуноглобулинов М при исследовании сывороток крови с интервалом в 2—3 недели или при сероконверсии IgM на IgG [23]. Метод ПЦР для определения специфической ДНК *A. phagocytophilum*, предложенный еще в 1994 г. [1], считается наиболее информативным в начальный период заболевания, когда у пациентов наиболее вероятно присутствие возбудителя в крови [26, 27]. Его аналитическая чувствительность (при постановке nested) в крови достигает менее 2 копий 16S рРНК гена [27]. Диагностическая чувствительность ПЦР в острую фазу болезни до применения антимикробной терапии по результатам разных исследований достигает 67—95%, а специфичность — 100% [14, 22, 28].

Существует ряд ДНК-мишеней, которые были апробированы с целью усовершенствования генодиагностики анаплазмоза. Различная диагностическая чувствительность ПЦР обусловлена как выбором «мишени», так и подбором соответствующих праймеров, а также различиями в проведении самой ПЦР (выделение ДНК, режим амплификации и т.д.). Наибольшей чувствительностью обладала реакция, направленная на выявление сегмента 16S рРНК гена [16, 21, 22, 29, 30], содержащего видо- и штамо-специфичные последовательности, благодаря которым возможна точная характеристика изолятов. Это позволило рекомендовать данную «мишень» как предпочтительную для генотипирования *A. phagocytophilum* [31]. Чувствительность наиболее успешного набора праймеров для амплификации сегмента 16S рРНК гена (ge9f и ge10r) в некоторых исследованиях достигала 86%, а специфичность — 100% [29].

Цель работы — определение оптимальных сроков применения полимеразной цепной реакции для лабораторной диагностики ГАЧ и сравнительный анализ ее результативности с серологическим методом.

Материалы и методы

В весенне-летний период 2010 г. проведено комплексное клинико-лабораторное обследование 332 пациентов (186 мужчин и 146 женщин в возрасте от 15 до 84 лет), госпитализированных в ГУЗ «ККИБ» г. Перми с заболеваниями, возникшими после присасывания клещей. Большинство больных — 239 человек (72%) — поступили в стационар в первые 7 дней от начала заболевания.

Для серологического исследования на клещевой энцефалит (КЭ), иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ), моноцитарный эрлихиоз (МЭЧ) и ГЭЧ брали кровь в динамике заболеваний. При поступлении в стационар определяли наличие специфических IgM к возбудителю ГАЧ; в период разгара болезни (через 7—14 дней после первой пробы) — одновременно IgM и IgG, а в последующих пробах, взятых, как правило, через месяц и позднее — IgG. В общей сложности от 332 больных было исследовано 845 сывороток.

Для выявления иммуноглобулинов М и G к антигену вируса клещевого энцефалита использовали тест-системы ООО «Омникс» и ЗАО «Вектор-бест».

Серодиагностику ИКБ и МЭЧ проводили с помощью тест-систем ООО «Омникс» Боррелиоз-ИФА-IgM, Боррелиоз-ИФА-IgG, МЭЧ-ИФА-IgM и МЭЧ-ИФА-IgG. Для подтверждения анаплазмоза также применяли тест-системы ООО «Омникс»: ГАЧ-ИФА-IgM и ГАЧ-ИФА-IgG. При обработке результатов использовали значения оптической плотности (ОП) с последующим расчетом значений $ОП_{крит.}$ и коэффициента серопозитивности сыворотки по формулам, приведенным в инструкциях. За положительные принимали ОП более 0,250 (как для IgM, так и для IgG). В таблице 1 показано число сывороток, исследованных на наличие антител к возбудителю ГАЧ в разные сроки от начала заболевания.

Таблица 1

Число сывороток, исследованных в разные сроки от начала заболевания серологическим методом для обнаружения IgM и IgG к возбудителю ГАЧ

Класс выявлявшихся иммуноглобулинов	Сроки от начала заболевания (в днях)					
	1 – 7	8 – 14	15 – 21	22 – 28	29 – 35	36 и более
	Исследовано сывороток					
IgM	239	246	99	32	7	13
IgG	1	192	72	33	10	195

На основании клинико-эпидемиологических и серологических данных среди обследованных пациентов ГАЧ диагностирован в общей сложности у 68 (20,5%). При этом моноинфекция ГАЧ выявлена всего у 7 человек (10,3% от числа случаев), а микст-инфекция в разнообразных сочетаниях с ИКБ, КЭ, МЭЧ и лептоспирозом – у 61(89,7%) человека.

Кроме того, у всех пациентов с 1-го по 78-й дни от начала заболевания взяты пробы крови на фильтровальную бумагу для исследования ПЦР-методом. От каждого пациента было получено как минимум по две пробы (за исключением 14 пациентов, у которых была взята только одна проба): первую брали при поступлении пациента в стационар, вторую – через 7 – 14 дней после первой, а последующие – с интервалом 7 – 10 дней. Всего получено 952 пробы сухих пятен крови, которые исследованы ПЦР-методом с целью обнаружения генетического материала анаплазм (табл. 2).

ПЦР осуществляли в лаборатории переносчиков инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи. Для получения геномной ДНК из сухих пятен цельной крови использовали коммерческий набор «Проба-НК» (ЗАО «ДНК Технология», Россия, Москва). ПЦР проводили в 4-канальном термоциклере Терцик этой же фирмы. При необходимости пробы до исследования хранили при температуре -20°. Для получения в «nested» ПЦР ампликонов *A. phagocytophilum* применяли праймеры ge3a1-ge10r2 и ge9f3-ge2r4, фланкирующие участок 16S рРНК гена [46]. С целью контроля и правильной интерпретации результатов использована ДНК *A. phagocytophilum*. Ампликоны исследованы методом горизонтального электрофореза в 1 – 2% агарозном геле в присутствии бромистого этидия и трис-боратного буфера при напряжении 165 V; для анализа агарозных гелей использована видеосистема «DNA Analyzer» с программами «Gel-Imager» и «Gel-analysis» версии 1.0.

Результаты и обсуждение

Из 68 пациентов с диагнозом ГАЧ, выставленным в 2010 г. на основании клинико-эпидемиологических и серологических данных, 41 (60,3%) был обследован серологически как минимум трехкратно; остальные пациенты (за исключением одного, у которого была взята лишь 1 проба крови) – двукратно. В общей сложности на наличие иммуноглобулинов М исследовано 68 первых сывороток, из которых 28 (41,2%) были положительными. Коэффициент серопозитивности при этом колебался от 1,1 до 5,9. Вторая порция крови исследована у 67 пациентов: иммуноглобулины М обнаружены у 28 (41,8%) больных, а иммуноглобулины G – у 24 (35,8%). В последующих пробах IgG были выявлены у 18 (26,5%) человек.

Для большей репрезентативности данных, использующихся с целью выявления оптимальных

Таблица 2

Число проб сухих пятен крови, полученных от пациентов в разные сроки от начала заболевания и исследованных методом ПЦР (в скобках – % от числа проб, полученных в данные сроки)

Характеристика проб	Сроки от начала заболевания (в днях) и число полученных проб.						Всего
	1 – 7	8 – 14	15 – 21	22 – 28	29 – 35	36 и более	
Первая	233 (98,3)	58 (21,7)	24 (11,6)	6 (4)	2 (3,9)	8 (19,5)	331
Вторая	4 (1,7)	205 (76,8)	69 (33,3)	26 (17,5)	4 (7,9)	9 (22)	317
Третья		4 (1,5)	109 (52,6)	63 (42,3)	17 (33,3)	9 (22)	202
Четвертая			5 (2,4)	52 (34,9)	26 (51)	11 (26,8)	94
Пятая				2 (1,3)	2 (3,9)	4 (9,7)	8
ВСЕГО (% от общего числа проб)	237 (24,9)	267 (28,0)	207 (21,7)	149 (15,7)	51 (5,4)	41 (4,3)	952 (100)

сроков применения серологического метода, результаты, полученные в 2010 г., объединены с результатами [5] исследования 224 сывороток, взятых в эпидсезоны 2003—2004 гг. от 112, переболевших анаплазмозом (табл. 3).

Рисунки 1 и 2 отражают распределение конкретных показателей оптической плотности (ОП), полученных при исследовании в ИФА всех сывороток от 180 пациентов с ГАЧ в разные сроки от начала заболевания, а также их апроксимизированные значения.

Показатели, превышающие критический уровень ОП для иммуноглобулинов М, чаще появляются, начиная с 9-го дня, и достигают максимума на 13—24-й день от начала заболевания. При этом уже на первой неделе болезни положительными оказываются до 25,5% проб, так что первую сыворотку желательно получить как можно раньше после начала проявлений инфекции. На второй неделе болезни количество положительных проб возрастает почти в 2 раза, достигая пика на 3—4-й неделе (до 66,7%); на 5-й неделе заболевания оно несколько снижается (до 50%). Положительные значения показателей ОП сохраняются примерно до 35-го дня от начала болезни. Это согласуется с результатами, полученными другими исследователями у пациентов с ГАЧ, сыворотки которых исследованы в ИФА с разными рекомбинантными антигенами. В первые 10 дней болезни IgM были обнаружены в 14,8—59,2% проб [32]. По другим данным, на первой неделе заболевания антитела выявляются лишь у 25% пациентов, а на второй — уже у 75% [24], а наибольшую диагностическую ценность серологический метод имеет со 2-й по

Таблица 3

Результаты исследования в ИФА сывороток крови, взятых в разные сроки от начала заболевания у 180 пациентов с диагнозом ГАЧ

Сроки от начала заболевания (в днях)	Наличие иммуноглобулинов «М»		Наличие иммуноглобулинов «G»	
	Исследовано сывороток	Из них положительных: абс. (% P±2mp)	Исследовано сывороток	Из них положительных: абс. (% P±2mp)
1—7	51	13 (25,5±12,2)	26	23 (88,5±12,5)
8—14	72	34 (47,2±11,7)	55	23 (41,8±13,3)
15—21	63	42 (66,7±11,9)	52	35 (67,3±13)
22—28	39	26 (66,7±15,1)	38	32 (84,2±11,8)
29—35	16	8 (50±25)	23	21 (91,3±11,7)
36 и больше	6	1 (16,7±30,4)	26	16 (61,5±19,1)
Всего сывороток	247 (100%)	124 (50,2%)	220 (100%)	150 (68,2%)

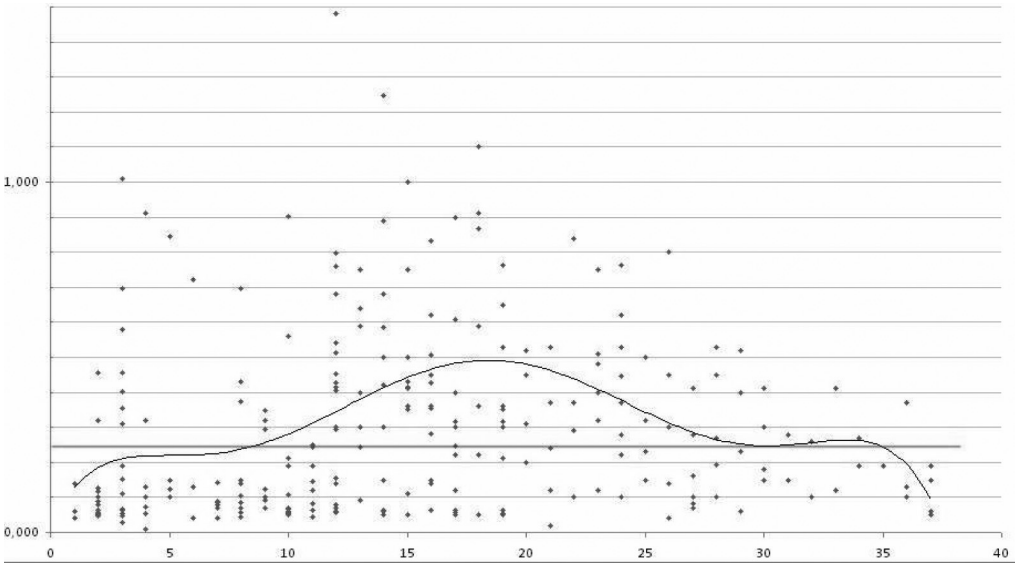

Рис. 1. Конкретные показатели ОП (точки), полученные при исследовании в ИФА на наличие IgM в сыворотках крови 180 больных ГАЧ в разные сроки от начала заболевания, и их апроксимизированное выражение (график).Толстая горизонтальная линия — пороговый уровень, выше которого результат в соответствии с инструкциями производителя тест-систем следует считать положительным. По оси ординат — значения ОП; по оси абсцисс — дни от начала заболевания

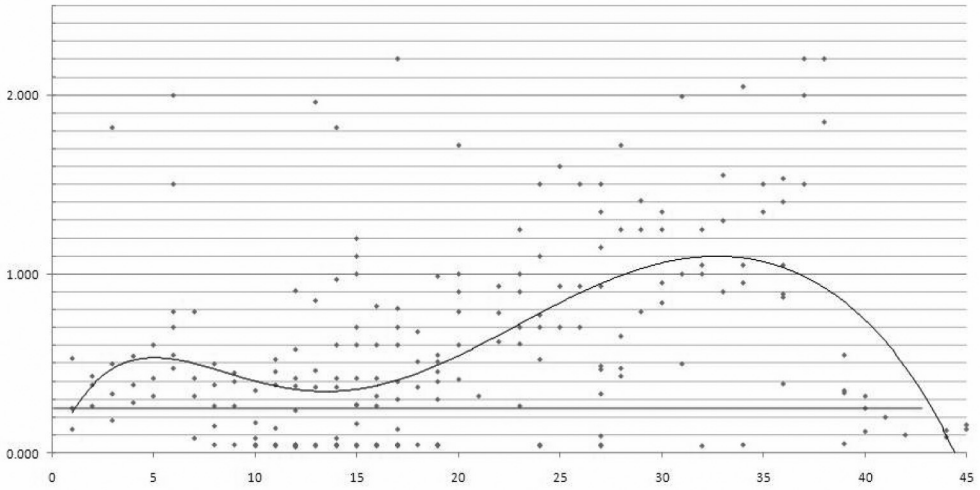

Рис. 2. Конкретные показатели ОП (точки), полученные при исследовании в ИФА на наличие IgG в сыворотках крови 180 больных ГАЧ в разные сроки от начала заболевания, и их апроксимизированное выражение (график). Толстая горизонтальная линия — пороговый уровень, выше которого результат в соответствии с инструкциями производителя тест-систем следует считать положительным. По оси ординат — значения ОП; по оси абсцисс — дни от начала заболевания

4-ю неделю от начала болезни [25]. Наши исследования позволяют считать, что для выявления четкой положительной сероконверсии иммуноглобулинов М оптимальным сроком повторного анализа крови, видимо, можно считать 3—4-ю неделю от начала заболевания.

Значения ОП для антител класса G, превышающие критический уровень, появляются уже с первых дней развития инфекции, причем вероятность обнаружения IgG в ранние сроки (на первой неделе) высока (до 88,5%). Близкие результаты были получены и другими исследователями: IgG в первые 10 дней болезни определялись в 44,4—70,4% случаев [32]. На второй неделе от начала болезни количество положительных проб составляет всего 41,8%. В последующий период этот показатель постепенно увеличивается (как и средние значения ОП) и достигает максимума только на 4—5-й неделях болезни (до 84,2—91,3%). Значения, превышающие критический уровень ОП наиболее велики на 27—38-й дни от начала заболевания (см. рис. 2). По всей видимости, этот период оптимален для получения повторной сыворотки крови пациента с целью выявления положительной сероконверсии иммуноглобулинов G. В целом, ИФА для выявления IgG к возбудителю ГАЧ может, по нашим данным, быть наиболее демонстративной в период с 3-й по 6-ю неделю (с максимальными показателями на 4—5-й неделях) от начала заболевания.

Генетический материал анаплазм определялся с 1-го по 66-й дни от начала заболевания. ДНК возбудителей ГАЧ в общей сложности обнаружена в 56 (66,7%) пробах сухих пятен крови, взятой у 25 (7,5%) пациентов, поступивших в стационар после укуса клеща. На протяжении всего периода болезни и в более поздние сроки частота его обнаружения была примерно одинаковой и колебалась в пределах 57,1—66,7% случаев, за исключением третьей недели, когда показатели достигли максимальных значений — 80% (табл. 4).

ДНК *A. phagocytophilum* у 17 (68%) пациентов обнаружена уже в первой пробе крови, причем у 9 из них в первую неделю болезни, что свидетельствует

Таблица 4

Результаты исследования сухих пятен крови от 25 пациентов с ПЦР-положительными пробами

Сроки от начала заболевания (в днях)	Исследовано проб	Из них число и процент (P±2mp) проб с ДНК анаплазм
1—7	15	9 (60±25,3)
8—14	19	12 (63,2±22,1)
15—21	20	16 (80±17,9)
22—28	17	11 (64,7±23,2)
29—35	6	4 (66,7±38,5)
36 и больше	7	4 (57,1±37,4)
Всего проб	84 (100%)	56 (66,7%)

о результативности метода ПЦР в остром периоде ГАЧ (рис. 3).

У 48% ПЦР-положительных пациентов ДНК анаплазм обнаружена во всех исследованных пробах крови, включая взятые на 4—5-й неделе болезни. Это, с одной стороны, достоверно подтверждает диагноз, а с другой — свидетельствует о длительном присутствии генетического материала или самого возбудителя ГАЧ в крови, даже несмотря на то, что половина пациентов, у которых все пробы были положительными, получали доксициклин не менее 10 дней.

Сравнение приведенных результатов серодиагностики и метода ПЦР показывает, что для лабораторного подтверждения ГАЧ на первой неделе заболевания ИФА выглядит более результативно (см. выше). На 2—3-й неделе от начала заболевания подтверждение ГАЧ наиболее вероятно по результатам ПЦР. Начиная с 6-й недели и в более поздний период от начала заболевания (в фазу реконвалесценции), информативность детекции ДНК анаплазм и IgG примерно одинакова.

Итак, на основании ПЦР и серологического методов анаплазмоз был лабораторно подтвержден у 79 пациентов. При этом в 54 случаях (68,4%) диагноз был подтвержден только серологическими данными. Хотя по нашим данным в условиях обычного инфекционного стационара ИФА выглядит более предпочтительным для лабораторной диагностики ГАЧ, чем ПЦР, серологически не всегда возможно подтвердить диагноз. Это происходит, например, при отсутствии четкого нарастания титра антител или сероконверсии IgM на IgG в динамике заболевания, что на практике часто бывает связано с невозможностью повторно получить для анализа кровь от пациента ввиду его выписки из стационара. Результаты метода ПЦР в 17,7% случаев подтверждали диагноз анаплазмоза, установленный на основании клинико-серологических данных, а в 13,9% оказались положительными при негативной ИФА. Это делает целесообразным его использование как в сомнительных случаях, описанных выше, так и при серонегативной форме ГАЧ, когда есть очевидные указания эпиданамнеза и соответствующие клинические проявления данной болезни.

Заключение

Таким образом, серодиагностику, в частности ИФА, и ПЦР следует рассматривать не как альтернативные, а как взаимодополняющие друг друга методы лабораторной диагностики ГАЧ.

Литература

1. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper midwest United States. A new species emerging? / J.S. Bakken [et al.] // JAMA. — 1994. — № 3. — P. 212—218.

2. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease / S.M. Chen [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1994. — № 3. — P. 589—595.

3. Выявление в России природных очагов бабезиоза и гранулоцитарного эрлихиоза / С.Р. Телфорд [и др.] // Журнал микробиологии — 2002. — № 6. — С. 21—25.

4. Клинико-лабораторная характеристика гранулоцитарного эрлихиоза человека на юге Дальнего Востока России / Ю.Н. Сидельников [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2002. — № 3. — С. 28—31.

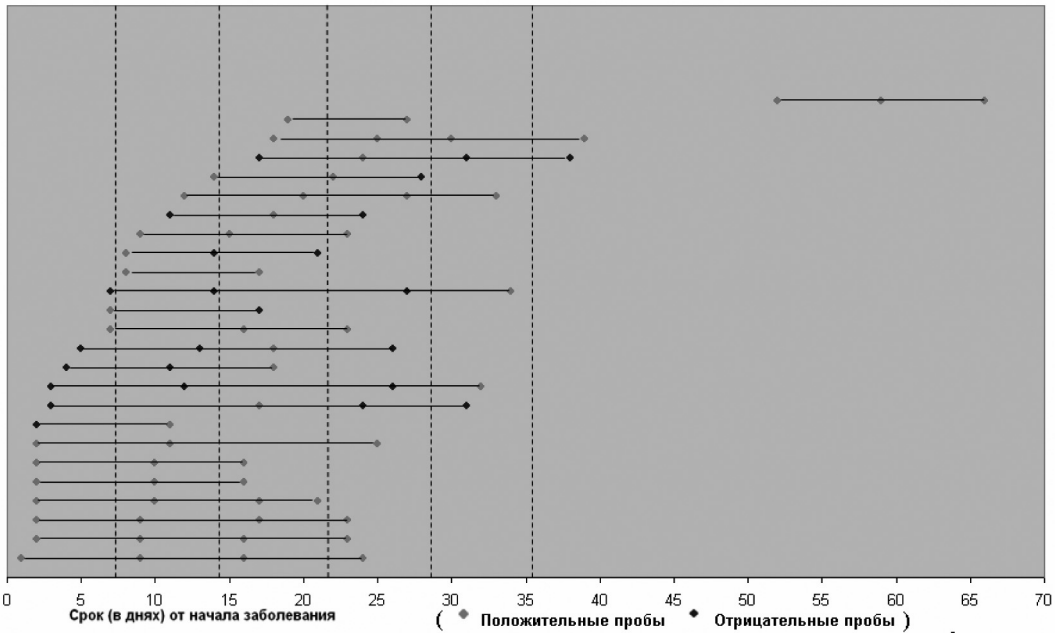

Рис. 3. Результаты исследования всех проб сухих пятен крови, взятых в разные сроки от начала заболевания у каждого из 25 ПЦР-положительных пациентов. Срок (в днях) от начала заболевания (♦ — положительные пробы; ♦ — отрицательные пробы)

5. Афанасьева, М.В. Клинико-эпидемиологическая характеристика гранулоцитарного анаплазмоза человека в России (на примере Пермского края) : автореф....дис. канд. мед. наук / М.В. Афанасьева. — М., 2006. — 20 с.

6. Клинико-лабораторная апробация новых отечественных тест-систем для серологической верификации моноцитарного эрлихиоза и гранулоцитарного анаплазмоза человека / М.В. Афанасьева [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика — 2005. — № 1. — С. 45—48.

7. Гранулоцитарный анаплазмоз человека: особенности клинических проявлений в России / М.В. Афанасьева [и др.] // Инфекционные болезни. — 2006. — № 2. — С. 24—28.

8. Ермак, Т.Н. Эрлихиозы / Т.Н. Ермак // Инфекционные болезни: национальное руководство / под ред. Н.Д. Ющука, Ю.Я. Венгерова. — М., 2009. — С. 576—582.

9. Дальнейшие наблюдения в природных очагах клещевого риккетсиоза на территории Алтайского края / А.С. Оберт [и др.] // Эпидемиология и инфекцинные болезни. — 2007. — № 4. — С. 34—36.

10. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами, в северных районах Омской области / Н.А. Пеньевская [и др.] // Пермский медицинский журнал. — 2009. — № 5. — С. 32—39.

11. Клещевые микстинфекции (иксодовый клещевой боррелиоз и гранулоцитарный эрлихиоз человека) в Ярославской области / Е.С. Алешковская [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2008. — № 2. — С. 6—8.

12. Коренберг, Э.И. Эрлихиозы — новая для России проблема инфекционной патологии / Э.И. Коренберг // Медицинская паразитология. — 1999. — № 4. — С. 10—16.

13. Serial measurements of hematological counts during the active phase of human granulocytic ehrlichiosis / J.S. Bakken [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 2001. — № 6. — P. 862—870.

14. Bakken, J.S. Human granulocytic ehrlichiosis / J.S. Bakken, J.S. Dumler // Clin. Infect. Dis. — 2000. — № 2. — P. 554—560.

15. Walker, D.H. Diagnosing human ehrlichioses: current status and recommendations / D.H. Walker // Am. Soc. Microbiol. News. — 2000. — № 5. — P. 287—290.

16. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis / J.L. Goodman [et al.] // N. Engl. J. Med. — 1996. — № 4. — P. 209—215.

17. Serology of culture-confirmed cases of human granulocytic ehrlichiosis / M. E. Aguero-Rosenfeld [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2000. — № 2. — P. 635—638.

18. Serodiagnosis of human granulocytic ehrlichiosis by a recombinant HGE-44 — based enzyme-linked immunosorbent assay / J.W. Ijdo [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1999. — № 11. — P. 3540—3544.

19. Western blot analysis of sera reactive to human monocytic ehrlichiosis and human granulocytic ehrlichiosis agents / A. Unver [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2001. — № 11. — P. 3982—3986.

20. False-positive Lyme disease serology in human granulocytic ehrlichiosis / G.P. Wormser [et al.] // Lancet. — 1996. — № 9006. — P. 981—982.

21. Ismail, N. Human ehrlichiosis and anaplasmosis / N. Ismail, K.C. Bloch, J.W. McBride // Clin. Lab. Med. — 2010. — №1. — P. 261—292.

22. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis / J.S. Bakken [et al.] // JAMA. — 1996. — № 3. — P. 199—205.

23. Aguero-Rosenfeld, M.E. Diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis: state of the art / M.E. Aguero-Rosenfeld // Vector Borne Zoonotic Dis. — 2002. — № 4. — P. 233—239.

24. Dumler, J.S. Tick-borne ehrlichioses / J.S. Dumler, D.H. Walker // Lancet. — 2001. — № 1. — P. 21—28.

25. Bakken, J.S. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis / J.S. Bakken, J.S. Dumler // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2006. — V. 1078. — P. 236—247.

26. Thomas, R.J. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis / R.J. Thomas, J.S. Dumler, J.A. Carlyon // Expert Rev. Anti. Infect. Ther. — 2009. — № 6. — P. 709—722.

27. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae / R.F. Massung [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1998. — № 4. — P. 1090—1095.

28. Improved sensitivity of PCR for diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis using epank1 genes of Ehrlichia phagocytophila — group ehrlichiae / J.J. Walls [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2000. — № 1. — P. 354—356.

29. Edelman, D.C. Evaluation of an improved PCR diagnostic assay for human granulocytic ehrlichiosis / D.C. Edelman, J.S. Dumler // Mol. Diag. — 1996. —№ 1. — P. 41—49.

30. Микроорганизмы порядка Rickettsiales у таежного клеща (ixodes persulcatus sch.) в Предуралье / В.В. Нефедова [и др.] // Вестник Российской АМН. — 2008. — № 7. — С. 47—50.

31. Silaghi, C. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases / C. Silaghi, G. Liebisch, K. Pfister // Parasit. Vectors. — 2011. — № 4. — P. 161.

32. Serodiagnosis of human granulocytic ehrlichiosis by using novel combinations of immunoreactive recombinant proteins / M.J. Lodes [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2001. — № 7. — P. 2466—2476.

Авторский коллектив:

Тетерин Владимир Юрьевич — аспирант кафедры инфекционных болезней Пермской государственной медицинской академии им. академика Е.А. Вагнера; тел.: (342)236-45-66;e-mail: voltair_777@yahoo.com, infect-perm@mail.ru;

Коренберг Эдуард Исаевич — руководитель отдела природноочаговых инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, заслуженный деятель науки РФ, академик РАЕН, д.б.н., профессор; тел.: (499)190-43-69, e-mail: edkorenberg@yandex.ru;

Нефедова Валентина Валерьевна — старший научный сотрудник лаборатории переносчиков инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, к.б.н.; тел.: (499)190-43-69; e-mail: valentinnef@mtu-net.ru;

Воробьева Наталья Николаевна — заведующая кафедрой инфекционных болезней Пермской государственной медицинской академии им. академика Е.А. Вагнера, д.м.н., профессор; тел.: (342)236-45-66; e-mail: infect-perm@mail.ru;

Фризен Владимир Иванович — главный врач Краевой клинической инфекционной больницы, к.м.н.; тел.: (342)236-42-68; e-mail: infect-perm@mail.ru