



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Амплитек»

А.В. Ходяков

15.02.2024

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РНК/ДНК
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАЮЩИХСЯ ЧЕЛОВЕКУ
ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ, TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS,
BORRELIA BURGDORFERI S.L., *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM*,
EHRLICHIA CHAFFEENSIS / *EHRLICHIA MURIS* МЕТОДОМ ОТ-ПЦР/ПЦР С
ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» (AMPLITECH TBI (R))
ПО ТУ 21.20.23-038-19926214-2024

Инструкция по применению

Лист утверждения

СОГЛАСОВАНО

Заместитель генерального директора по
науке ООО «Амплитек»

А.С. Коновалов

15.02.2024

Руководитель научной группы
ООО «Амплитек»

Г.А. Хайруллина

15.02.2024

Научный сотрудник отдела разработка и
адаптации продукции ООО «Амплитек»

А.А. Филичева

15.02.2024

Amplitech TBI (R)

Набор реагентов для качественного определения РНК/ДНК возбудителей инфекций, передающихся человеку иксодовыми клещами, Tick-borne encephalitis virus, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis* / *Ehrlichia muris* методом ОТ-ПЦР/ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech TBI (R)) по ТУ 21.20.23-038-19926214-2024

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

IVD

Форма 1 **REF** P027-1 ∇_{Σ} 48

Форма 2 **REF** P027-2 ∇_{Σ} 96

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1 НАЗНАЧЕНИЕ	5
2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	5
3 ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	5
4 РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ, ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ	5
5 ФОРМЫ ВЫПУСКА	5
6 СОСТАВ	6
7 ПРИНЦИП МЕТОДА	7
7.1 Характеристика положительного контроля ПК Т.....	7
8 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	7
9 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	8
10 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	10
11 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	11
11.1 Автоматизированная экстракция НК и подготовка к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР с использованием формы выпуска 1 и автоматической станции «Amplitech E1». Проведение ОТ-ПЦР/ПЦР и детекции.....	11
11.2 Экстракция НК и ручная подготовка к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР с использованием формы выпуска 1 или 2. Проведение ОТ-ПЦР/ПЦР и детекции.....	13
12 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	14
13 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ	15
14 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	17
14.1 Контроли, используемые в процессе исследования.....	17
14.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации.....	17
14.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований.....	17
15 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	17
15.1 Предел обнаружения.....	17
15.2 Аналитическая специфичность.....	18
15.3 Прецизионность измерения.....	19
15.4 Диагностические характеристики.....	19
16 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА 20	
16.1 Срок годности.....	20
16.2 Хранение.....	20
16.3 Транспортирование.....	20
16.4 Эксплуатация.....	20
17 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ	20
18 БИБЛИОГРАФИЯ	21
19 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	21
20 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	22
21 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА	22
22 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	22

ВВЕДЕНИЕ

1. Настоящая инструкция по применению версии 15.02.24 распространяется на медицинское изделие «Набор реагентов для качественного определения РНК/ДНК возбудителей инфекций, передающихся человеку иксодовыми клещами, Tick-borne encephalitis virus, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis* / *Ehrlichia muris* методом ОТ-ПЦР/ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech TBI (R)) по ТУ 21.20.23-038-19926214-2024» (далее – набор).

Краткое наименование набора: Amplitech TBI (R).

Набор следует применять в соответствии с действующей версией инструкции по применению. Для удобства работы в лаборатории допускается использовать действующую версию краткого руководства по применению набора.

2. Научная обоснованность

К наиболее распространенным инфекциям, передаваемым иксодовыми клещами, относят Tick-borne encephalitis virus (TBEV), *Borrelia burgdorferi* s.l., *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis* и *Ehrlichia muris*. Перечисленные микроорганизмы являются этиологическими агентами таких серьезных заболеваний, как клещевой вирусный энцефалит (КЭ), болезнь Лайма (клещевой боррелиоз), моноцитарный эрлихиоз человека, гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ). Начальные симптомы указанных инфекций обычно похожи и неспецифичны, и часто имеют общую симптоматику с острой респираторной вирусной инфекцией (ОРВИ): лихорадка неясной этиологии, головные и мышечные боли, недомогание [1, 2] Во всех этих случаях, для постановки точного диагноза, необходимо провести клиническую диагностику, дополненную различными методами лабораторной диагностики. ПЦР в реальном времени обладает высокой чувствительностью, специфичностью и объективностью полученных результатов. Набор реагентов «Amplitech TBI (R)» позволяет выявлять, дифференцировать РНК/ДНК указанных микроорганизмов в рамках одной реакции.

Anaplasma phagocytophilum – это грамотрицательный внутриклеточный облигатный патоген, передающийся иксодовыми клещами и вызывающий анаплазмоз мелкого и крупного рогатого скота и ГАЧ. Наиболее частые симптомы ГАЧ – лихорадка неясной этиологии, головные и мышечные боли, общее недомогание – проявления, которые схожи с симптомами ОРВИ. Кроме описанных симптомов, гораздо реже встречаются тошнота, рвота, боли в брюшной области, анорексия, диарея, боли в суставах, кашель. Поскольку ГАЧ – потенциально серьезная или даже летальная инфекция, ранняя диагностика и лечение имеют жизненно важное значение [3].

Ehrlichia – маленькие (около 0,5 мкм) облигатные внутриклеточные бактерии, которые обитают в виде микроколоний в вакуолях макрофагов или полиморфноядерных лейкоцитов. Одна цитоплазматическая вакуоль содержит от 1 до 5 бактерий, и каждая клетка может содержать более 400 вакуолей [1]. Эти бактерии переносятся клещами от зараженных жвачных животных, оленей и грызунов. Так как эрлихии живут в слюне клеща, то заражение происходит при присасывании клеща к

человеку. Два вида эрлихий — *E. chaffeensis* и *E. muris* считаются возбудителями МЭЧ. Для МЭЧ характерен общий инфекционный синдром, который начинается с высокой (до 38-40°C) температуры и озноба, а также слабости и головной боли. У многих пациентов присутствуют такие симптомы, как першение в горле, заложенность носа, непродуктивный кашель, гиперемия лица, инъекция сосудов склер и конъюнктив, гиперемия слизистых оболочек ротоглотки. Отсутствие патогномоничных симптомов в клинической картине МЭЧ существенно затрудняет определение инфекции без ее лабораторного подтверждения.

Borrelia burgdorferi sensu lato (s.l.) – это комплекс, состоящий из различных групп бактерий, распространенных по всему миру, и который включает в себя 18 видов спирохет. Для человека патогенными являются три вида: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* и *B. afzelii*. *B. burgdorferi sensu stricto* ассоциируется с преимущественным поражением суставов, *B. garinii* - с развитием менингоэнцефалита, *B. afzelii* - с кожными поражениями [1].

B. burgdorferi – грамотрицательная спиралевидная бактерия со множеством эндофлагелл, с помощью которых она может активно передвигаться. Длина клетки *B. burgdorferi* варьирует от 10 до 30 мкм, ширина - от 0,2 до 0,5 мкм [1]. Переносчиками бактерии являются иксодовые клещи: таежный (*I. persulcatus*) и лесной (*I. ricinus*) [1]. *B. burgdorferi* является возбудителем болезни Лайма (иксодовый клещевой боррелиоз). Это комплексное мультисистемное бактериальное заболевание, при котором поражаются кожа, суставы, сердце и нервная система, часто принимает хроническое течение.

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) – это основной вирусный патоген, передающийся людям от клещей. TBEV содержит РНК-цепь длиной примерно 11 тысяч оснований и кодирующих один полипротеин. Часто инфекция, вызванная TBEV, протекает бессимптомно, но симптоматические случаи имеют такие проявления как менингит, энцефалит и менингоэнцефалит [1]. Клещевой энцефалит (КЭ) - тяжелое заболевание, которое часто приводит к пожизненным неврологическим осложнениям [1] и может привести к смерти.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для качественного определения РНК TBEV (вируса клещевого энцефалита (Tick-borne encephalitis virus)), РНК *Borrelia burgdorferi* s.l. (возбудителя иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ)), РНК *Ehrlichia chaffeensis* и *Ehrlichia muris* (возбудителей моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ)), ДНК *Anaplasma phagocytophilum* (возбудителя гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ)) в биологическом материале человека (цельная кровь, плазма крови, спинномозговая жидкость (ликвор)) и иксодовых клещах методом ОТ-ПЦР (РНК TBEV, *B. burgdorferi* s.l., *E. chaffeensis*, *E. muris*) и ПЦР (ДНК *A. phagocytophilum*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения ОТ-ПЦР/ПЦР используют образцы РНК/ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Набор предназначен для лабораторной диагностики *in vitro* (выявление РНК TBEV, *B. burgdorferi* s.l., *E. chaffeensis*, *E. muris*, ДНК *A. phagocytophilum*). Применение набора не зависит от популяционных и демографических аспектов.

2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Набор предназначен для применения в клинической лабораторной диагностике для исследования клещей¹ и биологического материала, полученных от лиц с подозрением на наличие инфекций, передающихся иксодовыми клещами. Отрицательные результаты исследования с помощью набора не исключают возможность инфицирования микроорганизмами, выявляемыми с помощью набора, и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о лечении пациента. Отрицательные результаты исследования должны сочетаться с клиническими наблюдениями, историей болезни и эпидемиологической информацией.

Набор может применяться в клинико-диагностических лабораториях.

3 ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказания к применению набора отсутствуют.

4 РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ, ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ

При применении набора по назначению, в соответствии с данной инструкцией риски и побочные эффекты отсутствуют.

5 ФОРМЫ ВЫПУСКА

Набор выпускается в двух формах² (см. таблицу 1).

Таблица 1

Описание форм выпуска набора

Форма	Описание	Количество исследований, в том числе для контролей
1	Готовые к применению реакционные ПЦР-смеси в виде геля, раскапанные в 96-луночный планшет	48
2	Готовые к применению реакционные ПЦР-смеси для разнесения по пробиркам	96

¹ Согласно СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» (Раздел XX, п. 1647-1648).

² Набор в форме выпуска 1 упакован в коробку из картона, в форме выпуска 2 - в полиэтиленовый пакет с застёжкой Zip-Lock.

6 СОСТАВ

Состав набора указан в таблицах 2, 3, 4.

Таблица 2

Состав формы 1

Компонент	Номинальный объем, мл	Кол-во	Внешний вид
Планшет с реагентами TBI (R)	—	1 шт.	96-луночный делимый планшет, заклеенный защитной плёнкой, с реагентами в виде геля на дне пробирок
Плёнки для планшета	—	2 шт.	Клейкие плёнки
ВК (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с НК внутреннего контроля)	0,96	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ОК (Буферный раствор)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ПК Т (Раствор, содержащий генно-инженерные конструкции с фрагментами НК выявляемых микроорганизмов)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
Инструкция по применению	—	1 шт.	В бумажном виде и электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/
Краткое руководство	—	1 шт.	В бумажном виде
Паспорт	—	1 шт.	В электронном виде ³ по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/

Таблица 3

Расположение реагентов в планшете

Ряды пробирок	Реагент	Внешний вид
A, C, E, G	Смесь TBI (R)-1 (Реакционная ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, дНТФ, солями)	Гель от светло-голубого до синего цвета на дне пробирок
B, D, F, H	Смесь TBI (R)-2 (Реакционная ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, ревертазой, дНТФ, солями)	Гель от светло-розового до красного цвета на дне пробирок

Таблица 4

Состав формы 2

Компонент	Номинальный объем, мл	Кол-во	Внешний вид
Смесь TBI (RW)-1 (Реакционная ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, дНТФ, солями)	0,96	1 пробирка	Прозрачная жидкость от светло-фиолетового до фиолетового цвета
Смесь TBI (RW)-2 (Реакционная ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, ревертазой, дНТФ, солями)	0,96	1 пробирка	Прозрачная жидкость от светло-фиолетового до фиолетового цвета
ВК (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с НК внутреннего контроля)	0,96	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость

³ В случае отсутствия доступа к Интернету обратитесь в службу технической поддержки по телефону (495) 374-13-46 для запроса о предоставлении бумажной версии паспорта.

Компонент	Номинальный объем, мл	Кол-во	Внешний вид
ОК (Буферный раствор)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ПК Т (Раствор, содержащий генно-инженерные конструкции с фрагментами НК выявляемых микроорганизмов)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
Инструкция по применению	–	1 шт.	В бумажном виде и электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/
Краткое руководство	–	1 шт.	В бумажном виде
Паспорт	–	1 шт.	В электронном виде ² по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/

7 ПРИНЦИП МЕТОДА

Исследование с помощью набора проводится методом ПЦР (для смесей TBI (R)-1/ TBI (RW)-1) и ОТ-ПЦР (для смесей TBI (R)-2 / TBI (RW)-2) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Детекция продуктов амплификации и раздельное выявление мишеней обеспечивается применением в двух реакционных смесях для ПЦР флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, сигналы от которых регистрируются по различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 5).

Таблица 5

Каналы детекции мишеней

Канал детекции сигнала от флуорофора	Мишень	Область амплификации
Смесь TBI (R)-1 / Смесь TBI (RW)-1		
FAM	ДНК <i>A. phagocytophilum</i>	msp2 gene
R6G ⁴	–	–
ROX	–	–
Cy5	ДНК ВК	Искусственно синтезированная последовательность
Смесь TBI (R)-2 / Смесь TBI (RW)-2		
FAM	РНК <i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i>	16S rRNA gene
R6G	РНК <i>B. burgdorferi</i> s.l.	23S rRNA gene
ROX	РНК TBEV	polyprotein
Cy5	РНК ВК	Искусственно синтезированная последовательность

7.1 Характеристика положительного контроля ПК Т

Концентрация клонированных фрагментов НК всех выявляемых микроорганизмов в ПК Т составляет $5 \lg \pm 0,5 \lg$ копий/мл. Концентрация определяется с помощью установленной производителем методики выполнения измерений на основе метода лимитирующих разведений [4, 5].

8 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором требуются оборудование и материалы, указанные в таблице 6.

⁴ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

Оборудование и материалы, необходимые для работы с набором

Необходимое оборудование и материалы в случае	
автоматизированной подготовки к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР для формы выпуска 1	ручной подготовки к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР для форм выпуска 1 и 2
• автоматическая станция пробоподготовки «Amplitech E1» («Амплитек», Россия; РУ № РЗН 2022/16981); • программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология»; РУ № ФСР 2011/10229), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; РУ № ФСЗ 2008/03399), Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.; РУ № РЗН 2019/8446)); • холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С; • ёмкость для сброса использованных материалов; • перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.	• ПЦР-бокс; • центрифуга-вортекс (РУ № ФС № 2005/518); • дозаторы переменного объема, механические или электронные, с возможностью дозирования от 5 до 200 мкл (РУ № ФСР 2009/05681); • программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология»; РУ № ФСР 2011/10229), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; РУ № ФСЗ 2008/03399), Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.; РУ № РЗН 2019/8446)); • штатив для ПЦР-планшетов (при использовании формы 1); • штатив для пробирок объемом 0,2 мл (при использовании формы 2); • холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С; • пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с оптически прозрачной крышкой, одноразовые, свободные от ДНКаз и РНКаз (при использовании формы 2); • наконечники для дозаторов переменного объема, с фильтром, объемом до 20 мкл, одноразовые, свободные от ДНКаз и РНКаз; • ёмкость для сброса использованных материалов; • перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.

9 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Класс потенциального риска применения набора (согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ № 4н от 06.06.2012) – 2Б.

Вирус клещевого энцефалита (TBEV) отнесён ко II группе патогенности, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*, *E. muris* – к III группе патогенности, *B. burgdorferi* s.l. – к IV группе патогенности.

Согласно СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» (Раздел XX, п. 1645) исследования на наличие маркеров TBEV в материале от людей и энтомологическом материале с использованием метода ОТ-ПЦР без выделения возбудителя могут проводиться в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение на выполнение работ с использованием ПБА III-IV групп патогенности.

Работа с набором должна проводиться в лаборатории, использующей методы амплификации нуклеиновых кислот для исследования материала, с соблюдением требований ГОСТ Р 52905 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы

амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», СанПиН 3.3686-21.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов исследования.

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в соответствии с СанПиН 3.3686-21 (раздел IV).

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Утилизировать реагенты и плёнки для планшета (использованные, неиспользованные, пришедшие в негодность в связи с истечением срока годности и/или несоблюдением регламентированного режима хранения, транспортирования и применения), внешнюю упаковку набора, эксплуатационную документацию в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» к утилизации медицинских отходов класса Г.

- Не открывать пробирки с продуктами амплификации в процессе их сбора и утилизации.

- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию, указанному в таблицах 2-4 для соответствующей формы выпуска набора.

- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

- Использовать отдельный для каждого образца/реагента одноразовый наконечник с фильтром.

- Использовать защитную одежду в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Все операции проводить только в одноразовых неопудренных перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

Реагенты, входящие в состав набора, содержат натрия азид в концентрации не более 0,05 %, поэтому не классифицируются как опасные для здоровья человека и окружающей среды. При контакте немедленно промыть поражённое место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

Использование набора по назначению и соблюдение вышеперечисленных мер предосторожности исключает негативное воздействие на организм человека.

10 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Набор предназначен для исследования только биологического материала, указанного в разделе 1. Взятие, предварительную обработку, транспортирование и хранение биологического материала следует проводить в соответствии с:

- МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»;

- требованиями, перечисленными в таблицах 7 и 8.

Таблица 7

Требования к взятию и предварительной обработке исследуемого материала

Взятие цельной крови

Взятие цельной крови провести натошак или через 3 ч после приёма пищи в пробирку с антикоагулянтом (раствором ЭДТА).

ВНИМАНИЕ! Недопустимо использовать гепарин в качестве антикоагулянта.

Тщательно перемешать кровь с антикоагулянтом, несколько раз перевернув пробирку.

Предобработка цельной крови для получения плазмы

Пробирки с цельной кровью центрифугировать 20 мин при 800–1600 x g при комнатной температуре. Затем отобрать плазму в количестве не менее 1 мл с использованием отдельного для каждого образца наконечника с фильтром в стерильные одноразовые пробирки.

Взятие и предобработка ликвора

Отобрать спинномозговую жидкость в количестве не менее 1 мл с помощью стерильной одноразовой иглы в стерильную одноразовую пробирку.

Предобработка:

Пробирки с 1–1,5 мл ликвора центрифугировать 10 мин при 10000 x g. Надосадочную жидкость перенести в контейнер с дезраствором, оставив в пробирке осадок клеток и 200 мкл надосадочной жидкости.

Взятие и предобработка клещей

Клеща помещают в пробирку 1,5–2 мл.

Предобработка:

В пробирку с клещом внести 500 мкл (допускается увеличение объёма до 1,0 мл при исследовании полностью напивавшегося клеща) 0,9 % стерильного изотонического раствора натрия хлорида или фосфатного буферного раствора и гомогенизировать пробу. При ручной гомогенизации клещей с высокой степенью напитанности рекомендуется перед гомогенизацией проколоть его одноразовой иглой для выхода крови и предупреждения разбрызгивания материала при растирании в ступке. Перенести пробу, используя отдельный наконечник с фильтром, в пробирку объёмом 1,5 мл и центрифугировать в течение 2 мин при 2000 x g для осветления пробы. Для экстракции РНК/ДНК из клещей использовать 100 мкл надосадочной жидкости.

В оставшийся объём суспензии внести глицерол (10 % по объёму оставшейся суспензии), пробу перемешать и заморозить.

Таблица 8

Требования к условиям транспортирования и хранения исследуемого материала

Условия транспортирования и хранения

Цельная кровь

При температуре от 2 °С до 8 °С не более суток.

ВНИМАНИЕ! Недопустимо замораживание цельной крови.

Плазма крови

- При температуре от 2 °С до 8 °С не более 5 суток;
- При температуре минус 20 °С не более года;
- Допускается однократное замораживание материала.

Ликвор (до и после предобработки)

- При температуре от 2 °С до 8 °С в течение суток;
- При температуре минус 20 °С в течение недели;
- Допускается однократное замораживание материала.

- До предобработки при температуре минус 20 °С в течение месяца.
- После предобработки при температуре минус 20 °С в течение недели. Допускается однократное замораживание материала.

11 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

11.1 Автоматизированная экстракция НК и подготовка к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР с использованием формы выпуска 1 и автоматической станции «Amplitech E1». Проведение ОТ-ПЦР/ПЦР и детекции

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы необходимо ознакомиться с руководством по эксплуатации автоматической станции «Amplitech E1».

Экстракцию НК из исследуемого материала и контролей, а также внесение образцов экстрагированной НК в пробирки планшета с реакционными Смесями TBI (R)-1, TBI (R)-2 провести с использованием автоматической станции «Amplitech E1» (ООО «Ампитек») согласно руководству по её эксплуатации и процедуре, указанной ниже. Для экстракции НК необходимо использовать форму выпуска 1 набора реагентов «НК-К (R)» (ООО «Ампитек»).

11.1.1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ВК, ОК и ПК Т и осадить капли на вортексе.

11.1.2 Подготовить картридж с реагентами из набора «НК-К (R)» и внести в него исследуемые образцы и контроли согласно инструкции по его применению.

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК Т не менее чем в одном повторе.

11.1.3 Установить на рабочий стол автоматической станции картридж с внесёнными исследуемыми образцами и контролями, а также расходные материалы, входящие в состав набора «НК-К (R)», согласно руководству по эксплуатации станции.

11.1.4 Отрезать от планшета необходимое количество пробирок Смесями TBI (R)-1, TBI (R)-2, учитывая, что на каждый исследуемый и контрольный образец должно приходиться по одной пробирке каждого вида Смеси. Схема планшета представлена на рисунке 1.

Ряд	Вид смеси	Столбцы											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TBI (R)-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	TBI (R)-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
C	TBI (R)-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
D	TBI (R)-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E	TBI (R)-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
F	TBI (R)-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
G	TBI (R)-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
H	TBI (R)-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Рисунок 1 – Схема планшета с реагентами

11.1.5 Снять с отрезанных пробирок защитную плёнку.

Примечание – После снятия защитной плёнки использовать реагенты в течение 24 ч.

11.1.6 Установить отрезанные пробирки со Смесями на рабочий стол автоматической станции в адаптер для контейнеров для элюата.

ВНИМАНИЕ! Не допускается оставлять реагенты на рабочем столе станции более чем на 24 ч.

11.1.7 Запустить выполнение следующих протоколов согласно руководству по эксплуатации станции «Amplitech E1»:

а) протокола экстракции НК с использованием штрих-кода для протокола, указанного в кратком руководстве по применению набора «НК-K (R)»;

Примечание – В протоколе указать объём элюции 100 мкл. В случае одновременного запуска протоколов экстракции и подготовки к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР объём элюции не требует ручного ввода, так как уже включён в протокол подготовки к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР.

б) протокола подготовки к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР с использованием штрих-кода для протокола, указанного в кратком руководстве по применению набора «Amplitech TBI (R)».

11.1.8 После завершения протоколов вынуть адаптер с пробирками и заклеить их плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech TBI (R)». Элюат, внесённый в пробирки, содержит полученную в процессе экстракции РНК/ДНК.

ВНИМАНИЕ! Пробирки, заклеенные плёнкой, не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку.

11.1.9 Запрограммировать амплификатор для проведения ОТ-ПЦР/ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной в таблице 9.

Таблица 9

Программа ОТ-ПЦР/ПЦР и детекции при подготовке к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР с использованием автоматической станции «Amplitech E1»

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	2 мин	–	1
3	95	10 с	–	42
	60	20 с	FAM, R6G ⁵ , ROX, Cy5	

Примечания

1) При программировании амплификатора указать объём реакции: 25 мкл.

2) Детекция может назначаться по другим каналам, помимо указанных, при одновременном проведении в одном приборе нескольких тестов с использованием указанной программы.

11.1.10 Поместить пробирки с реакционными смесями и элюатом в амплификатор и запустить программу.

⁵ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

11.2 Экстракция НК и ручная подготовка к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР с использованием формы выпуска 1 или 2. Проведение ОТ-ПЦР/ПЦР и детекции

11.2.1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ВК, ОК и ПК Т и осадить капли на вортексе.

11.2.2 Провести экстракцию НК (с применением автоматической или ручной методики) из исследуемого материала и контролей с использованием набора реагентов «НК-К (R)» (ООО «Ампликтек») согласно инструкции по его применению.

Примечание – Элюцию провести в объеме 100 мкл.

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК Т не менее чем в одном повторе.

11.2.3 В зависимости от используемой формы выпуска набора «Amplitech TBI (R)» провести подготовку к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР в соответствии с таблицей 10.

Таблица 10

Подготовка к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР в зависимости от формы выпуска набора «Amplitech TBI (R)»

Подготовка к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР при использовании	
формы 1	формы 2
- Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесьями TBI (R)-1, TBI (R)-2, учитывая, что на каждый исследуемый и контрольный образец должно приходиться по одной пробирке каждого вида Смеси. Схема планшета представлена на рисунке 1. - Снять с отрезанных пробирок защитную плёнку. Примечание - После снятия защитной плёнки использовать реагенты в течение 24 ч. - Для удобства внесения образцов НК рекомендуется установить отрезанные пробирки в штатив для ПЦР-планшетов. - Внести в подготовленные пробирки по 20 мкл образцов НК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК Т). ВНИМАНИЕ! Каждый образец НК вносится в две пробирки с разными реакционными Смесьями, т.е. для каждого образца по одной пробирке с каждым видом Смеси (TBI (R)-1, TBI (R)-2). ВНИМАНИЕ! При внесении НК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь. - Перемешать содержимое пипетирова-	- Перемешать содержимое пробирок со Смесьями TBI (RW)-1, TBI (RW)-2 и осадить капли на вортексе. - Выставить в штатив для каждого исследуемого и контрольного образца по две ПЦР-пробирки в два ряда, так как каждый образец НК исследуется в двух пробирках с разными реакционными Смесьями (TBI (RW)-1, TBI (RW)-2). Промаркировать пробирки. - Внести в первый ряд подготовленных ПЦР-пробирок по 10 мкл Смеси TBI (RW)-1, во второй ряд по 10 мкл Смеси TBI (RW)-2. - Внести в пробирки с реакционными Смесьями по 15 мкл образцов НК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК Т). ВНИМАНИЕ! Каждый образец НК вносится в две пробирки с разными реакционными Смесьями (TBI (RW)-1, TBI (RW)-2). ВНИМАНИЕ! При внесении НК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь. - Перемешать содержимое пипетированием, не допуская пузырьков воздуха. - После внесения образцов НК закрыть пробирки крышкой.

Подготовка к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР при использовании	
формы 1	формы 2
нием, не допуская пузырьков воздуха. После внесения образцов НК заклеить пробирки плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech TBI (R)». ВНИМАНИЕ! Пробирки после внесения НК не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку.	ВНИМАНИЕ! Пробирки после внесения НК не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на крышку.

11.2.4 Запрограммировать амплификатор для проведения ОТ-ПЦР/ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной в таблице 11.

Таблица 11

**Программа ОТ-ПЦР/ПЦР и детекции
при ручной подготовке к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР**

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	42
	60	20 с	FAM, R6G ⁶ , ROX, Cy5	

Примечания

- 1) При программировании амплификатора указать объём реакции: 25 мкл.
- 2) Детекция может назначаться по другим каналам, помимо указанных, при одновременном проведении в одном приборе нескольких тестов с использованием указанной программы.

11.2.5 Поместить пробирки с реакционными смесями и элюатом в амплификатор и запустить программу.

12 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

12.1 Учёт результатов осуществляется с помощью программного обеспечения используемого амплификатора согласно инструкции по его применению. Рекомендуется выставлять пороговую линию на уровне 10 % от разгорания положительного контроля. Кривые флуоресценции, пересекающие пороговую линию, должны иметь сигмообразную форму.

12.2 Провести интерпретацию результатов для исследуемых образцов согласно таблице 12.

⁶ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат		Интерпретация
Смесь TBI (R)-1 / Смесь TBI (RW)-1		
1	По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного ⁷ . По каналу FAM значение Ct отсутствует.	ДНК <i>A. phagocytophilum</i> в образце не выявлена.
2	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу FAM определено значение Ct.	В образце выявлена ДНК <i>A. phagocytophilum</i> .
3	По каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. По каналу FAM значение Ct отсутствует.	Невалидный результат
Смесь TBI (R)-2 / Смесь TBI (RW)-2		
1	По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного ⁷ . По каналам FAM, R6G, ROX значения Ct отсутствуют.	РНК TBEV, <i>B. burgdorferi</i> s.l., <i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i> в образце не выявлены.
2	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу FAM определено значение Ct.	В образце выявлена РНК <i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i> .
3	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу R6G определено значение Ct.	В образце выявлена РНК <i>B. burgdorferi</i> s.l..
4	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу ROX определено значение Ct.	В образце выявлена РНК TBEV.
5	По двум и более каналам для специфических мишеней (FAM, R6G, ROX) определено значение Ct.	Интерпретация проводится в соответствии с пп. 2–4. Например: В образце выявлены РНК <i>B. burgdorferi</i> s.l., <i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i> .
6	По каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. По каналам FAM, R6G, ROX значения Ct отсутствуют.	Невалидный результат

Результат исследования считают достоверным, если получены валидные результаты для контролей в соответствии с таблицей 13.

Таблица 13

Критерии оценки для контролей

Контроль	Норма
Смесь TBI (R)-1 / Смесь TBI (RW)-1	
ОК	По каналу FAM значение Ct отсутствует. По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного ⁸ .
ПК Т	По каналам FAM, Cy5 значение Ct определено не больше граничного.
Смесь TBI (R)-2 / Смесь TBI (RW)-2	
ОК	По каналам FAM, R6G, ROX значения Ct отсутствуют. По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного ⁸ .
ПК Т	По каналам FAM, R6G, ROX, Cy5 значение Ct определено не больше граничного.

13 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

Рекомендации по устранению возможных ошибок, получаемых для исследуемых

⁷ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве по применению набора.

⁸ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве по применению набора.

образцов и контролей в процессе исследования с помощью набора, указаны в таблице 14.

Таблица 14

Рекомендации по устранению ошибок

Ошибка	Возможная причина возникновения	Рекомендации по устранению
Для ПК на Смеси TBI (R)-1/ Смеси TBI (RW)-1 значение Ct по каналу FAM и/или Cy5 отсутствует или определено больше граничного ⁸ .	Некорректное проведение экстракции НК и/или ОТ-ПЦР/ПЦР.	Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции НК.
Для ПК Смеси TBI (R)-2/ Смеси TBI (RW)-2 значение Ct по каналу FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5 отсутствует или определено больше граничного.	Некорректное проведение экстракции НК и/или ОТ-ПЦР/ПЦР.	Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции НК.
Для ОК на любой из Смесей по каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного.	Некорректное проведение экстракции НК и/или ОТ-ПЦР/ПЦР.	Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции НК.
Для ОК на Смеси TBI (R)-1/ Смеси TBI (RW)-1 по каналу FAM определено значение Ct.	Контаминация реагентов или исследуемых образцов продуктами амплификации.	Предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции НК.
Для ОК на Смеси TBI (R)-2/ Смеси TBI (RW)-2 по каналу FAM и/или R6G и/или ROX определено значение Ct.	Контаминация реагентов или исследуемых образцов продуктами амплификации.	Предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции НК.
Невалидный результат для исследуемого образца на любой из Смесей (значение Ct по каналу Cy5 отсутствует или определено больше граничного, по каналам FAM, R6G, ROX значения Ct отсутствуют).	Некорректное проведение экстракции НК. Наличие в образце ОТ-ПЦР/ПЦР.	Повторить исследование данного исследуемого образца, начиная с этапа экстракции НК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторное взятие и исследование биологического материала.
Для исследуемого образца/контролей определено значение Ct, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъёма (график представляет собой приблизительно прямую линию).	Некорректный выбор уровня пороговой линии или параметров расчёта базовой линии. Некорректное проведение ОТ-ПЦР/ПЦР.	Проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчёта базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца или, в случае некорректного вида графика для контроля, амплификацию и детекцию для всех исследуемых образцов и контролей.

14 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

14.1 Контроли, используемые в процессе исследования

Результаты исследования контролей должны соответствовать критериям оценки, указанным в разделе 12.

14.1.1 Отрицательный и положительный контроли

Каждая группа экстрагируемых образцов должна включать контрольные образцы:

- ОК для выявления контаминации в процессе проведения исследования;
- ПК Т для контроля корректного прохождения исследования.

14.1.2 Внутренний контроль

Для контроля качества экстракции НК и оценки влияния ингибиторов на результаты амплификации используется экзогенный ВК, который добавляется на этапе экстракции НК в каждый исследуемый образец и контроли. Отсутствие результатов амплификации для ВК и одновременно для выявляемых микроорганизмов свидетельствует о присутствии ингибиторов ОТ-ПЦР/ПЦР в образце и/или некорректном проведении экстракции НК.

14.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Для выявления возможной контаминации лаборатории продуктами амплификации, исследуемыми и контрольными образцами рекомендуется раз в месяц исследовать смывы с рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений согласно процедуре, указанной в МУ 1.3.2569-09. При обнаружении контаминации необходимо провести мероприятия по её устранению согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09.

14.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований

Рекомендуется проводить контроль качества выполнения исследований с использованием панелей контрольных образцов, предназначенных для проведения внутреннего и внешнего контролей качества лабораторных исследований по обнаружению НК выявляемых микроорганизмов, либо сравнительным исследованием с использованием зарегистрированных в РФ наборов реагентов для качественного определения НК выявляемых микроорганизмов в биологическом материале методом ОТ-ПЦР/ПЦР.

15 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА⁹

15.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения набора указан в таблице 15.

⁹ Заявленные аналитические характеристики набора, кроме аналитической специфичности, проверены с использованием стандартных образцов предприятия, содержащих векторы со специфическими последовательностями РНК/ДНК выявляемых микроорганизмов.

Предел обнаружения

Мишень	Предел обнаружения, копий/мл	95 %-ый ДИ, копий/мл
ДНК <i>A. phagocytophilum</i>	1000	690 – 1345
РНК <i>B. burgdorferi</i> s.l.	1000	620 – 1226
РНК <i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i>	1000	619 – 1252
РНК TBEV	1000	658 – 1301

15.2 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора оценивалась при тестировании микроорганизмов, указанных в таблице 16, геномной ДНК человека, ДНК искодовых клещей, а также НК выявляемых микроорганизмов. НК микроорганизмов исследовалась в концентрации не менее $1 \cdot 10^6$ копий/мл, ДНК искодовых клещей и геномная ДНК человека - в концентрации 1 мкг/мл. По итогам тестирования ложноположительных результатов выявлено не было.

Таблица 16

Микроорганизмы, используемые для оценки аналитической специфичности

Наименование	Наименование	Наименование
<i>Treponema pallidum</i>	EBV	Influenza virus A (A/Anhui/1/2013 (H7N9))
CMV	HHV6	Influenza virus B (B/Москва/46/2019)
Coronavirus 229E	Parainfluenza virus 1 (Сендай)	VZV
Coronavirus NL63	Parainfluenza virus 2	Вирус лихорадки западного Нила
Coronavirus HKU1	Parainfluenza virus 3	–
Coronavirus OC43	Parainfluenza virus 4	–

15.2.1 Потенциально интерферирующие вещества

Потенциально интерферирующие вещества (ингибиторы ПЦР/ОТ-ПЦР) и их максимальные концентрации в образце, для которых оценивалось их ингибирующее влияние на ПЦР/ОТ-ПЦР, перечислены в таблице 17.

Таблица 17

Потенциально интерферирующие вещества

Исследуемый материал	Интерферент	Активный компонент	Тип интерферента	Концентрация вещества в образце	Обоснование исследованной концентрации
Цельная кровь	Гепарин	Гепарин	Антикоагулянт	0,15 МЕ/мл	Концентрация в вакуумной пробирке
	ЭДТА-К2	ЭДТА-К2		0,5 мМ/мл	
Плазма крови	Гепарин	Гепарин	Антикоагулянт	0,15 МЕ/мл	
	ЭДТА-К2	ЭДТА-К2		0,5 мМ/мл	
Ликвор	Цельная кровь	Гемоглобин, холестерин, триглицериды	Эндогенная субстанция	5 % v/v	Объем в образце в условиях «наихудшего случая»
	Цельная кровь	Гемоглобин, холестерин, триглицериды	Эндогенная субстанция	5 % v/v	
	Глюкоза	Глюкоза	Эндогенная субстанция	10 ммоль/л	
Клещи	Цельная кровь	Гемоглобин, холестерин, триглицериды	Эндогенная субстанция	50 % v/v	
	Растительное масло	Растительное масло	Экзогенная субстанция	20 %	

По результатам оценки было определено вещество (гепарин), ингибирующее ПЦР/ОТ-ПЦР, а также показано, что влияние остальных испытанных веществ в концентрациях согласно таблице 17 на ПЦР/ОТ-ПЦР, проводимую с использованием набора «Amplitech TBI (R)», отсутствует.

15.3 Прецизионность измерения

Коэффициент вариации повторяемости CV_p пороговых циклов (C_t), характеризующий внутрисерийную повторяемость измерений с использованием набора, не превышает 5 %.

Коэффициент вариации воспроизводимости CV_v пороговых циклов (C_t), характеризующий межсерийную воспроизводимость измерений с использованием набора, не превышает 10 %.

15.4 Диагностические характеристики

Значения диагностической чувствительности (ДЧ) и диагностической специфичности (ДС) набора с доверительной вероятностью 95 % указаны в таблице 18.

Таблица 18

Диагностические характеристики

Исследуемый материал	Мишень	Количество образцов		ДЧ, %	ДС, %
		положит.	отрицат.		
Цельная кровь	ДНК <i>A. phagocytophilum</i>	88	188	95,9 – 100	98,1 – 100
	РНК <i>B. burgdorferi</i> s.l.	88	188	95,9 – 100	98,1 – 100
	РНК <i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i>	88	188	95,9 – 100	98,1 – 100
	РНК TBEV	88	188	95,9 – 100	98,1 – 100
Плазма крови	ДНК <i>A. phagocytophilum</i>	88	188	95,9 – 100	98,1 – 100
	РНК <i>B. burgdorferi</i> s.l.	88	188	95,9 – 100	98,1 – 100
	РНК <i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i>	88	188	95,9 – 100	98,1 – 100
	РНК TBEV	88	188	95,9 – 100	98,1 – 100
Ликвор	ДНК <i>A. phagocytophilum</i>	88	188	95,9 – 100	98,1 – 100
	РНК <i>B. burgdorferi</i> s.l.	88	188	95,9 – 100	98,1 – 100
	РНК <i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i>	88	188	95,9 – 100	98,1 – 100
	РНК TBEV	88	188	95,9 – 100	98,1 – 100
Клещи	ДНК <i>A. phagocytophilum</i>	88	188	95,9 – 100	98,1 – 100
	РНК <i>B. burgdorferi</i> s.l.	88	188	95,9 – 100	98,1 – 100
	РНК <i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i>	88	188	95,9 – 100	98,1 – 100
	РНК TBEV	88	188	95,9 – 100	98,1 – 100

16 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

16.1 Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления.

После вскрытия реагенты ВК, ПК Т, ОК, Смесь ТБИ (RW)-1, Смесь ТБИ (RW)-2 использовать до истечения срока годности набора. После снятия защитной плёнки планшет с реагентами ТБИ (R) использовать в течение 24 ч.

Не допускается смешивать компоненты наборов разных серий и использовать набор по истечении срока годности.

16.2 Хранение

Набор в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от 2 °С до 8 °С и относительной влажности воздуха от 25 до 75 % в защищённом от солнечного света месте. Планшет с реагентами ТБИ (R) беречь от влаги.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия.

Не допускается оставлять планшет с реагентами ТБИ (R) на рабочем столе станции более чем на 24 ч.

16.3 Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 °С до 8 °С не более 10 суток всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах.

16.4 Эксплуатация

Реагенты, входящие в состав набора, готовы к использованию.

Повторное применение использованных для исследования реагентов не допускается.

Исследование образцов с использованием набора должно проводиться при температуре от 18 °С до 25 °С и относительной влажности воздуха от 25 % до 75 %.

17 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применены следующие сокращения:

Сt	– cycle threshold (пороговый цикл)
TBEV	– Tick-borne encephalitis virus
в.	– версия
ВК	– внутренний контроль
ДИ	– доверительный интервал
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
НК	– нуклеиновые кислоты
ОК	– отрицательный контроль
ОТ	– обратная транскрипция
ПК	– положительный контроль
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РНКаза	– рибонуклеаза

18 БИБЛИОГРАФИЯ

1. Валишин Д.А., Мурзабаева Р.Т., Мамон А.П., Мамон М.А., Арсланова Л.В. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами: учебное пособие для ординаторов // Изд-во ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – Уфа. – 2015. – С.73.
2. Клинические рекомендации (протокол лечения) оказания медицинской помощи детям больным болезнью лайма // ФГБУ НИИДИ ФМБА России, общественная организация «Евроазиатское общество по инфекционным болезням», Общественная организация «Ассоциация врачей инфекционистов Санкт-Петербурга и Ленинградской области» (АВИСПО). – 2015.
3. Рудаков Н.В. Анаплазмы и анаплазмозы: руководство для врачей. // Омский научный вестник. – 2017. – №100.
4. Taswell C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies // J. Immunology. – 1981. – Vol. 126. – P. 1614–1619.
5. Allen G. Rodrigo, Paul C. Goracke, Kiarash Rowhanian, James I. Mullins. Quantitation of target molecules from polymerase chain reaction-based limiting dilution assays // AIDS research and human retroviruses. – 1997. – Vol. 13 (9). – P. 737–742.

19 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики *ин витро*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *ин витро*. Методы испытаний

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики *in vitro* для профессионального применения

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023 Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования

20 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении условий его транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора направлять в адрес производителя: ООО «Амплитек», 109235, Москва, ул. 1-я Курьяновская, д. 34, стр. 8, этаж 1 пом. II ком. 42, тел. (495) 374-13-46, e-mail: support@amplitech.ru.

Сообщения о неблагоприятных событиях (инцидентах), возникших при работе с набором и не указанных в данной инструкции, следует направлять производителю по указанному выше адресу и в уполномоченный регуляторный орган согласно действующему законодательству.

21 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Консультацию по вопросам по работе с набором и его качеству можно получить по контактам, указанным на официальном сайте производителя: www.amplitech.ru.

22 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Изготовитель



Код серии



Дата изготовления



Использовать до



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Температурный диапазон



Обратитесь к инструкции по применению



Не допускать воздействия солнечного света



Содержимого достаточно для проведения <n> тестов



Не допускать воздействия влаги



Номер по каталогу



Диапазон влажности



Общество с ограниченной ответственностью «Амплитек»
(ООО «Амплитек»),
Россия, 109235, Москва,
ул. 1-я Курьяновская, д. 34, стр. 8, этаж 1 пом. II ком. 42
тел. (495) 374-13-46, www.amplitech.ru,
e-mail: support@amplitech.ru

Лист регистрации изменений

[illegible]

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 24 листа(-ов)

Генеральный директор
ООО «Амплитек»



Подпись

Ходяков А.В.

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 24 ЛИСТОВ

«28» 03 2024 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМЦЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичук П.К.



КОПИЯ
ВЕРНА

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Амплитек»

А.В. Ходяков



15.02.2024

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РНК/ДНК
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАЮЩИХСЯ ЧЕЛОВЕКУ
ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ, TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS,
BORRELIA BURGDORFERI S.L., *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM*,
EHRLICHIA CHAFFEENSIS / *EHRLICHIA MURIS* МЕТОДОМ ОТ-ПЦР/ПЦР С
ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» (AMPLITECH TBI (R))
ПО ТУ 21.20.23-038-19926214-2024

Краткое руководство для формы выпуска 1

Лист утверждения

СОГЛАСОВАНО

Заместитель генерального директора по
науке ООО «Амплитек»

А.С. Коновалов

15.02.2024

Научный сотрудник отдела разработка и
адаптации продукции ООО «Амплитек»

А.А. Филичева

15.02.2024

Amplitech TBI (R)

Набор реагентов для качественного определения РНК/ДНК возбудителей инфекций, передающихся человеку иксодовыми клещами, Tick-borne encephalitis virus, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis* / *Ehrlichia muris* методом ОТ-ПЦР/ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech TBI (R)) по ТУ 21.20.23-038-19926214-2024

КРАТКОЕ РУКОВОДСТВО

IVD

REF

P027-1

LOT

xxxx



48

ВНИМАНИЕ! Перед использованием набора необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению.

Автоматизированная экстракция НК и подготовка к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР с использованием автоматической станции «Amplitech E1». Проведение ОТ-ПЦР/ПЦР и детекции

Материалом для проведения ПЦР-исследования служат образцы РНК/ДНК, экстрагированной из следующих видов исследуемого материала:

- цельная кровь, плазма крови, спинномозговая жидкость (ликвор) человека;
- клещи.

Экстракцию НК и внесение образцов экстрагированной НК в пробирки планшета с реакционными Смесьями TBI (R)-1, TBI (R)-2 провести с использованием автоматической станции «Amplitech E1» (ООО «Амплитек») согласно руководству по её эксплуатации и процедуре, указанной ниже. Для экстракции НК необходимо использовать форму выпуска 1 набора реагентов «НК-К (R)» (ООО «Амплитек»).

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы необходимо ознакомиться с руководством по эксплуатации автоматической станции «Amplitech E1».

1. Перемешать содержимое пробирок с реагентами ВК, ОК и ПК Т и осадить капли на вортексе.
2. Подготовить картридж с реагентами из набора «НК-К (R)» и внести в него исследуемые образцы и контроли согласно инструкции по его применению.

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК Т не менее чем в одном повторе.

3. Установить на рабочий стол автоматической станции картридж с внесёнными исследуемыми образцами и контролями, а также расходные материалы, входящие в состав набора «НК-К (R)», согласно руководству по эксплуатации станции.
4. Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесьями TBI (R)-1, TBI (R)-2, учитывая, что на каждый исследуемый и контрольный образец должно приходиться по одной пробирке каждого вида Смеси. Схема планшета представлена на рисунке 1.

		Столбцы											
Ряд	Вид смеси	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TBI (R)-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	TBI (R)-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
C	TBI (R)-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
D	TBI (R)-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E	TBI (R)-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
F	TBI (R)-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
G	TBI (R)-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
H	TBI (R)-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Рисунок 1 - Схема планшета с реагентами

Снять с отрезанных пробирок защитную плёнку.

Примечание – После снятия защитной плёнки использовать реагенты в течение 24 ч.

- 6 Установить отрезанные пробирки со Смесями на рабочий стол автоматической станции в адаптер для контейнеров для элюата.

ВНИМАНИЕ! Не допускается оставлять реагенты на рабочем столе станции более чем на 24 ч.

- 7 Запустить выполнение следующих протоколов согласно руководству по эксплуатации станции «Amplitech E1»:

а) протокола экстракции НК с использованием штрих-кода для протокола, указанного в кратком руководстве по применению набора «НК-К (R)»;

Примечание – В протоколе указать объём элюции 100 мкл. В случае одновременного запуска протоколов экстракции и подготовки к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР объём элюции не требует ручного ввода, так как уже включён в протокол подготовки к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР.

б) протокола подготовки к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР с использованием штрих-кода для протокола, указанного ниже.



- 8 После завершения протоколов вынуть адаптер с пробирками и заклеить их плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech TBI (R)». Элюат, внесённый в пробирки, содержит полученную в процессе экстракции РНК/ДНК.

ВНИМАНИЕ! Пробирки, заклеенные плёнкой, не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку.

- 9 Запрограммировать амплификатор для проведения ОТ-ПЦР/ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной ниже.

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	2 мин	–	1
3	95	10 с	–	42
	60	20 с	FAM, R6G ¹ , ROX, Cy5	

Примечания

1) При программировании амплификатора указать объём реакции: 25 мкл.

2) Детекция может назначаться по другим каналам, помимо указанных, при одновременном проведении в одном приборе нескольких тестов с использованием указанной программы.

- 10 Поместить пробирки с реакционными смесями и элюатом в амплификатор и запустить программу.

Экстракция НК и ручная подготовка к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР. Проведение ОТ-ПЦР/ПЦР и детекции

Материалом для проведения ПЦР-исследования служат образцы РНК/ДНК, экстрагированной из следующих видов исследуемого материала:

- цельная кровь, плазма крови, спинномозговая жидкость (ликвор) человека;
- клещи).

Для экстракции НК необходимо использовать набор реагентов «НК-К (R)» (ООО «Ампитек»).

- 1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ВК, ОК и ПК Т и осадить капли на вортексе.
- 2 Провести экстракцию НК (с применением автоматической или ручной методики) с использованием набора реагентов «НК-К (R)» (ООО «Ампитек») согласно инструкции по его применению.

Примечание – Элюцию провести в объёме 100 мкл.

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК Т не менее чем в одном повторе.

¹ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесями TBI (R)-1, TBI (R)-2, учитывая, что на каждый исследуемый и контрольный образец должно приходиться по одной пробирке каждого вида Смеси. Схема планшета представлена на рисунке 1.

4 Снять с отрезанных пробирок защитную плёнку.

Примечание – После снятия защитной плёнки использовать реагенты в течение 24 ч.

5 Для удобства внесения образцов НК рекомендуется установить отрезанные пробирки в штатив для ПЦР-планшетов.

6 Внести в подготовленные пробирки по 20 мкл образцов НК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК Т).

ВНИМАНИЕ! Каждый образец НК вносится в две пробирки с разными реакционными Смесями, т.е. для каждого образца по одной пробирке с каждым видом Смеси (TBI (R)-1, TBI (R)-2).

ВНИМАНИЕ! При внесении НК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

7 Перемешать содержимое пипетированием, не допуская пузырьков воздуха.

8 После внесения образцов НК заклеить пробирки плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech TBI (R)».

ВНИМАНИЕ! Пробирки после внесения НК не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку.

9 Запрограммировать амплификатор для проведения ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной ниже.

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	42
	60	20 с	FAM, R6G ² , ROX, Cy5	

Примечания

1) При программировании амплификатора указать объём реакции: 25 мкл.

2) Детекция может назначаться по другим каналам, помимо указанных, при одновременном проведении в одном приборе нескольких тестов с использованием указанной программы.

10 Поместить пробирки с реакционными смесями и элюатом в амплификатор и запустить программу.

Переменная информация для учёта и интерпретации результатов

Образец	Граничное значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора			
	FAM	R6G	ROX	Cy5
Смесь TBI (R)-1				
Исследуемые образцы	–	–	–	≤ x
ОК	–	–	–	≤ x
ПК Т	≤ x	–	–	≤ x
Смесь TBI (R)-2				
Исследуемые образцы	–	–	–	≤ x
ОК	–	–	–	≤ x
ПК Т	≤ x	≤ x	≤ x	≤ x

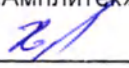
² Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

Лист регистрации изменений

[illegible]

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 5 листа(-ов)

Генеральный директор
ООО «Амплитек»


_____ Подпись Ходяков А.В.



КОПИЯ
ВЕРНА

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Амплитек»

А.В. Ходяков



15.02.2024

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РНК/ДНК
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАЮЩИХСЯ ЧЕЛОВЕКУ
ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ, TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS,
BORRELIA BURGDORFERI S.L., *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM*,
EHRLICHIA CHAFFEENSIS / *EHRLICHIA MURIS* МЕТОДОМ ОТ-ПЦР/ПЦР С
ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» (AMPLITECH TBI (R))
ПО ТУ 21.20.23-038-19926214-2024

Краткое руководство для формы выпуска 2

Лист утверждения

СОГЛАСОВАНО

Заместитель генерального директора по
науке ООО «Амплитек»

_____ А.С. Коновалов

15.02.2024

Научный сотрудник отдела разработки и
адаптации продукции ООО «Амплитек»

_____ А.А. Филичева

15.02.2024

Amplitech TBI (R)

Набор реагентов для качественного определения РНК/ДНК возбудителей инфекций, передающихся человеку иксодовыми клещами, Tick-borne encephalitis virus, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis* / *Ehrlichia muris* методом ОТ-ПЦР/ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech TBI (R)) по ТУ 21.20.23-038-19926214-2024

КРАТКОЕ РУКОВОДСТВО

IVD

REF

P027-2

LOT

xxxx

Σ 96

ВНИМАНИЕ! Перед использованием набора необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению.

Экстракция НК и ручная подготовка к проведению ОТ-ПЦР/ПЦР. Проведение ОТ-ПЦР/ПЦР и детекции

Материалом для проведения ПЦР-исследования служат образцы РНК/ДНК, экстрагированной из следующих видов исследуемого материала:

- цельная кровь, плазма крови, спинномозговая жидкость (ликвор) человека;
- клещи.

Для экстракции НК необходимо использовать набор реагентов «НК-К (R)» (ООО «Амплитек»).

- 1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ВК, ОК и ПК Т и осадить капли на вортексе.
- 2 Провести экстракцию НК (с применением автоматической или ручной методики) с использованием набора реагентов «НК-К (R)» (ООО «Амплитек») согласно инструкции по его применению.

Примечание – Элюцию провести в объеме 100 мкл.

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК Т не менее чем в одном повторе.

- 3 Перемешать содержимое пробирок со Смесями TBI (RW)-1, TBI (RW)-2 и осадить капли на вортексе.
- 4 Выставить в штатив для каждого исследуемого и контрольного образца по две ПЦР-пробирки в два ряда, так как каждый образец НК исследуется в двух пробирках с разными реакционными Смесями (TBI (RW)-1, TBI (RW)-2). Промаркировать пробирки.
- 5 Внести в первый ряд подготовленных ПЦР-пробирок по 10 мкл Смеси TBI (RW)-1, во второй ряд по 10 мкл Смеси TBI (RW)-2.
- 6 Внести в пробирки с реакционными Смесями по 15 мкл образцов НК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК Т).

ВНИМАНИЕ! Каждый образец НК вносится в две пробирки с разными реакционными Смесями (TBI (RW)-1, TBI (RW)-2).

ВНИМАНИЕ! При внесении НК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

- 7 Перемешать содержимое пипетированием, не допуская пузырьков воздуха.

- 8 После внесения образцов НК закрыть пробирки крышкой.

ВНИМАНИЕ! Пробирки после внесения НК не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на крышку.

Запрограммировать амплификатор для проведения ОТ-ПЦР/ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной ниже.

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	—	1
2	95	15 мин	—	1
3	95	10 с	—	42
	60	20 с	FAM, R6G ¹ , ROX, Cy5	

Примечания

- 1) При программировании амплификатора указать объем реакции: 25 мкл.
- 2) Детекция может назначаться по другим каналам, помимо указанных, при одновременном проведении в одном приборе нескольких тестов с использованием указанной программы.

10 Поместить пробирки с реакционными смесями и элюатом в амплификатор и запустить программу.

Переменная информация для учёта и интерпретации результатов

Образец	Граничное значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора			
	FAM	R6G	ROX	Cy5
Смесь TBI (RW)-1				
Исследуемые образцы	—	—	—	≤ x
ОК	—	—	—	≤ x
ПК Т	≤ x	—	—	≤ x
Смесь TBI (RW)-2				
Исследуемые образцы	—	—	—	≤ x
ОК	—	—	—	≤ x
ПК Т	≤ x	≤ x	≤ x	≤ x

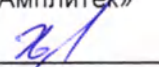
¹ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

Лист регистрации изменений

[illegible]

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 4 листа(-ов)

Генеральный директор
ООО «Амплитек»


Подпись _____ Ходяков А.В.



ПАСПОРТ № 820-24

Amplitech TBI (R)

Набор реагентов для качественного определения РНК/ДНК возбудителей инфекций, передающихся человеку
иксовыми клещами, Tick-borne encephalitis virus, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia
chaffeensis* / *Ehrlichia muris* методом ОТ-ПЦР/ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»
(Amplitech TBI (R)) по ТУ 21.20.23-038-19926214-2024

REF

P027-1

LOT

0820

2024-02-19

2025-02-19

Условия транспор-
тирования:

при температуре от 2 °С до 8 °С не более 10 суток всеми видами крытых транспортных средств в
термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах.

Условия хранения:

в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 °С до 8 °С и относительной влажности
воздуха от 25 до 75 % в защищённом от солнечного света месте. Планшет с реагентами TBI (R)
беречь от влаги.

Контроль качества набора проведён по ТУ 21.20.23-038-19926214-2024.

Состав набора и внешний вид компонентов

Лот ком- понента	Норма			Результат контроля
	наименование	количество	внешний вид	
00003	Планшет с реагентами TBI (R):	1 шт.	96-луночный делимый планшет, заклеенный защитной плёнкой	Соответствует
	Смесь TBI (R)-1	ряды пробирок А, С, Е, G	Гель от светло-голубого до синего цвета на дне пробирок	
	Смесь TBI (R)-2	ряды пробирок В, D, F, H	Гель от светло-розового до красного цвета на дне пробирок	
00061	Плёнки для планшета	2 шт.	Клейкие плёнки.	Соответствует
00017	ВК	0,96 мл x 1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
00038	ОК	0,8 мл x 1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
00002	ПК Т	0,8 мл x 1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
–	Инструкция по применению	1 шт.	В бумажном виде и электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/	Соответствует
–	Краткое руководство	1 шт.	В бумажном виде	Соответствует
–	Паспорт	1 шт.	В электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/	Соответствует

Упаковка набора

Показатель	Норма	Результат контроля
Вид первичной и вторичной упаковки	Соответствует требованиям ТУ.	Соответствует
Отсутствие видимых дефектов	Отсутствие дефектов	Соответствует

Маркировка набора

Показатель	Норма	Результат контроля
Наличие информации на внутренней упаковке компонентов набора и внешней упаковке набора в соответствии с требованиями ТУ	Информация соответствует требованиям ТУ.	Соответствует

Функциональные характеристики набора

Показатель	Норма	Результат контроля
Предел обнаружения		
Выявление РНК TBEV, <i>B. burgdorferi</i> s.l., <i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i> и ДНК <i>A. phagocytophilum</i> в концентрации 1000 копий/мл	РНК TBEV, <i>B. burgdorferi</i> s.l., <i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i> и ДНК <i>A. phagocytophilum</i> обнаружены.	Соответствует
Валидность результатов тестирования для исследуемых образцов	Последовательность ВК обнаружена.	Соответствует
Валидность результатов тестирования для контролей исследования (ОК, ПК)	Результаты соответствуют критериям оценки, указанным в инструкции по применению набора.	Соответствует

Заключение: Набор указанного лота соответствует требованиям ТУ 21.20.23-038-19926214-2024.

Дата выдачи паспорта: 20.02.2024

Руководитель ОКК, Романенкова Е.С.

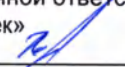
Исход М.В.
по кннпау 2024.02.06/001
от 06 февраля 2024 года



2 / 96a
лист (а/ов)



Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«Амплитек»

 А.В. Ходяков

ПАСПОРТ № 827-24

Amplitech TBI (R)

Набор реагентов для качественного определения РНК/ДНК возбудителей инфекций, передающихся человеку иксодовыми клещами, Tick-borne encephalitis virus, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis* / *Ehrlichia muris* методом ОТ-ПЦР/ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech TBI (R)) по ТУ 21.20.23-038-19926214-2024

REF P027-2

LOT 0827

 2024-02-20

 2025-02-20

Условия транспортирования: при температуре от 2 °С до 8 °С не более 10 суток всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах.

Условия хранения: в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 °С до 8 °С и относительной влажности воздуха от 25 до 75 % в защищенном от солнечного света месте.

Контроль качества набора проведен по ТУ 21.20.23-038-19926214-2024.

Состав набора и внешний вид компонентов

Лот компонента	Норма			Результат контроля
	наименование	количество	внешний вид	
00002	Смесь TBI (RW)-1	0,96 мл x 1 пробирка	Прозрачная жидкость от светло-фиолетового до фиолетового цвета	Соответствует
00002	Смесь TBI (RW)-2	0,96 мл x 1 пробирка	Прозрачная жидкость от светло-фиолетового до фиолетового цвета	Соответствует
00017	ВК	0,96 мл x 1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
00038	ОК	0,8 мл x 1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
00002	ПК Т	0,8 мл x 1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
—	Инструкция по применению	1 шт.	В бумажном виде и электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/	Соответствует
—	Краткое руководство	1 шт.	В бумажном виде	Соответствует
—	Паспорт	1 шт.	В электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/	Соответствует

Упаковка набора

Показатель	Норма	Результат контроля
Вид первичной и вторичной упаковки	Соответствует требованиям ТУ.	Соответствует
Отсутствие видимых дефектов	Отсутствие дефектов	Соответствует

Маркировка набора

Показатель	Норма	Результат контроля
Наличие информации на внутренней упаковке компонентов набора и внешней упаковке набора в соответствии с требованиями ТУ	Информация соответствует требованиям ТУ.	Соответствует

Функциональные характеристики набора

Показатель	Норма	Результат контроля
Предел обнаружения		
Выявление РНК TBEV, <i>B. burgdorferi</i> s.l., <i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i> и ДНК <i>A. phagocytophilum</i> в концентрации 1000 копий/мл	РНК TBEV, <i>B. burgdorferi</i> s.l., <i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i> и ДНК <i>A. phagocytophilum</i> обнаружены.	Соответствует
Валидность результатов тестирования для исследуемых образцов	Последовательность ВК обнаружена.	Соответствует

Показатель	Норма	Результат контроля
Валидность результатов тестирования для контролей исследования (ОК, ПК)	Результаты соответствуют критериям оценки, указанным в инструкции по применению набора.	Соответствует

Заключение: Набор указанного лота соответствует требованиям ТУ 21.20.23-038-19926214-2024.

Дата выдачи паспорта: 21.02.2024

Руководитель ОКК, Романенкова Е.С.

Лисова М.В.
по прил. № 02.06/001
от 06 февраля 2024 г.



Пронумеровано, скреплено и прошито

2 (два)
лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«Амплитек»

А.В. Ходяков





Омский НИИ природно-очаговых инфекций
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека

Н.В. Рудаков

АНАПЛАЗМЫ И АНАПЛАЗМОЗЫ

Руководство для врачей



ООО «Издательский центр «Омский научный вестник»»
Омск 2017

ББК 55.1
УДК 616.993
Р83

Рекомендуется к изданию учёным советом ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, протокол № 11 от 18.12.2016 г.

Рецензенты

В.М. Червинец, доктор медицинских наук, профессор
А.Н. Евстропов, доктор медицинских наук, профессор

Р83 Рудаков, Н.В.

Анаплазмы и анаплазмозы: руководство для врачей [Текст] / Н.В. Рудаков; Омский НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора. – Омск: ООО ИЦ «Омский научный вестник», 2017. – 100, [12] с. цв. ил.

ISBN 978-5-91306-082-2

В основу книги положены результаты многолетних собственных исследований в отношении анаплазмозов, а также анализа современной отечественной и зарубежной литературы по проблеме клещевых альфа-протеобактерий и вызываемых ими заболеваний. В общей части дана подробная характеристика анаплазм и методов работы с ними, в специальной части – подробное описание заболеваний человека и животных, вызываемых представителями семейства *Anaplasmataceae* порядка *Rickettsiales*. Приведены этиология, эпидемиология, патогенез, клиника, лабораторная диагностика, методы изучения возбудителей и профилактика анаплазмозов, гетерогенность биологических и генетических свойств циркулирующих штаммов анаплазм и эрлихий. Описаны инфекции, исторически связанные с риккетсиозами, возбудители которых относятся к семейству *Anaplasmataceae*.

Издание рассчитано на микробиологов, инфекционистов, эпидемиологов и других специалистов здравоохранения и Роспотребнадзора, слушателей системы постдипломного образования.

ББК 55.1
УДК 616.993

ISBN 978-5-91306-082-2

© Н.В. Рудаков, 2017
© ФБУЗ «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 2017

Оглавление

Список сокращений	5
Предисловие	6
Abstract	8
ВВЕДЕНИЕ	10
СТАНОВЛЕНИЕ И РАЗВИТИЕ УЧЕНИЯ ОБ АНАПЛАЗМАХ И АНАПЛАЗМОЗАХ	12
ОБЩАЯ АНАПЛАЗМОЛОГИЯ	14
Этиология и таксономия <i>Anaplasmataceae</i>	14
Морфологические и тинкториальные свойства	16
Культивирование	20
Антигенные свойства	22
Генетическая характеристика	22
Патогенез и патологическая анатомия	25
Клиническая картина	27
Лабораторная диагностика	32
Профилактика	33
ЧАСТНАЯ АНАПЛАЗМОЛОГИЯ	38
МОНОЦИТАРНЫЙ ЭРЛИХИОЗ ЧЕЛОВЕКА	38
История изучения	38
Эпидемиология	38
Экология возбудителя. Природная очаговость	41
Изучение моноцитарного эрлихиоза человека в России	43
Патогенез и патологическая анатомия	46
Клиническая картина	47
Диагноз и дифференциальная диагностика	49
Лечение и прогноз	49
ГРАНУЛОЦИТАРНЫЙ АНАПЛАЗМОЗ ЧЕЛОВЕКА	51
История изучения	51
Эпидемиология	52
Экология возбудителя. Природная очаговость	53
Изучение гранулоцитарного анаплазмоза человека в России	56
Патогенез и патологическая анатомия	58

Клиническая картина	59
Диагноз и дифференциальная диагностика	60
Лечение и прогноз	61
ДРУГИЕ АНАПЛАЗМОЗЫ	63
Анаплазмозы, животных, вызываемые внутриэритроцитарными анаплазмами	63
Анаплазмоз, вызываемый <i>Anaplasma bovis</i>	64
Анаплазмоз, вызываемый <i>Anaplasma platys</i>	65
ДРУГИЕ ЭРЛИХИОЗЫ	66
Эрлихиоз, вызываемый <i>Ehrlichia canis</i>	66
Эрлихиоз, вызываемый <i>Ehrlichia ewingii</i>	67
Эрлихиоз, вызываемый <i>Ehrlichia ruminantium</i>	68
Новые генетические варианты эрлихий	69
РОДА NEORICKETTSIA И WOLBACHIA	71
Лихорадка сеннетсу	71
Лихорадка Потомак	72
Другие инфекции, вызываемые неориккетсиями	73
Род <i>Wolbachia</i>	73
ПРЕДСТАВИТЕЛИ СЕМЕЙСТВА ANAPLASMATACEAE, НЕ ОТНОСЯЩИЕСЯ К ИЗВЕСТНЫМ РОДАМ	81
"Candidatus <i>Neoehrlichia mikurensis</i> "	81
"Candidatus <i>Neoehrlichia lotoris</i> "	84
Другие представители неозерлихий	84
Библиографический список	86

Список сокращений

- gltA* – ген, кодирующий цитратсинтазу
rOmp A – ген, кодирующий белок наружной мембраны 190 КД
rOmp B – ген, кодирующий белок наружной мембраны 120 КД
TIBOLA – англ. – *tick-borne lymphadenopathy* – лимфаденопатия
после присасывания клеща
ГАЧ – гранулоцитарный анаплазмоз человека
ИКБ – иксодовые клещевые боррелиозы
ИФА – иммуноферментный анализ
КПЛ – клещевая пятнистая лихорадка
КР – клещевой риккетсиоз
КЭ – клещевой энцефалит
МКА – моноклональные антитела
МФА – метод флюоресцирующих антител
МЭЧ – моноцитарный эрлихиоз человека
ПЛСГ – пятнистая лихорадка Скалистых гор
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РНГА – реакция непрямой гемагглютинации
РНИФ – реакция непрямой флюоресценции
РСК – реакция связывания комплемента
РТМЛ – реакция торможения миграции лейкоцитов
СКТ – сибирский клещевой тиф
СТ – сыпной тиф
ТОП – трансвариальная передача
ФО – федеральный округ

Предисловие

В последние десятилетия существенно изменились представления о таксономии представителей порядка *Rickettsiales*, распространении риккетсий, ориенций, анаплазм, бартонелл и других альфа-протеобактерий. Коксииеллы Бернета, ранее относимые к риккетсиям, в настоящее время реклассифицированы и относятся к гамма-протеобактериям. Ориенции выделены из рода *Rickettsia* в отдельный род *Orientia* семейства *Rickettsiaceae*. Выявлен ряд новых представителей порядка *Rickettsiales*, существенно изменились методы их изучения с акцентом на молекулярно-биологические методы.

Существенно углублены и расширены представления об анаплазмах, эрлихиях и вызываемых ими инфекциях в Евразии, в том числе и России. Гранулоцитарный анаплазмоз человека – наиболее распространённая в России анаплазмальная инфекция, передаваемая иксодовыми клещами. Очаги этой инфекции распространены преимущественно в лесных ландшафтах российской территории и сопредельных государств (Казахстан, Монголия, Китай) и связаны с клещами рода *Ixodes*.

С 2013 года введена официальная регистрация гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) и моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ) в Российской Федерации. За три года в стране учтено 542 случая ГАЧ и 94 случая МЭЧ, показатели заболеваемости на 100 тысяч населения 0,08–0,18 и 0,01–0,04 соответственно. ГАЧ и МЭЧ чаще выявляют у больных с микст-инфекциями (обычно в сочетании с клещевым энцефалитом или клещевыми боррелиозами). Это даёт основание констатировать необходимость систематического внимания и усилий в дальнейших разработках важнейших аспектов этих инфекций.

В последние годы в изучении проблемы анаплазмозов возник целый ряд новых аспектов. На основе развития популяционного направления в изучении экологии возбудителей получен ряд новых данных о закономерностях существования очагов клещевых

анаплазмозов, механизмах сохранения анаплазм и эрлихий в переносчиках, количественных и качественных характеристиках представителей порядка *Rickettsiales*, циркулирующих в России и Казахстане. Впервые выявлена выраженная гетерогенность биологических и генетических свойств анаплазм в природных очагах на территории Российской Федерации, выявлен ряд ранее не известных клещевых альфа1-протеобактерий, их возможная роль в региональной инфекционной патологии. В результате исследований разработаны новые методологические и методические подходы к изучению популяций анаплазм в природных очагах.

В связи с выявлением в одних и тех же переносчиках целого ряда возбудителей заболеваний человека – вирусов, боррелий, риккетсий, анаплазм, эрлихий, babesий осознана актуальность изучения сочетанности природных очагов, передаваемых клещами природно-очаговых инфекций, в том числе дифференциальной диагностики, лечения и профилактики микст-инфекций.

Одной из основных задач представленной работы являлась попытка дать современные представления об анаплазмах и анаплазмозах. В общей части дана подробная характеристика анаплазм и методов работы с ними, а в специальной части – подробное описание заболеваний человека и животных, вызываемых представителями семейства *Anaplasmataceae* порядка *Rickettsiales*.

Руководство иллюстрировано десятью рисунками в основном тексте и двадцатью шестью цветными рисунками во вклейке. В списке литературы представлены библиографические данные 177 работ отечественных и зарубежных авторов по указанной проблеме.

Книга предназначена для широкого круга специалистов, работающих по различным аспектам риккетсиозов и других природно-очаговых инфекций.

Искренне признателен за многолетнее сотрудничество А.С. Оберту, С.Н. Шпынову, А.П. Красикову, И.Е. Самойленко, Т.А. Решетниковой, Л.В. Кумпан и другим коллегам и ученикам, с которыми выполнены отдельные разделы исследований, вошедшие в руководство и отраженные в совместных публикациях, прежде всего в пособии для врачей Н.В. Рудакова, А.С. Оберта, С.Н. Шпынова «Анаплазмозы и эрлихиозы человека – новая проблема инфекционной патологии в России» (2005), разделах монографии А.П. Красикова, Н.В. Рудакова «Риккетсиозы, коксиеллез и анаплазмозы человека и животных» (2013).

Abstract

In recent decades, much has changed notions of taxonomy of Rickettsiales representatives, distributing Rickettsia, Orientia, Anaplasma, Bartonella and other alpha-proteobacteria. Coxiella burnetii attributable to rickettsiae previously reclassified and include in gamma-proteobacteria. Orientia separated from the genus Rickettsia in a distinct genus Orientia of family Rickettsiaceae.

A number of new members of the order Rickettsiales changed on their methods of study with a focus on molecular methods. Understanding of the Anaplasma and Ehrlichia deepened and expanded significantly, and they cause infections in Eurasia, including Russia. Human granulocytic anaplasmosis – most common anaplasma infection transmitted by ticks in Russia. Foci spread primarily in forest landscapes of Russia and neighboring countries (Kazakhstan, Mongolia, and China) and are associated with ticks of the genus Ixodes.

Official registration of human granulocytic anaplasmosis (HGA) and human monocytic ehrlichiosis (HME) in the Russian Federation introduced in 2013. 542 cases HGA and 94 cases of HME taken into account in the country for three years, incidence rates 0.08–0.18 and 0.01–0.04 per 100 thousands of population respectively. HGA and HME detected frequently in patients with mixed infection (usually in combination with TBE or Lyme borreliosis). This gives grounds to state the need for systematic attention and efforts in further development the most important aspects of these infections.

A number of new aspects in the study of anaplasmoses problem has arisen in recent years. New data about the regularities of the existence of foci of tick-borne anaplasmoses, preservation mechanisms of Anaplasma and Ehrlichia in vector, quantitative and qualitative characteristics of the representatives of the order Rickettsiales, circulating in Russia and Kazakhstan obtained based on population trends in the study of the ecology of pathogens.

New methodological and methodical approaches to the study of Anaplasma in natural foci developed because of these investigations.

Heterogeneity of biological and genetic properties of *Anaplasma* in natural foci in the Russian territories, a number of previously unknown tick-borne alpha 1 proteobacteriae, their possible role in the regional infectious pathology revealed for the first time.

The relevance of the study of the combination of natural foci of tick-borne natural focal infections, including differential diagnosis, treatment, and mixed infections prevention is realized in connection with the identification in the same vectors of a number of human pathogens – viruses, *Borrelia*, *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Babesia*.

Trying to modern notions of *Anaplasma* and anaplasmoses was one of the main objectives of the work presented. A detailed description of *Anaplasma* and methods of working with them given in the general part, and a detailed description of human and animal diseases caused by members of the family *Anaplasmataceae* of order *Rickettsiales* – in a special section of the manual.

The book is intended for a wide range of professionals working on various aspects of rickettsial diseases and other natural focal infections.

The author is sincerely grateful for the many years of cooperation to A.S. Obert, S.N. Shpynov, A.P. Krasikov, I.E. Samoylenko, T.A. Reshetnikova, L.V. Kumpan and other colleagues, which made some areas of research included in the management and reflected in joint publications, primarily in the manual for physicians of N.V. Rudakov, A.S. Obert, S.N. Shpynov "Anaplasmoses and ehrlichioses of humans – a new problem of infectious disease in Russia" (2005), sections of the monograph of A.P. Krasikov, N.V. Rudakov "Rickettsioses, anaplasmoses and coxielloses of humans and animals" (2013).

ВВЕДЕНИЕ

Анаплазмозы — распространённая группа заболеваний человека и животных, вызываемых представителями семейства *Anaplasmataceae* порядка *Rickettsiales*. Медицинские аспекты проблемы начали активно изучаться только в 90-е годы XX века, после открытия возбудителей моноцитарного эрлихиоза человека и гранулоцитарного анаплазмоза человека. За относительно небольшой период изучения накоплен большой опыт в области эпидемиологии, клиники, диагностики и лечения данной группы заболеваний.

В 1972 году вышло фундаментальное издание П.Ф. Здровцовского, Е.М. Голиневич «Учение о риккетсиях и риккетсиозах», в котором приводятся данные о представителях порядка *Rickettsiales*. Однако анаплазмы, в частности возбудители ГАЧ и МЭЧ, в тот период ещё не были описаны.

Отдельные аспекты проблемы отражены в пособии для врачей Н.В. Рудакова, А.С. Оберта, С.Н. Шпынова «Анаплазмозы и эрлихиозы человека — новая проблема инфекционной патологии в России» (2005), разделах монографии А.П. Красикова, Н.В. Рудакова «Риккетсиозы, коксиеллёз и анаплазмозы человека и животных» (2013). Однако в указанных работах отсутствует анализ полученных в последние годы новых материалов по изучению анаплазм и анаплазмозов в России и в мире.

Назрела необходимость подготовки практического руководства, посвящённого методам работы с анаплазмами с учётом накопленного за последние десятилетия данных, а также детального описания отдельных представителей семейства *Anaplasmataceae*. Представленные материалы являются результатом многолетних исследований, проводимых автором и другими сотрудниками Омского НИИ природно-очаговых инфекций, а также полученных в результате анализа современной отечественной и зарубежной литературы по данной

проблеме анаплазм, эрлихий и вызываемых ими заболеваний человека.

В первой части руководства (общая анаплазматология) уделено внимание всестороннему описанию свойств анаплазм и методов работы с ними, диагностике анаплазмозов. Во второй части (частная анаплазматология) дано подробное описание заболеваний человека и животных, вызываемых представителями семейства *Anaplasmataceae*. Представлены современные данные об этиологии, эпидемиологии, патогенезе, клинике, лабораторной диагностике, методах изучения возбудителей и профилактике анаплазмозов, гетерогенности биологических и генетических свойств циркулирующих штаммов анаплазм и эрлихий.

Издание может быть полезно широкому кругу специалистов: микробиологам, эпидемиологам, инфекционистам и другим специалистам здравоохранения и Роспотребнадзора, слушателям системы постдипломного образования, студентам старших курсов медицинских и ветеринарных вузов.

СТАНОВЛЕНИЕ И РАЗВИТИЕ УЧЕНИЯ ОБ АНАПЛАЗМАХ И АНАПЛАЗМОЗАХ

До относительно недавнего времени анаплазмы были известны как возбудители заболеваний животных на ряде континентов, а проблема анаплазмозов интересовала только ветеринарных работников. В 1910 году Theiler описал *Anaplasma marginale* – клещевой патоген крупного рогатого скота, поражающий бычьи эритроциты, возбудитель экономически важного, широко распространённого в мире зооноза – анаплазмоза крупного рогатого скота, проявляющегося в гемолитической болезни различной выраженности.



Arnold Theiler

Далее представителями ветеринарной медицины были описаны другие, переносимые клещами и размножающиеся в лейкоцитах инфекционные агенты крупного рогатого скота: *Cowdria ruminantium* – возбудитель сердечной водянки крупного рогатого скота (Cowdry E., 1925), *Ehrlichia canis* (Donatien A. and Lestoquard F., 1935), *E. phagocytophilum* (Gordon W. et al., 1940).

Совершенствование лабораторных подходов способствовало дальнейшему прогрессу в изучении представителей *Anaplasmataceae*. *E. sennetsu* – этиологический агент первого известного эрлихиоза человека – был описан первоначально как представитель рода *Rickettsia* (Misao T. et Kobayashi Y., 1955). Заболевание эндемично для южных островов Японии, связано с употреблением сырой рыбы и по клинике напоминает инфекционный мононуклеоз, известно с 80-х годов XIX века.

Открытию новых анаплазмозов и эрлихиозов человека предшествовало также описание в 1950 году *Neorickettsia helminthoeca*, 1964 – *N. elokominica*, 1969 – *E. equi*, 1971 – *E. ewingii*, 1978 – *E. platys*, 1984 – *E. risticii* (Rikihisa Y., 1991). Существенный толчок развитию исследований по эрлихиям обусловила крупная эпизоотия эрлихиоза собак, вызванная

Ehrlichia canis, приведшая к гибели нескольких сотен служебных животных в американских войсках во Вьетнаме в 1968–1970 годах (Ristic M., Holland C.I., 1993). При изучении этого вида эрлихий были выявлены его фенотипические связи с возбудителем лихорадки сеннетсу – *R. sennetsu*, что привело в 1984 году к пересмотру таксономического положения этой «риккетсии» и включению её в род *Ehrlichia* под видовым названием *E. sennetsu* (Ristic M. et Huxsoll D., 1984), в дальнейшем он включен в род *Neorickettsia* под названием *Neorickettsia sennetsu comb. nov.* (Dumler J.S., Walker D.H., 2001).

Интерес к изучению эрлихий существенно возрос, когда в 1987 году в США был описан первый случай моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ) (Maeda K. et al., 1987). Гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ) впервые выявлен в 1991–1992 годах, его этиология уточнена в 1994 году (Bakken J.S. et al., 1994; Chen S.-M. et al., 1994).

Проведённые в последующие годы молекулярно-биологические и клинико-эпидемиологические исследования позволили установить высокую медицинскую и социальную значимость этой группы инфекций в Америке и более низкую (особенно МЭЧ) – в Евразии. Классическим переносчиком для *E. chaffeensis* являются клещи *Amblyomma americanum*. До настоящего времени практически все случаи МЭЧ (несколько тысяч) отмечены на территории США (Thomas et al., 2009).

ОБЩАЯ АНАПЛАЗМОЛОГИЯ

Этиология и таксономия *Anaplasmataceae*

Анаплазмы являются облигатными внутриклеточными альфа-протеобактериями, размножающимися в специализированных вакуолях эукариотических клеток и имеющими общие морфологические, экологические, эпидемиологические и клинические характеристики (Рудаков Н.В. и др., 2005; Красиков А.П., Рудаков Н.В., 2013).

Семейство *Anaplasmataceae* порядка *Rickettsiales* включает четыре рода – *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Wolbachia*. Семейство объединяет более 20 видов, среди которых в патологии человека основное значение имеют *Anaplasma phagocytophilum* – возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза человека и *Ehrlichia chaffeensis* – возбудитель моноцитарного эрлихиоза человека.

В последнее время благодаря внедрению методов молекулярно-биологического анализа пересмотрена филогенетическая позиция представителей трибы *Ehrlichieae*. Подверглась пересмотру структура родов *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Cowdria*, *Neorickettsia*, *Wolbachia*. Молекулярный филогенетический анализ 16S rRNA гена и оперона *groES* показал наиболее тесные связи этих протеобактерий с родами *Rickettsia* и *Orientia* и возможность их распределения в четыре отличающихся кластера (рода).

В род *Anaplasma* (с минимальным сходством между видами 96,1 %) включены *Anaplasma phagocytophilum* (объединены в один вид с бывшими видами *Ehrlichia equi* и агентом гранулоцитарного анаплазмоза человека (HGA, англ.) в связи с несущественностью генетических различий), *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys*.

В род *Ehrlichia* (сходство не менее 97,7 %) включена *Ehrlichia (Cowdria) ruminantum*, в род *Neorickettsia* (сходство 94,9 %) – *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii* и *Neorickettsia (Ehrlichia) sennetsu*. В соответствии с новой классификацией все члены триб *Ehrlichieae* и *Wolbachieae* трансформируются в

состав семейства *Anaplasmataceae*, исключается деление семейства *Rickettsiaceae* на трибы.

Альфа-протеобактерии, вызывающие анаплазмозы человека, реклассифицированы в три рода – *Ehrlichia*, *Anaplasma* и *Neorickettsia* вместо одного рода *Ehrlichia* (Dumler J.S., Walker D.H., 2001; Dumler J.S. et al., 2001).

Первый выявленный патоген человека среди представителей *Anaplasmataceae*, *N. sennetsu*, был определён в род *Neorickettsia*. *Neorickettsia sennetsu* инфицирует преимущественно моноциты и мононуклеарные фагоцитирующие клетки в организме человека и вызывает лихорадку сеннетсу – редко распознаваемую инфекцию, распространённую ограниченно (южные острова Японии) на Дальнем Востоке. Эпидемиологические данные и тесные генетические связи этого вида с *N. risticii* и *N. helminthoeca* косвенно свидетельствуют о том, что употребление инвазированной моллюсками рыбы может обуславливать заболевания.

Второй вид анаплазм человека – *Ehrlichia chaffeensis* передаётся клещами, инфицирует преимущественно моноциты и мононуклеарные фагоциты у больных и является этиологическим агентом МЭЧ в Америке. Этот микроорганизм и недавно описанный как патоген человека (третий патогенный для человека вид) *E. ewingii* тесно связаны с патогеном собак *E. canis*, который также может инфицировать человека, однако без развития клинической картины заболевания.

В 1999 году ретроспективно у больных людей в США было установлено четыре случая инфекции, вызванной размножающимися в гранулоцитарных лейкоцитах *E. ewingii* (Buller et al., 1999). До настоящего времени известно лишь несколько десятков случаев эрлихиозов у людей, вызванных *E. ewingii*, и все они были выявлены на территории США (Thomas et al., 2009).

E. chaffeensis и *E. ewingii* оставлены в составе рода *Ehrlichia*. *E. ewingii* инфицирует преимущественно нейтрофилы и (как и *E. chaffeensis*) передаётся в Северной Америке клещами *Amblyomma americanum*.

Четвёртая анаплазма, имеющая медицинское значение, – *Anaplasma phagocytophilum*, инфицирует преимущественно

нейтрофилы и вызывает гранулоцитарный анаплазмоз человека, связанный с иксодовыми клещами группы *Ixodes persulcatus*. Этот вид включен в отдельный от других анаплазм человека род, поскольку генетически тесно связан с *Anaplasma marginale* – паразитом эритроцитов крупного рогатого скота. Вследствие этого этиологический агент ГАЧ реклассифицирован и помещён в род *Anaplasma* семейства *Anaplasmataceae* под названием *Anaplasma phagocytophilum*.

В 2010 году были получены первые свидетельства патогенности для людей «Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*», которая образует отдельный филогенетический кластер в семействе *Anaplasmataceae* (Kawahara et al., 2004). «Candidatus *N. mikurensis*» распространены в различных частях Евразии и переносятся клещами рода *Ixodes*, ДНК этого возбудителя была обнаружена в образцах крови четырёх лихорадящих больных из Европы (Fehr et al., 2010; von Loewenich et al., 2010; Welinder-Olsson et al., 2010).

Ниже приводим рабочую классификацию основных видов семейства *Anaplasmataceae* (табл. 1).

Таблица 1

Классификация основных родов и видов семейства *Anaplasmataceae*

Род	<i>Ehrlichia</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Neorickettsia</i>	<i>Wolbachia</i>
Виды	1. <i>E. muris</i> 2. <i>E. chaffeensis</i> 3. <i>E. ewingii</i> 4. <i>E. canis</i> 5. <i>E. ruminantium</i> 6. <i>Schotti variant</i> *	1. <i>A. marginale</i> 2. <i>A. platys</i> 3. <i>A. phagocytophilum</i> 4. <i>A. bovis</i> 5. <i>A. centrale</i> 6. <i>A. odocoilei</i>	1. <i>N. helminthoeca</i> 2. <i>N. (Ehrlichia) sennetsu</i> 3. <i>N. (Ehrlichia) risticii</i>	1. <i>W. pipientis</i>

*Описывают в настоящее время как «Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*».

Морфологические и тинкториальные свойства

Анаплазмы являются облигатными внутриклеточными паразитами, поражающими клетки крови и эндотелия сосудов теплокровных. Локализованы в виде компактных включений (морул) внутри цитоплазматических вакуолей в клетках крови (в нейтрофилах, моноцитах, макрофагах, эритроцитах), эндотелиальных клетках кровеносных сосудов и в кроветворных

органах: селезёнке, печени, костном мозге, лимфатических узлах (Parola P. et al., 2005).

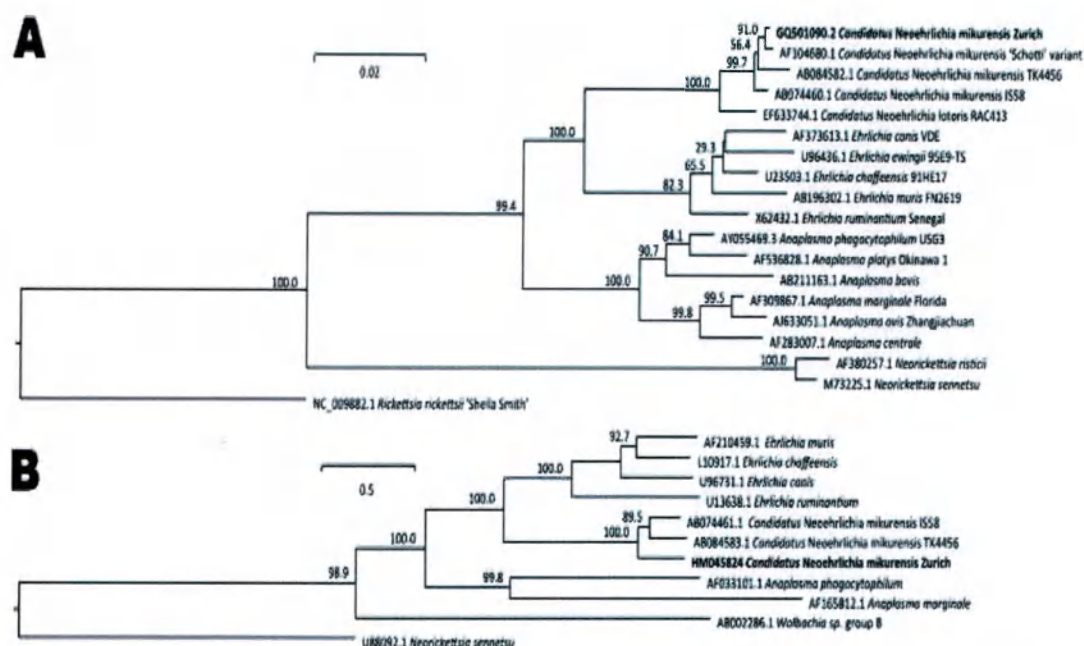


Рис. 1. Филогенетическое дерево на основе нуклеотидных последовательностей *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*:
 А – 16S rRNA гена, В – groEL гена (Fehr J.S. et al., 2010)

По спектру поражаемых клеток различают возбудителей МЭЧ (поражают преимущественно моноциты периферической крови) и ГАЧ (поражают преимущественно гранулоциты, в основном нейтрофилы).

Анаплазмы – грамотрицательные кокко-бациллярные бактерии небольшого размера (в длину от 0,5 до 1,5 микрон). Морфологически эрлихии представляют плеоморфные кокковидные или овоидной формы микроорганизмы, приобретающие тёмно-голубой или пурпурный цвет при окраске по Романовскому. Их выявляют в специализированных вакуолях – фагосомах в цитоплазме инфицированных клеток в виде компактных скоплений – морул, названных так за внешнее сходство с ягодами тутового дерева (рис. I–V в цв. вкл.). *Anaplasmataceae* – паразиты фагосом, в которых они проходят жизненный цикл. Вакуоли содержат чаще небольшое количество анаплазм. Количество содержащих эти микроорганизмы эндосом может достигать нескольких сотен на клетку.

Изучение ультраструктуры анаплазм показало их схожесть с риккетсиями и ориенциями (возбудителем лихорадки цуцугамуши). Наружная мембрана отстаёт от цитоплазматической мембраны и имеет волнообразный вид, внутренняя мембрана гладкая. Чётко выделяются две различные морфологические формы анаплазм (аналогично хламидиям) – большего размера *ретикулярные клетки* с равномерным распределением рибосом и филоментов ДНК (нуклеоида) и клетки меньшего размера с центральным расположением рибосом и филоментов нуклеоида и электронно-плотным центром (*dense – cored cells – клетки с плотной сердцевиной*).

Ретикулярные клетки характеризуют стадию вегетативного развития, уплотнённые анаплазмы – стационарную стадию покоя. Выход анаплазм из клетки осуществляется путём разрыва мембраны эндосомы, а затем – клеточной стенки, возможен экзоцитоз (выдавливание) анаплазм или инфицированных вакуолей из клетки хозяина (рис. 2–4).

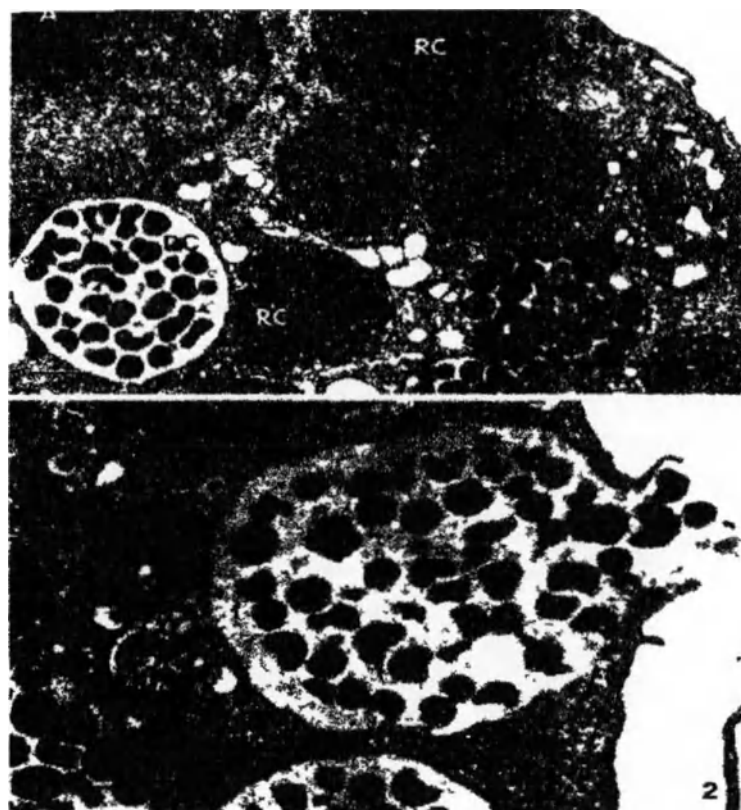


Рис. 2. *E. canis* в культуре клеток DH 82:
А – морулы содержат ретикулярные клетки (RC), плотные клетки (DC);
В – выход DC из морулы (Popov V.L. et al., 1995; Popov V.L., 1996)

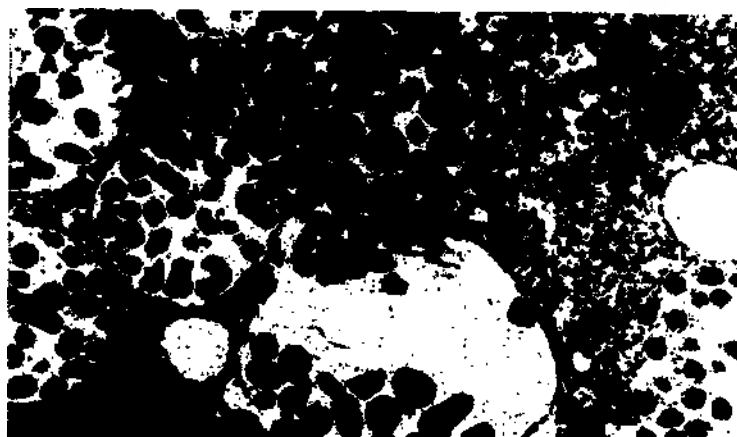


Рис. 3. *E. chaffeensis* в культуре клеток Vero, выявляются RC и DC в морулах (Popov V.L. et al., 1995; Popov V.L., 1996)

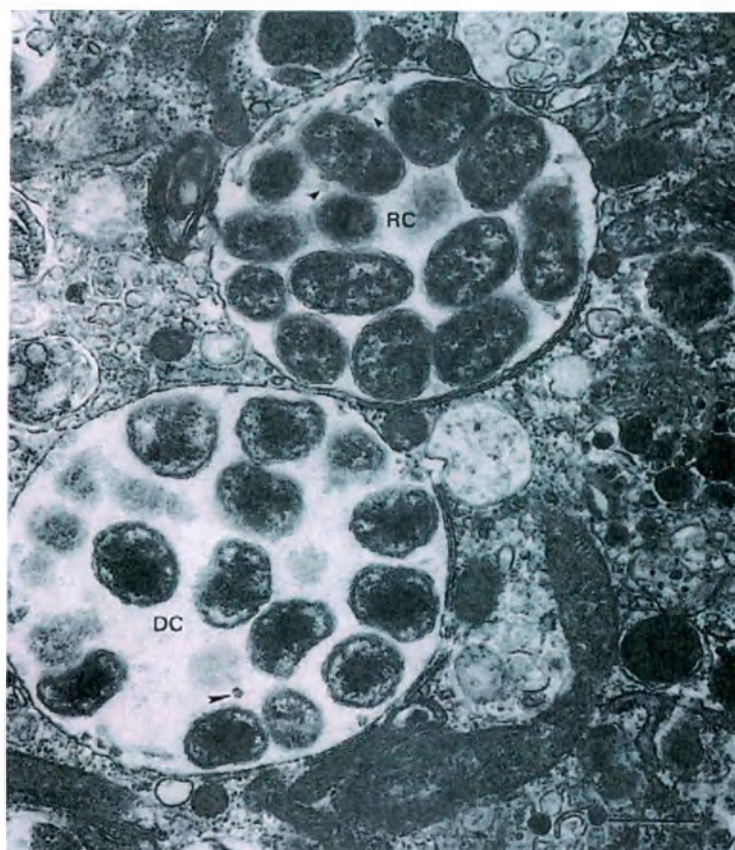


Рис. 4. Морулы *E. chaffeensis*, содержащие ретикулярные клетки (RC) или dense-cored cells (DC) в цитоплазме эмбриональных клеток мышей. Шкала – 0,5 микрон (Popov et al., 1995)

При люминесцентной микроскопии препаратов, контрастированных альбумином, меченым родамином, с использованием меченых ФИТЦ антител к отдельным видам *Anaplasmataceae* скопления анаплазм разной величины и формы

с характерной изумрудно-зелёной флюоресценцией выявляют внутриклеточно в фагосомах в виде гранул (морул) на фоне красноватых с различными оттенками клеток (рис. VII–X в цв. вкл.).

Культивирование

Лабораторное поддержание представителей семейства связано с культивированием на специальных линиях клеток – макрофагоподобные клетки гистиоцитомы собак (DH82) и лейкемии человека (линия HL60), в некоторых случаях – эпителиоидноподобные клетки (линии эндотелиальных клеток человека, клетки Vero, HeLa). Накопление анаплазм в них происходит медленно и незначительно, поэтому используют длительно культивируемые линии с выдерживанием клеточных культур до месяца и более с периодической сменой поддерживающей питательной среды. Для размножения *N. sennetsu* можно использовать белых мышей, у которых наблюдается генерализованная инфекция с накоплением возбудителя в селезёнке и макрофагах перитонеальной жидкости.

Нами осуществлено культивирование штамма “*Anaplasma speciosus Omsk*” возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота.

Монослой культуры клеток Vero во флаконе заражали 10 %-ной суспензией, которая была получена из селезёнки коровы с клиническими проявлениями анаплазмоза, в дозе 0,5 мл на флакон. Флаконы с заражёнными клетками центрифугировали при 8000 об/мин при температуре 22 °C в течение 30 минут. После центрифугирования во все флаконы добавляли среду поддержки (игла MEM с добавлением 1 %-ной эмбриональной сыворотки) в объёме 1,5 мл на флакон. Флаконы с заражёнными клетками культивировали в углекислотном термостате при температуре 35,6 °C в течение восьми суток. После завершения инкубации все флаконы подвергали замораживанию в низкотемпературном холодильнике при температуре –20 °C, затем размораживали для разрушения клеток и максимального выхода из них микроорганизмов. Наличие анаплазм

так же, как и стерильность культуры клеток, определяют в мазках, окрашенных по методу Романовского-Гимза.

Морфологические признаки выделенного штамма типичны для анаплазм. В окрашенных по Романовскому-Гимзе мазках из периферической крови от больного животного анаплазмы обнаруживаются в виде одного-двух, реже трёх в одном эритроците розовато-фиолетовых точкоподобных включений округлой или овальной формы. Расположение в эритроците – преимущественно периферическое, иногда эксцентричное (рис. VI в цв. вкл.). Грамотрицательны. Антигенные детерминанты выявляются методом непрямой флюоресценции с гомологичной кроличьей иммунной сывороткой к штамму.

Вирулентные свойства. Оказывает цитопатическое действие в культуре клеток Vero. Вызывает клинические проявления анаплазмоза у сельскохозяйственных (коровы) и экспериментальных лабораторных животных (кролики, белые мыши), заражённых штаммом.

Генотипические характеристики. Получена последовательность нуклеотидов гена 16S рПНК длиной 613 п.о. (номер в GenBank AY649325):

```
ttaacacatg caagtcgaac ggaccataca cgcagcttgc tgcgtgtatg gttagtggca
gacgggtgag taatgcatag gaatctacct agtagtatgg gatagccact agaatgggtg
ggttaatactg tataatccct gcgggggaaaa gatttatcgc tattagatga gcctatgtca gattagctag
ttggtgggggt aatggcctac caaggcgggtg atctgtagct ggtctgagag gatgatcagc
cacactggaa ctgagacacg gtccagactc ctacgggagg cagcagtggg gaatattgga
caatgggcgc aagcctgatc cagctatgcc gcgtgagtga ggaaggcctt aggggtgtaa
aactctttca gtagggaaga taatgacggt acctacagaa gaagtcccgg caaactccgt
gccagcagcc gcggtataac ggaggggggca agcgttgttc ggaattattg ggcgtaaagg
gcatgtaggc ggtttgtaa gttaaagggtg aaataccagg gcttaaccct ggggctgctt ttaatactgc
aggactagag tccggaagag gatagcgga ttcctagtgt agaggtgaaa ttc.
```

При идентификации в Genbank приведённая последовательность нуклеотидов является уникальной. На основании филогенетических данных штамм “*Anaplasma speciosus Omsk*” является наиболее близким к *Anaplasma marginale* и *Anaplasma centrale* (степень гомологии 99,7 %). Штамм «*Anaplasma speciosus Omsk*» нового генотипа рода *Anaplasma* депонирован в коллекцию Всероссийского музея риккетсиозных культур

Антигенные свойства

На первом этапе изучения было установлено отсутствие общих антигенных детерминант анаплазм с риккетсиями сыпнотифозной и клещевой групп, коксииеллами Бернета и боррелиями Бургдорфера, однако в дальнейшем показана перекрёстная реактивность белков теплового шока HSP 60 у риккетсий и анаплазм. У представителей семейства *Anaplasmataceae* имеются общие антигенные детерминанты, обуславливающие наибольшую перекрёстную реактивность внутри видов (геногрупп), что позволило диагностировать МЭЧ с использованием антигена *E. canis*. Использование техники вестерн-иммуноблота позволило выявить семь главных белков: 120, 66, 58, 44, 29, 28 и 22 КД. Наибольшим набором антигенов обладает *E. canis*. С использованием моноклональных антител и моноспецифических поликлональных антител показано, что главные, иммунодоминантные, белки 120, 29, 28 и 22 КД, а также минорный 30 КД белок являются поверхностными протеинами, а белки 28 и 22 КД антигенно взаимосвязаны. ДНК-клонирование показало, что белки 58 и 10 КД генетически гомологичны белкам теплового шока GroEL и GroES *Escherichia coli*. Белок 120 КД имеет регион идентичных восьмидесяти аминокислотных tandemных повторяющихся единиц, вероятно, определяющий адгезию эрлихий к клеткам хозяина.

Представители рода *Ehrlichia* и *Anaplasma marginale* имеют главный поверхностный антигенный комплекс от 24 до 31 КД, *Anaplasma phagocytophilum* – 44 КД, представители рода *Neorickettsia* – от 51 до 55 КД.

Генетическая характеристика

К настоящему времени полный геном определён для представителей различных родов порядка *Rickettsiales*. Они имеют относительно небольшой геном ($0,8\text{--}1,5 \times 10^6$ н.п.), структура

генома схожа со структурой риккетсий. Эрлихии и анаплазмы имеют одну кольцевую хромосому, размер генома *Ehrlichia* spp. и *Anaplasma* spp. составляет $1,2-1,5 \times 10^6$ н.п.

Геномный размер различных штаммов *Anaplasma marginale* отличается и составляет 1200–1280, *Neorickettsia* (*N. risticii*, *N. sennetsu*) – 860–880, *E. chaffeensis* – 1160 kbp. Уменьшение генома связано с тем, что часть функций бактерий выполняется клетками хозяина. Содержание Г+Ц составляет в ДНК *Anaplasma marginale* 56 мол. %.

Степень гомологии рода *Rickettsia* с представителями *Anaplasmataceae* по данным определения нуклеотидных последовательностей 16S рДНК составляет около 83–84 %. Максимальное сходство между родами семейства *Anaplasmataceae* составляет от 87,1 до 94,9 %. На рис. 5 и 6 показаны взаимоотношения α_1 -протеобактерий на основе сравнения нуклеотидных последовательностей 16S рРНК.

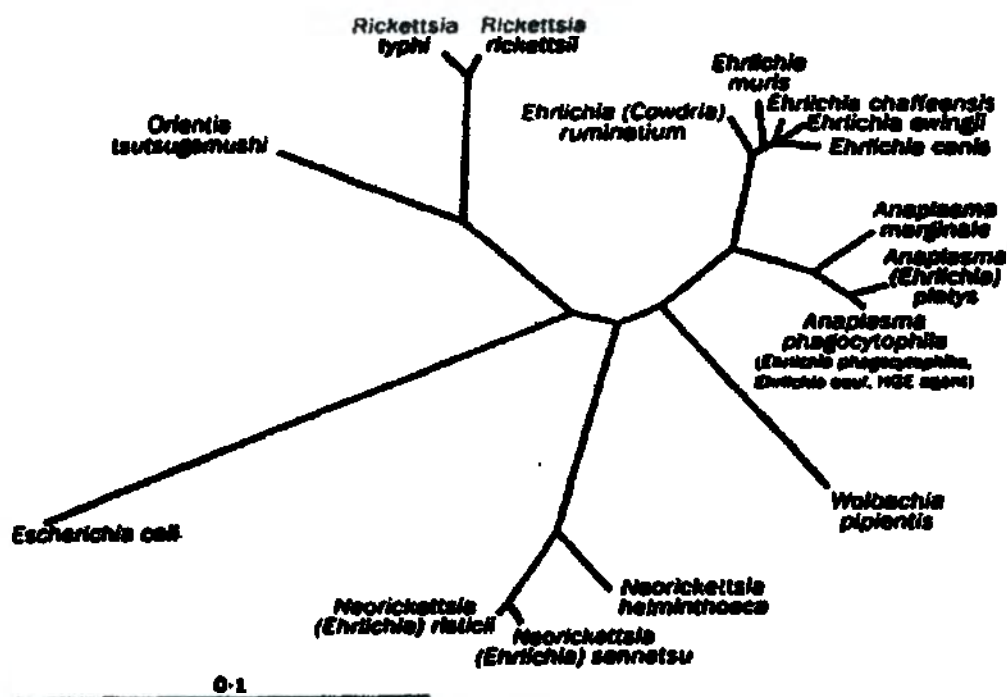


Рис. 5. Филогендрограма, демонстрирующая эволюционные взаимоотношения α_1 -протеобактерий на основе секвенирования 16S рРНК (Dumler J.S., Walker D.H., 2001)

В отличие от неориккетсий и риккетсий эрлихии и анаплазмы содержат многочисленные повторы в структуре геномов. Только три участка генома длиной более 10 тысяч н.п.

были консервативными для всех представителей семейства *Anaplasmataceae*. Эти участки включали гены рибосомальных белков и белков секреторной системы типа IV. Как и риккетсии, эрлихии и анаплазмы содержат один оперон рибосомальной РНК, в котором ген 16S рРНК находится отдельно от пары генов 23S-5S рРНК.

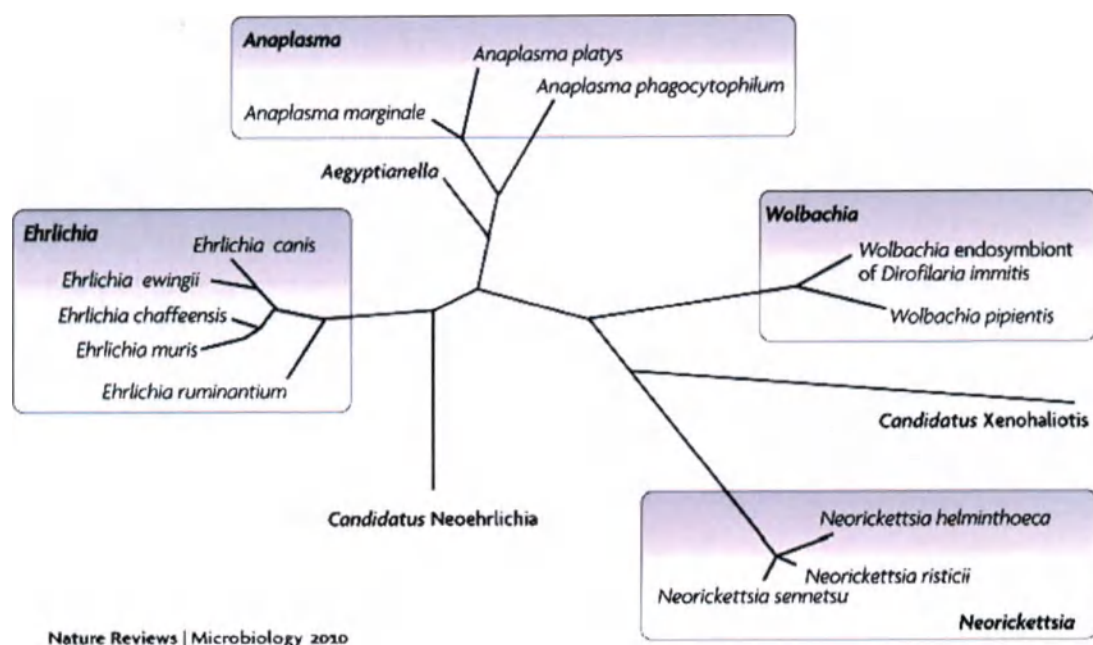


Рис. 6. Филогения семейства *Anaplasmataceae*
<http://riki-lb1.vet.ohio-state.edu/background.php>

Среди представителей порядка *Rickettsiales* только у представителей *Anaplasma* spp. и *Ehrlichia* spp. отсутствует кластер, кодирующий домен альдолаза-представляющих белков класса II. Отсутствие этого белкового домена может препятствовать трансвариальной передаче этих бактерий членистоногими.

A. phagocytophilum имеет гены, которые кодируют белки наружной мембраны P44 и HGE-14, HGE-2. Характерные для *E. chaffeensis* гены кодируют поверхностные белки из семейства OMP-1, белки ответственные за биосинтез аргинина и др.

Бактерии семейства *Anaplasmataceae* содержат различный набор генов, кодирующих поверхностные белки, относящиеся к OMP-1/MSP2/P44 семейству. Это семейство генов наиболее распространено у представителей родов *Ehrlichia* и

Anaplasma. Таксономическое положение основных родов семейства *Anaplasmataceae* показано на рис. 5.

Множественные антигенные варианты белка P44 возникают во время размножения *A. phagocytophilum* в результате комбинаторного переноса гена в экспрессирующий сайт (de la Fuente J. et al., 2010). При этом различные гомологи гена *p44* экспрессируются в млекопитающих и клещах, что способствует адаптации анаплазм при смене хозяев. Распространение белков семейства OMP-1/MSP2/P44 может способствовать персистенции *Anaplasmataceae* в позвоночных хозяевах вследствие антигенной изменчивости этих белков и содействует эффективной передаче анаплазм клещам.

Патогенез и патологическая анатомия

В соответствии с гипотезой патогенеза нейтрофилы приобретают инфекционный агент в месте присасывания клеща или после диссеминации в костный мозг или другие ткани. Инфицированные нейтрофилы активируются для секреции хемокинов, которые мобилизуют клетки иммунного воспаления, такие как лимфоциты и макрофаги. Эти клетки в дальнейшем продуцируют такие провоспалительные цитокины, как гамма-интерфероны, и усиливают воспалительный компонент реакции. Гамма-интерферон необходим для элиминации возбудителя и тесно ассоциирован с гистопатологическими проявлениями. Часто выявляют небольшие агрегаты лимфоцитов и макрофагов, включающие апоптотические и фагоцитотические клетки и другие проявления активации мононуклеарных фагоцитов.

У представителей семейства выявлены поверхностные белки, выполняющие функции адгезинов. Они взаимодействуют с лектин-содержащими CD15-ассоциированными (для возбудителя ГАЧ) рецепторами клеток хозяина. Доказано наличие факторов, препятствующих фагосомо-лизосомальному слиянию и обеспечивающих возможность внутрифагосомного цикла развития. *Anaplasma phagocytophilum* обладает механизмом задержки спонтанного апоптоза нейтрофилов, что способствует их размножению в них.

В начальной стадии патогенез ГАЧ и МЭЧ обусловлен процессом внедрения возбудителя через кожу и реализуется с участием клеща-переносчика. Первичный аффект на месте внедрения при этих инфекциях и пятнистой лихорадке Скалистых гор (ПЛСГ), в отличие от других риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ), отсутствует. Возбудитель распространяется лимфогенно и далее гематогенно по всему организму. Заражение чувствительных клеток-мишеней происходит в три стадии: проникновение в клетку (инициация фагоцитоза), размножение в ограниченных мембраной цитоплазматических вакуолях (фагосомах), выход из клетки. Инфекционный процесс изучен преимущественно при моноцитарном эрлихиозе человека и сопровождается поражением макрофагов селезёнки, печени, лимфатических узлов, костного мозга и других органов (рис. V в цв. вкл.). Нередко возникают очаговые некрозы и полиорганные периваскулярные лимфоцито-гистиоцитарные инфильтраты преимущественно микроциркуляторного русла. В селезёнке, печени, лимфатических узлах, костном мозге развивается мегакариоцитоз и гемофагоцитоз с формированием миелоидной гипоплазии.

При тяжёлых формах поражений и нарушениях проницаемости сосудов развивается геморрагический синдром с кровоизлияниями внутренних органов, желудочно-кишечными кровотечениями, геморрагическими высыпаниями на кожных покровах. Морфологические изменения в сосудистой системе, костном мозге и внутренних органах сопровождаются лейкопенией и тромбоцитопенией, повышением уровня печёночных трансаминаз.

Патогенез и патологическая анатомия гранулоцитарного анаплазмоза человека менее изучены. Нейтрофилы приобретают инфекционный агент в месте присасывания клеща или после диссеминации в костный мозг или другие ткани. Инфицированные нейтрофилы активируются для секреции хемокинов, которые мобилизуют клетки иммунного воспаления, такие как лимфоциты и макрофаги. Эти клетки в дальнейшем продуцируют такие провоспалительные цитокины, как гамма-интерфероны, и усиливают воспалительный компонент реакции.

Гамма-интерфероны необходимы для элиминации возбудителя и тесно ассоциированы с гистопатологическими проявлениями. Часто выявляют небольшие агрегаты лимфоцитов и макрофагов, включающие апоптотические и гемофагоцитарные клетки и другие проявления активации моноклеарных фагоцитов. Лабораторные нарушения характеризуются тромбоцитопенией, лейкопенией, повышением уровней в крови печёночных аминотрансфераз.

Клиническая картина

Клиническая картина моноцитарного эрлихиоза человека

Большинство случаев МЭЧ выявляют у больных с тяжёлыми формами клинических проявлений и формами средней тяжести. У части больных наблюдают угрожающие жизни формы заболевания, близкие по клиническому проявлению синдрому токсического шока. Летальные исходы составляют от 2 до 7 %. МЭЧ чаще (в сравнении с ГАЧ) проявляется менингоэнцефалитом, синдромом лёгочной недостаточности, острой почечной недостаточностью, сыпью.

Анализ случаев МЭЧ в США, которые были выявлены в 1985–1990 годах, позволяет определить основные клинко-лабораторные особенности этой инфекции. Средняя длительность заболевания составила 23 дня. Жалобы и симптомы этой системной инфекции не носят специфического характера и не позволяют диагностировать эту инфекцию чисто клинически. Частота случаев у больных (%):

лихорадка	97	фарингит и кашель	26
головные боли	81	боли в животе	22
мышечные боли	68		
анорексия	66	сыпь (макуло-папулёзная	
тошнота	48	или петехиальная):	
рвота	37	в начале заболевания	6
лимфаденопатия		в течение первой недели . .	25
и диарея	25	в целом	36

Наиболее тяжёлые осложнения включали дыхательную и почечную недостаточность, гипотензию, коагулопатию,

геморрагические проявления, неврологические нарушения. Среди обследованных рентгенографически больных МЭЧ почти у половины выявлены инфильтраты в лёгких.

Использование клинико-лабораторных тестов позволило выявить лейкопению (60 %), тромбоцитопению (68 %), анемию, повышение печёночных трансаминаз (86 %). Количество белых кровяных телец в типичных случаях уменьшалось с третьего дня заболевания с наибольшим снижением количества лимфоцитов и в меньшей степени – нейтрофилов. Тяжёлые печёночные нарушения выявлены лишь в отдельных случаях.

Нарушения центральной нервной системы документированы в виде светобоязни, ступора, галлюцинаций, судорог, коматозного состояния. Отмечали плеоцитоз чаще с преобладанием лимфоцитов (хотя в 23 % отмечено преобладание полиморфноядерных лейкоцитов) и возрастание белка в спинномозговой жидкости. Присутствие *Ehrlichia chaffeensis* в ликворе доказано с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуноцитологическими методами.

Отмечена периваскулярная инфильтрация лимфоцитами, плазматическими клетками, макрофагами, часть из клеток содержала эрлии. Указанная картина отмечена как в головном мозге, так и в мягких мозговых оболочках.

Наиболее частыми клиническими находками у больных с цереброспинальными циркуляторными нарушениями являлись ухудшение умственной деятельности, неустойчивая походка, атаксия, гиперрефлексия, клонус, черепно-мозговой паралич, спутанное сознание, менингизм. Выявлены и миокардиальные нарушения у больных МЭЧ. Заболевание по ряду проявлений напоминало лихорадку Скалистых гор (при обеих инфекциях отсутствует первичный аффект на месте присасывания клеща) за исключением сыпи, которая при МЭЧ встречается реже, носит транзиторный характер, появляется позже и редко носит петехиальный характер.

По результатам наблюдений за больными в Пермской области (Григорян Е.В. и др., 2000) клиническая картина МЭЧ характеризовалась полиморфизмом. Опорными признаками для ранней диагностики эрлихиозов являются развитие общеинфекционного синдрома в сочетании с острым безжелтуш-

ным гепатитом, поражением центральной нервной системы (легко текущий энцефалит, серозный менингит) и изменениями в периферической крови в виде тромбоцитопении, лейкопении, относительной лимфопении, сдвига лейкоцитарной формулы влево, увеличения СОЭ.

Клиническая картина МЭЧ в Приуралье схожа с описываемой картиной инфекции, вызываемой в США *E. chaffensis*, однако отличается более лёгким течением с развитием умеренно выраженных резидуальных явлений. В структуре заболевших преобладают лица в возрасте старше 40 лет, пик заболеваний приходился на конец июня – начало июля. Продолжительность инкубационного периода составила в среднем 13,3 дня (1–29). Лихорадка выявлена у 100 % больных, в том числе острое начало с внезапным подъёмом температуры до высоких цифр – у 82,6 % пациентов. Температурная реакция имела фебрильный характер и достигала 38–40 °С у 62 больных (89,8 %), с умеренно выраженным ознобом – у 48 (69,5 %). Как частые проявления общеинфекционного синдрома регистрировали слабость, недомогание (85,5 %) и головную боль (92,7 %). У 28 (40,6 %) пациентов интенсивные головные боли сопровождались тошнотой и рвотой. У 27 (39,1 %) больных в разгар заболевания выявляли менингеальные симптомы (ригидность затылочных мышц, симптом Кернига), у 21 (30,4 %) изменения в спинномозговой жидкости отсутствовали. Поражение кожных покровов наблюдалось в виде обильной пятнисто-папулёзной сыпи с локализацией на коже туловища, голеней и бёдер только у 2,9 % обследованных. Сыпь появлялась на третий день заболевания и исчезала к концу первой недели без шелушения и пигментации. Увеличение ближайших к месту присасывания клеща лимфоузлов до 0,7–1,5 см в диаметре выявлено в 18,8 %. У большинства больных (84,1 %) выявлены гиперемия лица, инъекция сосудов склер и конъюнктив, гиперемия слизистых оболочек ротоглотки. Катаральные явления со стороны верхних дыхательных путей (першение в горле, заложенность носа, сухой малопродуктивный кашель) отмечена в 42,0 %. Нарушения со стороны опорно-двигательного аппарата (53,6 %) проявлялись миалгиями (чаще в икроножных мышцах – 20,2 %), артралгиями в

крупных суставах (34,8 %) и выраженными болями в мышцах спины (10,1 %).

Вовлечение сердечно-сосудистой системы в патологический процесс выявлено примерно у половины больных. Пациенты жаловались на боли в сердце, сердцебиение, кратковременное повышение артериального давления. У 34,8 % отмечена относительная брадикардия, приглушение сердечных тонов – в 26,1 %. Электрокардиографические изменения зарегистрированы в 27,5 % и включали нарушения проводимости миокарда и процессов реполяризации в переднеперегородочной области, диффузные изменения в миокарде левого желудочка – от незначительных до выраженных. Эти изменения обычно были непродолжительными и исчезали к моменту выписки из стационара.

Изменения печени выявлены у 63,8 % больных. Обычно наблюдали её небольшое увеличение и умеренное повышение активности АЛТ. Поражение нервной системы у 39,1 % проявлялось развитием общемозговой симптоматики.

В разгар заболевания выявляли лейкопению (69,6 %), палочкоядерный сдвиг (62,3 %), увеличение СОЭ (63,8 %), относительную и абсолютную лимфоцитопению (56,5%), тромбоцитопению (52,2 %), абсолютную моноцитопению (24,6 %). Для лечения оказался эффективным доксициклин в дозе 100 мг 2 раза в день в течение 10–21 дня. У реконвалесцентов в 75,7 % случаев выявляли остаточные явления в виде астенического синдрома, реже – увеличения печени, изменений в гемограмме, повышения артериального давления, проходящие в течение нескольких месяцев.

Клиническая картина гранулоцитарного анаплазмоза человека

Картина ГАЧ менее специфична, чем МЭЧ. Обычные проявления ГАЧ – лихорадка неясной этиологии, у больных также отмечают головные и мышечные боли, недомогание – комплекс, который напоминает синдром острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ). Другие проявления наблюдаются менее чем у половины больных – тошнота, рвота, боли в брюшной области, анорексия, диарея, боли в суставах, кашель.

Сыпь выявляют не более чем у 10 % больных ГАЧ. Лабораторными методами чаще выявляют тромбоцитопению (92 %), повышение уровня аспартатаминотрансферазы (91 %) и сывороточного креатинина (70 %), достаточно часто – анемию, лейко- и лимфопению.

Тяжесть и формы клинического проявления в различных частях нозоареала существенно отличаются. В Словении клиническая картина ГАЧ значительно мягче, чем в США (Висконсин и Миннесота) и в Швеции, где нередко наблюдают такие тяжёлые проявления, как септический синдром, синдром токсического шока, синдром острого нарушения дыхания, миокардит, неврологические нарушения, такие как димиелинизирующие полиневриты. Менингиты и менингоэнцефалиты встречаются значительно реже, чем при МЭЧ.

У многих больных ГАЧ лихорадка и другие клинические проявления быстро проходят при лечении тетрациклинами, в нелеченных случаях длительность заболевания может составлять до двух месяцев. Для ГАЧ не характерны рецидивы и персистентная инфекция.

Более тяжёлое клиническое течение связано с пожилым возрастом, диабетом, коллагенозами, иммуносупрессивной терапией, несвоевременной диагностикой или отсутствием лечения. Летальные исходы составляют от 0,5 до 1,0 %, и большинство смертельных исходов является результатом оппортунистических инфекций и инвазий, включающих диссеминированный кандидоз, лёгочной аспергиллёз, некротизирующий герпетический фарингит, криптококкоз.

Поскольку ГАЧ – потенциально серьёзная или даже летальная инфекция, ранняя диагностика и лечение имеют жизненные показания. Эмпирическая антибиотикотерапия до лабораторного подтверждения возможна, если нет возможностей экспресс-диагностики. Больные из эндемичных по ГАЧ территорий с проявлениями неясной лихорадки, недомогания, наползания или присасывания клещей, с тромбоцитопенией и (или) лейкопенией, повышенным уровнем сывороточных аламин- и аспартаттрансаминаз должны быть заподозрены на эту инфекцию.

Лабораторная диагностика

Могут быть исследованы тонкие мазки периферической крови на наличие скоплений небольших бактерий (морулы) внутри нейтрофилов. Выявление морул позволило осуществить раннюю индикацию ГАЧ максимально у 62 % больных из Северной Америки на первой неделе заболевания. У больных из Европы частота позитивных результатов при обследовании аналогичных больных оказалась ниже.

ПЦР позволяет выявлять *A. phagocytophilum* в крови в острую фазу до применения антибиотиков максимально у 67 % больных. Можно также использовать выделение на культуре клеток HL-60, однако такими возможностями обладают немногие лаборатории, а получение результатов в этом случае может затягиваться на несколько недель.

Серологическая диагностика в настоящее время – наиболее распространённый подход для подтверждения диагноза ГАЧ и МЭЧ. Методы включают реакцию непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) (рис. XI в цв. вкл.), иммуноферментный анализ (ИФА), иммуноблоттинг, основанный на рекомбинантных белках (ИФА/иммуноблоттинг). В целом, эти методы высоко чувствительны и достаточно специфичны. Сероконверсия – лучший метод подтверждения на первой (25 % больных) и второй (75 %) неделях заболевания.

Однако определённые проблемы могут быть при диагностике больных с другими анаплазмами (прежде всего дифференциация ГАЧ/МЭЧ), у больных с аутоиммунными заболеваниями, больных с активной инфекцией вирусом Эпштейн-Барр. У представителей семейства *Anaplasmataceae* имеются общие антигенные детерминанты, обуславливающие наибольшую перекрёстную реактивность внутри видов (геногрупп), что позволило в своё время диагностировать МЭЧ с использованием антигена *E. canis*.

По данным Ravun с соавторами (1998) две из четырёх сывороток больных пятнистой лихорадкой Скалистых гор (ПЛСГ) перекрёстно реагировали в РНИФ с антигеном, полученным из инфицированной штаммом ГАЧ культуры клеток HL-60. С учётом значительного клинического сходства ПЛСГ

и ГАЧ перекрёстная реактивность в РНИФ может создавать определённые проблемы в верификации диагнозов этих инфекций, часто имеющих сопряжённые очаги.

В соответствии с международными рекомендациями диагноз считается *вероятным* либо в случае обнаружения морул в мазках крови, либо при выявлении ДНК методом ПЦР, либо при выявлении антител к возбудителям ГАЧ и МЭЧ. Диагноз считается *подтверждённым*, если у больных с клиническими симптомами заболевания и присасыванием клещей в анамнезе, во-первых, наблюдается сероконверсия (с титром антител не менее 1:128) или менее чем 4-кратный рост титров антител в парных сыворотках, или, во-вторых, в случае изоляции возбудителя культуральным методом, или, в-третьих, при идентификации специфичного фрагмента ДНК возбудителя в результате определения нуклеотидных последовательностей (Brouqui P. et al. 2004).

Для лабораторной диагностики ГАЧ и МЭЧ в России используют тест-системы ИФА. Исследуют парные сыворотки, взятые в динамике инфекционного процесса. Для выявления ДНК возбудителя в иксодовых клещах и пробах крови от больных используют двухраундную ПЦР или ПЦР с последующим секвенированием амплифицированных фрагментов ДНК.

Профилактика

Профилактика ГАЧ и МЭЧ включает традиционные противоклещевые мероприятия в очагах, специфической профилактики не разработано. При выявлении инфицированности анаплазмами снятых с людей переносчиков может осуществляться превентивная терапия анаплазмозов.

Основные направления неспецифической профилактики клещевых инфекций включают противоочаговые мероприятия, особенно акарицидные обработки, меры индивидуальной противоклещевой защиты и проведение разъяснительной работы с целью гигиенического воспитания населения.

Основной мерой по подавлению активности природных очагов инфекций, передаваемых клещами, является снижение

численности и уничтожение переносчиков в природных станциях и на сельскохозяйственных животных – прокормителях имаго клещей. Одним из способов достижения этого служит проведение санитарно-эпидемиологического преобразования окружающей среды. Такой подход включает в себя благоустройство территорий, в том числе санитарные рубки, удаление сухостоя, валежника и прошлогодней травы, прореживание кустарника, ликвидацию свалок бытового, строительного и лесного мусора.

Наиболее радикальным мероприятием является противоклещевая обработка территории акарицидами, которая проводится по эпидемиологическим показаниям в зонах высокого риска заражения населения. Мероприятия по борьбе с клещами проводят организации (юридические лица и индивидуальные предприниматели), занимающиеся дезинфекционной деятельностью, соответствующей требованиям, предъявляемым к таким организациям.

Мероприятия по борьбе с клещами проводят в соответствии с общими требованиями к проведению дезинсекционных мероприятий в природных очагах заболеваний. Акарицидные средства относятся к дезинфекционным средствам. Применение этих средств осуществляется в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил СП 3.1.3310–15 «Профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами», а также утверждёнными инструкциями по применению (включая нормы расхода, времени остаточного действия, меры безопасности) используемых средств и распыливающей аппаратуры (автоматические, мелкокапельные ранцевые и крупнокапельные многолитражные опрыскиватели, генераторы аэрозолей, опрыскиватели на механической тяге или автомобильных шасси, ультрамалообъёмные опрыскиватели).

Для уничтожения иксодовых клещей в природных очагах применяют акарициды, разрешённые к применению с этой целью в установленном порядке (прошедшие процедуру государственной регистрации и включённые в Реестр продукции, прошедшей государственную регистрацию): «Акаритокс», «Акарифен», «Альфатрин», «Байтекс 40 % с.п.», «Бриз 25 % э.к.», «Медилис-ципер», «Самаровка-

инсектицид», «Сипаз супер», «Таран 10 % в.к.э.», «Циперметрин», «Цифокс» и др.

Акарицидные средства на основе пиретроидов и фосфорорганических веществ, которые в настоящее время рекомендованы для проведения акарицидных обработок очаговых территорий, сохраняются на значимом для борьбы с клещами уровне около одного месяца, т. е. обладают коротким остаточным действием. Применение этих средств позволяет истребить активную часть популяции переносчика, но требует ежегодной обработки территории, а ряде случаев – нескольких обработок в течение одного сезона (при наличии клещей на обработанной территории).

При определении сроков проведения акарицидных работ и их кратности следует учитывать сезонную активность иксодовых клещей тех видов, которые доминируют на данной территории, длительность остаточного действия акарицидов, эпизоотические и эпидемические показания. Обработку природных биотопов акарицидами короткого остаточного действия проводят за 3–5 дней до наступления эпидемического сезона или заезда людей на опасную территорию.

После проведения акарицидных обработок регулярно в течение всего периода активности клещей проводят контроль эффективности работ (в том числе на расстоянии не менее 50 м за территорией оздоровительных организаций и баз отдыха). Обследования начинают на третьи сутки после обработки и проводят ежедекадно. Эффективность должна быть не ниже 95 %.

С целью снижения численности клещей проводят их уничтожение и на сельскохозяйственных животных препаратами, регламентированными к применению ветеринарной службой. Обработка скота проводится ветеринарной службой в соответствии с инструкциями к препаратам.

Дератизационные мероприятия направлены на уменьшение численности прокормителей клещей (диких грызунов) и предотвращение заноса переносчика на обработанные участки. Дератизация в природных биотопах проводится по эпидемиологическим показаниям в крайне редких случаях на локальных предварительно расчищенных участках в местах высокой

численности зверьков. Для их уничтожения применяют как механические (капканы, давилки, ловчие канавки, цилиндры и т. д.), так и химические способы. Рекомендованы приманки, включающие в качестве действующих веществ альфанафтилтиомочевину, дифенацин, этилфенацин, трифенацин.

Индивидуальная (личная) защита населения от нападения клещей обеспечивается посредством обработки акарицидами верхней одежды. Различают две группы этих препаратов. К инсектоакарицидным (акарицидным) средствам относятся: «Претикс» – брусок; в беспропеллентной упаковке – «Антиклещ-веста», «Гардекс Экстрим», «Спрей от клещей», «Таран-антиклещ», «Торнадо-антиклещ» и др.; в аэрозольной упаковке – аэрозоль от клещей «ДЭТА», «Бриз-Антиклещ», «ГардексЭкстрим» – аэрозоль от клещей без спирта, «Пикник Супер-антиклещ», «Рефтамид Таёжный» и др.

Акарицидно (инсектоакарицидно)-репеллентные средства представлены следующими препаратами: в беспропеллентной упаковке – «Капкан-антиклещ», «Клещ-капут спрей», «Меди-фокс-антиклещ», «Фумитокс-антиклещ», «Торнадо спрей от клещей и комаров» и др.; в аэрозольной упаковке – «Аэрозоль от клещей и комаров», «Клещ-капут аэрозоль», «Москитол. Специальная защита от клещей» и др.

При применении средств, относящихся к ускоренным группам, клещи (через 3–5 мин) после контакта становятся неспособными к присасыванию и опадают от одежды. Наряду с перечисленными акарицидными средствами возможно использование репеллентных средств, которые не убивают, но отпугивают клещей: в беспропеллентной аэрозольной упаковке – «Абсолют 50», «Антиклещ спрей репеллент», «Бибан», «Москитол. Спрей. Профессиональная защита», «Тайгон», «ДЭТА – аэрозоль от мошек и клещей» и др.

Применение специальных химических средств для обработки одежды существенно снижает риск заражения людей возбудителями инфекционных болезней, передаваемых иксодовыми клещами. Репеллентные средства обеспечивают менее надёжную защиту людей от нападения клещей, чем акарицидные. После работы одежду снимают, осматривают на наличие клещей и хранят в нежилом помещении.

Для своевременного обнаружения напавших клещей следует обязательно проводить само- и взаимоосмотры. Их проводят по возможности часто (через каждые 15–30 минут) при нахождении на заклещевлённой местности. При этом обращают внимание на открытые части тела (особенно заднюю поверхность шеи), а также на лицевую сторону одежды. Полные осмотры с обязательным раздеванием рекомендуется проводить не менее двух раз за рабочее время (во время обеденного перерыва и по окончании работы).

Разработаны специальные комплекты одежды, защищающие людей от нападения клещей и насекомых «Одежда для защиты от клещей, кровососущих насекомых и общих производственных загрязнений» (ТУ 8570-011-56615498-2008). Защитный эффект таких костюмов достигается на основе физических (специальная ткань и крой) и химических (обработка определённых элементов костюма акарицидами и репеллентами) факторов.

В комплексе профилактических мероприятий важная роль отводится мерам по борьбе с клещами на участках территорий природного очага инфекции (расчистка и благоустройство участков леса; освобождение от завалов, удаление сухостоя, валежника, низкорослого кустарника, скашивание травы; применение инсектицидов; дератизационные мероприятия, направленные на снижение численности прокормителей клещей-переносчиков).

Группы населения, связанные с профессиональной деятельностью на территории природного очага, обеспечиваются специальными костюмами для индивидуальной защиты от клещей. Эти контингенты обучаются правилам самоосмотров и взаимоосмотров на наличие присосавшихся клещей. При обнаружении присосавшегося клеща его следует удалить.

ЧАСТНАЯ АНАПЛАЗМОЛОГИЯ

МОНОЦИТАРНЫЙ ЭРЛИХИОЗ ЧЕЛОВЕКА

История изучения

Род *Ehrlichia* включает в себя пять видов. Эрлихии трёх видов – *E. canis*, *E. ewingii* и *E. chaffeensis* способны вызывать инфекцию как у собак, так и у людей, *E. muris* являются патогеном мышевидных грызунов, а *E. ruminantium* вызывают тяжёлую инфекцию у жвачных животных.

До недавнего времени анаплазмы были известны как возбудители заболеваний животных, проблема анаплазмозов интересовала только ветеринарных работников. Ситуация стала меняться, когда в США был описан случай моноцитарного эрлихиоза человека (Maeda K. et al., 1987). Первый случай МЭЧ был выявлен в госпитале Детройта в 1986 году у пожилого мужчины с лихорадкой неясной этиологии, возникшей после присасывания клеща в штате Арканзас. У больного были отмечены лихорадка, головные и мышечные боли, азотемия, гипоксемия, тромбоцитопения и цитоплазматические включения в лейкоцитах, оцененные в дальнейшем специалистами CDC в Атланте как *Ehrlichia* sp. Серологическое обследование с антигеном *E. canis* подтвердило эрлихиозную этиологию заболевания. Больной длительно находился в стационаре в связи с развитием почечной недостаточности и проведением гемодиализа, желудочными и кишечными кровотечениями, развитием патологии центральной нервной системы, системного кандидоза.

Эпидемиология

Отмечают связь случаев с проживанием в сельской местности, наличие в анамнезе контакта с клещами за одну-три недели до заболевания. Соотношение мужчин и женщин среди заболевших составляет 4:1, средний возраст – 44–51 год. Наибольшее число случаев МЭЧ выявляют в зонах распространения основного переносчика – *Amblyomma americanum* (рис. XII–XIV в цв. вкл.). Активизация клещей в тёплый

период обуславливает сезонность случаев инфекции (апрель – сентябрь с пиком в мае – июне).

С помощью серологических тестов с антигеном *E. canis* в ряде штатов было выявлено много больных моноцитарным эрлихиозом среди лиц с предварительным диагнозом пятнистой лихорадки Скалистых гор (ПЛСГ) или других риккетсиозов (Eng T.R. et al., 1988). Не исключено, что отмечаемый рядом авторов рост заболеваемости ПЛСГ в ряде штатов США в 1970–1980 годах (Burgdorfer W., 1975; Hattwick M.A. et al., 1976) в какой-то мере был обусловлен регистрацией больных МЭЧ под диагнозом ПЛСГ в связи со схожестью клинической картины и отсутствием до того времени лабораторной диагностики МЭЧ. В Оклахоме – штате с наибольшей заболеваемостью ПЛСГ – также серологически доказано широкое распространение МЭЧ (Harkess J.R. al., 1989).

Активное выявление и серологическое обследование лихорадящих госпитализированных больных в юго-восточной части штата Джорджия показали шестикратное превышение заболеваний МЭЧ над ПЛСГ (Fishbein D. et al., 1989). У больных в анамнезе были указания на присасывание клещей, отмечали лихорадку, озноб, анорексию, снижение веса, потливость, головные и мышечные боли, тошноту, тромбоцитопению, повышение уровня печёночных трансаминаз, несколько реже определяли артралгии, рвоту, диарею, боль в животе, кашель, сыпь и лейкопению. Тяжесть заболеваний варьировала от стёртых до тяжёлых (в т. ч. летальных) форм.

В первый период изучения возбудителем МЭЧ считали *E. canis* – возбудителя эрлихиоза собак, поскольку сыворотки больных и реконвалесцентов реагировали в реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) с антигеном этого возбудителя в диагностически значимых титрах. Этот возбудитель передаётся клещами *Rhipicephalus sanguineus* и широко распространён среди собак (Rikihisa Y., 1991).

Разработка метода изоляции на длительно культивируемой линии клеток собачьей гистиоцитомы (DH82) позволила выделить штамм эрлихий, идентифицированный с помощью генетических методов от военнослужащего с лихорадкой неясного генеза в Fort Chaffee, штат Арканзас. Оказалось, что он

очень близок, но не идентичен (гомология 98,8 %) изолятам от собак (Dawson J.E. et al., 1991). В результате проведённых исследований возбудитель МЭЧ был номинирован в качестве нового вида *Ehrlichia chaffeensis* (Anderson B.E. et al., 1991). Затем был описан ещё один возбудитель эрлихиоза собак – *E. ewingii* (Anderson B.E. et al., 1992).

Наиболее изучено распространение МЭЧ в США, где эта инфекция выявлена в большинстве штатов, включая Аляску и Гавайские острова, наибольший уровень отмечен в юго-западных и центрально-южных штатах, особенно в штате Арканзас (Childs J.E. et al., 1999). В период с 2003 по 2010 год в США было зарегистрировано более 4300 подтверждённых случаев МЭЧ, более 4500 случая ГАЧ и десятки случаев эрлихиозов, вызванных *E. ewingii* (MMWR, 2010). Большинство случаев МЭЧ было отмечено в южной, юго-восточной, а также в среднеатлантической части США.

Ehrlichia chaffeensis была изолирована или идентифицирована в ПЦР от пациентов с МЭЧ, оленей, собак и клещей в США. Серологически верифицированные случаи МЭЧ были выявлены в 47 штатах США, Мексике, Западной Европе, Израиле и Африке. Антитела к *Ehrlichia chaffeensis* выявлены у людей в Юго-Восточной Азии, Африке и России.

Единичные случаи МЭЧ выявлены серологически в нескольких странах Европы (Португалия, Испания, Бельгия); наличие выраженных перекрёстных серологических реакций между моноцитарными эрлихиями и отсутствие подтверждения случаев молекулярно-генетическими методами или изоляцией возбудителя не позволяет окончательно оценить их достоверность (Brouqui P., 1999). Вместе с тем вызываемый *E. canis* моноцитарный эрлихиоз диагностирован среди собак в различных странах Европы: Франции, Испании, Португалии, Италии и Германии.

Не до конца понятно значение в патологии человека нового вида микроорганизмов семейства *Anaplasmataceae*, наиболее генетически близкого с *E. (Cowdria) ruminantium*, выявленного в очагах гранулоцитарного анаплазмоза и недавно описанного под названием Schotti variant (Schouls L.M. et al., 1999). В 2010 году были получены первые свидетельства

патогенности для людей этого вида, описываемого в настоящее время как “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” – вид, который образует отдельный филогенетический кластер в семействе *Anaplasmataceae* (Kawahara et al., 2004). “*Candidatus N. mikurensis*” распространены в различных частях Евразии и переносятся клещами рода *Ixodes*, ДНК этого возбудителя была обнаружена в образцах крови четырёх лихорадящих больных из Европы (Fehr et al., 2010; von Loewenich et al., 2010; Welinder-Olsson et al., 2010).

Выявление широкого распространения *E. muris* в клещах *Ixodes persulcatus* в России (Ravyn M.D. et al., 1998; Алексеев А.Н. и др., 1999; Rar V.A.; Shpynov S. et al., 2006 и др.) и выявленная связь этого вида с заболеваниями МЭЧ в Пермском крае (Григорян Е.В. и др., 2002) и на других территориях России может возобновить интерес к изучению МЭЧ.

Pritt B.S. с соавторами (2009, 2011) в штатах Висконсин и Миннесота США описал случаи заболеваний МЭЧ, вызванных *E. muris-like* (EML-agent) эрлихией, связанные с присасыванием клещей *Ixodes scapularis*. По результатам молекулярно-генетических исследований данный инфекционный агент оказался наиболее близок к *E. muris* (рис. 7; а также рис. XXIII в цв. вкл.).

Экология возбудителя. Природная очаговость

Существование и распространение возбудителя МЭЧ, равно как и эпидемиологические особенности, связаны с существованием природных очагов, в поддержании которых наибольшее значение имеют специфические виды клещей-переносчиков и их теплокровных хозяев-прокормителей.

Основным видом клещей-переносчиков является *Amblyomma americanum* (рис. XII, XIV в цв. вкл.). Меньшее значение имеет *Dermacentor variabilis* (американский собачий клещ). Иксовые клещи этих видов широко распространены в США, основными прокормителями взрослых особей (имаго) являются белохвостые олени и собаки. Эти виды теплокровных хозяев

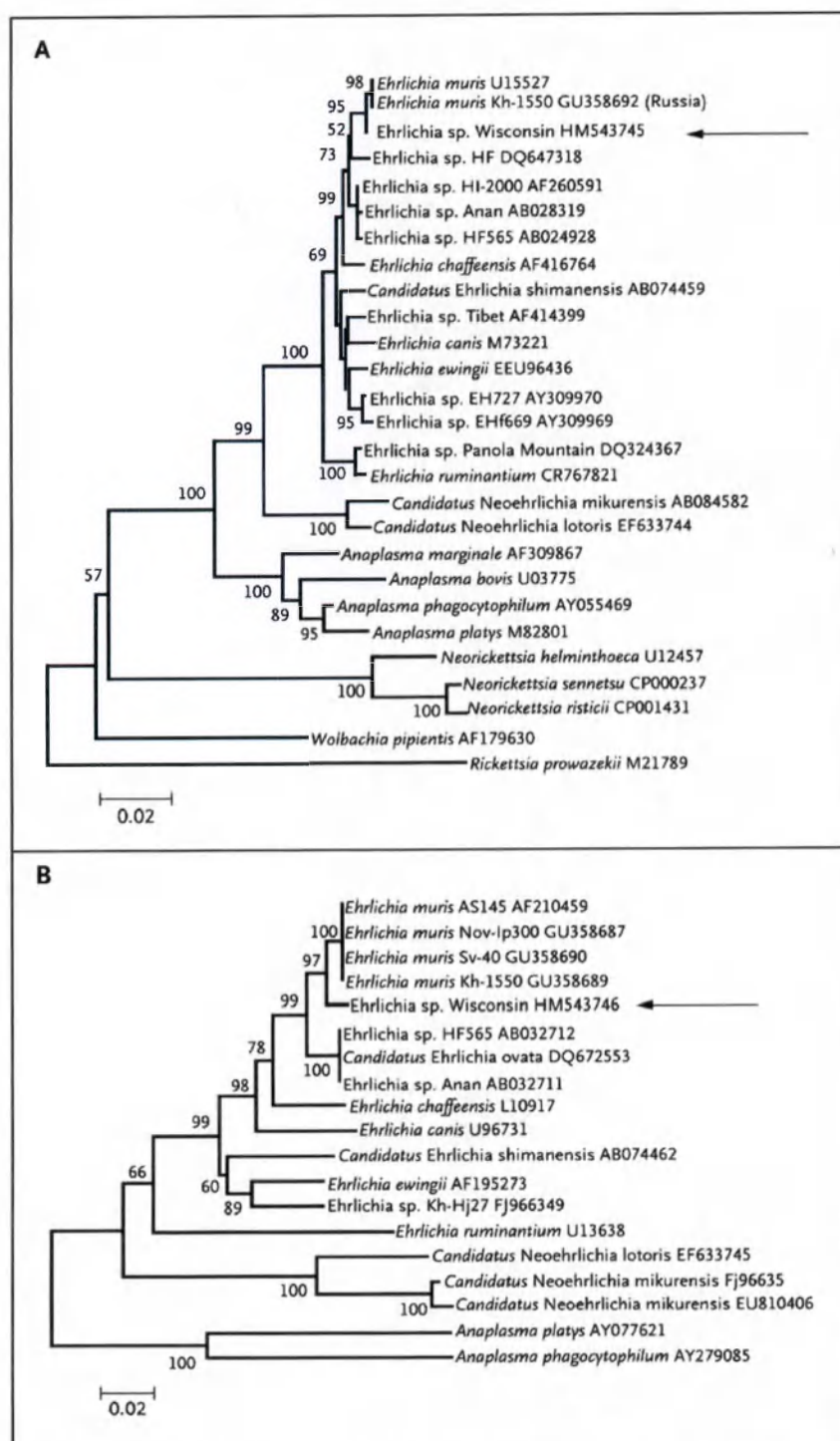


Рис. 7. Генетические взаимоотношения EML-агента:

А – филогения на основе гена 16S рибосомальной РНК (rrs) с использованием метода минимальной эволюции с дистанциями, рассчитанными с помощью метода Jukes-Cantor как количество базовых замен на сайт; **В** – филогения на основе GroEL (гена оперона белка теплового шока) с использованием метода ближайшего соседа с определением дистанций Kimura two-parameter метода.

В целом проанализированы 1160 позиций для rrs и 591 – для groEL

в экспериментальных условиях высокочувствительны к заражению *Ehrlichia chaffeensis*, с эрлихемией на протяжении нескольких недель. Иксодовые клещи способны передавать эрлихии трансфазо (от личинок к нимфам и от нимф к имаго), но не трансовариально. Прокармливаясь на инфицированных животных, незаражённые клещи становятся инфицированными и на последующей стадии могут передавать инфекционный агент другим млекопитающим. Голодные нимфы и имаго *Amblyomma americanum*, полученные из личинок, нимф и имаго, накормленных на белохвостых оленях, заражённых *Ehrlichia chaffeensis*, через три месяца передавали возбудитель оленям, однако не передавали собакам (Ewing S.A. et al., 1995).

Эрлихии попадают в организм человека со слюной инфицированного клеща. Инкубационный период составляет чаще от 8 до 15 дней.

Изучение моноцитарного эрлихиоза человека в России

В 1999 году впервые серологически подтверждено заболевание МЭЧ в России у четырёх больных в г. Перми после присасывания клещей (Ravyn M.D. et al., 1999). В клещах *Ixodes persulcatus*, собранных с растительности на территории Пермского края, авторами был генотипирован микроорганизм из рода *Ehrlichia* – *Ehrlichia muris*. Клиническая картина МЭЧ в России охарактеризована преимущественно по результатам наблюдений за больными в Пермской области (Григорян Е.В. и др., 2000).

Этот вид эрлихий впервые выявлен от южно-азиатских полёвок в Японии (Kawahara M. et al., 1993; Wen B. et al., 1995) и не был известен как патоген человека. Эрлихии этого вида и до настоящего времени не изолированы от больных МЭЧ. «Мышиный» патоген *E. muris* выявлен также в иксодовых клещах *Haemaphysalis flava* (Kawahara M. et al., 1999), *I. ricinus* (Spitalska E. et al., 2008), *I. granulatus* (Takano A. et al., 2009).

E. muris выявлена в таёжных клещах на северо-западе России (Alekseev A.N. et al., 2001). К настоящему времени установлено широкое распространение *E. muris* на ряде

территорий азиатской части России в зоне распространения основного переносчика этого вида моноцитарных эрлихий – таёжного клеща *Ixodes persulcatus* (Шпынов С.Н. и др., 2002, 2004; Shpynov S. et al., 2006). ДНК *E. muris* была выявлена у 10 из 317 (3,1 %) исследованных клещей *I. persulcatus*. *E. muris* была выявлена в клещах этого вида, собранных на территории Тюменской (5,3 %), Омской (3,3 %) и Новосибирской (3,8 %) областей и Алтайского края (8,5 %).

Можно считать достаточно вероятным распространение *E. muris* в пределах всего ареала *Ixodes persulcatus*, в том числе в России – в пределах всего лесного пояса от западных до восточных границ. Антитела к возбудителю МЭЧ были обнаружены у 7 % пациентов на территории Пермского края и у 1 % пациентов из Иркутской области (Григорян Е.В. и др., 2000; Борисов В.А. и др., 2010). Моноцитарный эрлихиоз, как и ГАЧ, чаще всего диагностировали в виде микст-инфекций с другими патогенами, переносимыми клещами (Попонникова Т.В. и Пиневич О.С., 2006).

Поскольку классический инфекционный агент МЭЧ, *E. chaffeensis*, в клещах *I. persulcatus* не был обнаружен, было высказано предположение, что другой вид моноцитарных эрлихий, *E. muris*, может являться этиологическим агентом МЭЧ в ареале *I. persulcatus* (Ravyn M. et al., 1999; Григорян Е.В. и др. 2000). В дальнейшем у двоих пациентов на территории Пермского края в образцах крови была выявлена ДНК *E. muris* (Нефедова В.В. и др., 2008). Вместе с тем сохраняет актуальность не только изучение распространения моноцитарных эрлихий и их видовой принадлежности, но и выделение *E. muris* от больных МЭЧ (т. е. подтверждение их этиологической роли) и иксодовых клещей.

Анаплазмы кандидата в новый вид “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” первоначально обнаружены в клещах *Ixodes ovatus* и грызунах в Японии и образуют отдельный филогенетический кластер в семействе *Anaplasmataceae* (Kawahara M. et al., 2004). К этому кластеру относятся анаплазмы, ранее выявленные в клещах *I. persulcatus* и *I. ricinus*, крысах *Rattus norvegicus* как *Ehrlichia*-like “*Schotti variant*” и *Ehrlichia* sp.

“*Rattus strain*” (Schouls L.M. et al., 1999; Kawahara M. et al., 2004; Шпынов С.Н. и др., 2004; Pan H. et al., 2009).

В России “*Schotti variant*” эрлихий выявлен впервые в клещах *I. persulcatus* на территории Омской области (Шпынов С.Н. и др., 2004). Патогенность этой анаплазмы для человека окончательно не установлена.

Подробный молекулярно-биологический анализ ДНК представителей семейства *Anaplasmataceae*, выявленных в клещах и мелких млекопитающих на территории азиатской части России, был проведён Верой Александровной Пар с коллегами (Пар В.А. и др., 2007, 2008, 2011; Par V.A. et al., 2005, 2010, 2011 и др.). Ими впервые проведено комплексное исследование распространения и генетического разнообразия протеобактерий семейства *Anaplasmataceae* в иксодовых клещах и мелких млекопитающих на территории азиатской части России. Показано, что возбудитель ГАЧ *A. phagocytophilum*, предполагаемый возбудитель МЭЧ – *E. Muris*, и в отдельных случаях патогенные для людей бактерии “*Candidatus N. mikurensis*” распространены в различных частях ареала таёжного клеща, что свидетельствует о возможном участии данных возбудителей в генезе переносимых клещами инфекций на территории исследуемых областей.

Показано, что выявленные образцы *E. muris* и “*Candidatus N. mikurensis*” строго консервативны по гену 16S рРНК и *groESL* оперону, а выявленные образцы *A. phagocytophilum* на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и *groESL* оперона подразделяются на три группы, которые различаются также по тропизму к позвоночным хозяевам. На территории Хабаровского края в клещах *Haemaphysalis* spp. и в мелких млекопитающих были обнаружены два новых генетических варианта *Ehrlichia* spp., которые не могут быть отнесены ни к одному из известных видов (Пар В.А. и др., 2007). Кроме того, в клещах *Ixodes* spp., *Haemaphysalis concinna* и *Dermacentor silvarum* была обнаружена ДНК одиннадцати новых генетических вариантов бактерий из семейства *Anaplasmataceae*, которые на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК не могут быть отнесены ни к одному из родов семейства.

Показано, что на территории Новосибирской области около 2 % случаев острых лихорадочных состояний у пациентов, возникающих после присасывания клеща, могут быть верифицированы как случаи гранулоцитарного анаплазмоза и/или моноцитарного эрлихиоза (Рар В.А. и др., 2008).

Патогенез и патологическая анатомия

Воротами инфекции служит кожа в месте присасывания клеща. По лимфатическим путям эрлихии проникают в кровь; размножение происходит в моноцитах. Стадии патогенеза подобны другим анаплазмозам: адгезия – интернализация возбудителя в клетку – размножение в эндосоме – формирование морулы – гибель клетки – выход из неё новых генераций эрлихий (Kalinova Z. et al., 2009).

Поражаются различные органы: кожа, печень, центральная нервная система, костный мозг. При тяжёлом течении болезни особенно выражены полиорганный периваскулярный инфильтрат лимфогистиоцитами, нарушение проницаемости сосудов и геморрагии во внутренних органах. Установлено, что *Erlichia chaffeensis* способна проникать в спинномозговую жидкость и вызывать менингит (Козько В.Н. и др., 2012). Не исключается возможность длительного персистирования эрлихий в организме человека и хроническое течение заболевания (Ganguly S., Mukhopadhyay S.K., 2008).

В процессе внутриклеточного размножения эрлихий в кровеносное русло активно высвобождаются провоспалительные цитокины (альфа-фактор некроза опухоли, ИЛ-6, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), обуславливающие многие неспецифические проявления болезни (Ismail N. et al., 2010). Период реконвалесценции сопровождается ростом антител к поверхностному гликопротеину эрлихий 120 КД, высоким уровнем гамма-интерферона. Гамма-интерферон активирует внутриклеточную гибель *Ehrlichia chaffeensis* (Dumler J.S., Walker D.H., 2001).

Морфологически эрлихиоз характеризуется гранулематозным воспалением. В пунктате костного мозга выявляют миелоидную гиперплазию и мегакарицитоз, гранулемы.

В печени обнаруживают очаги гистеолимфоцитарной инфильтрации, гиперплазию Купфферовских клеток с активным фагоцитозом, повреждение эпителия желчных протоков и капиллярный стаз. В летальных случаях на аутопсии обнаруживают интерстициальную пневмонию, кровоизлияния в ткань лёгких, фокальные некрозы в печени, селезёнке, лимфатических узлах, периваскулярную лимфогистеоцитарную инфильтрацию, гемофагоцитоз (Dumler J.S. et al., 1993).

Клиническая картина

Код по МКБ-10.

A79.8. Другие уточненные риккетсиозы.

Клинические особенности подробно описаны в монографии В.И. Злобина с соавт. (2015). Клиническая классификация ограничена разделением болезни по тяжести течения.

Первое описание клиники моноцитарного эрлихиоза человека было дано К. Maeda в 1987 году в США. В сообщении описывался случай заболевания туриста из штата Мичиган, который в течение 1986 года путешествовал по сельской местности штата Арканзас и неоднократно подвергался укусам клещей. По возвращению в Мичиган он был госпитализирован в тяжёлом состоянии в инфекционное отделение. С диагнозом пятнистая лихорадка Скалистых гор пациент лечился в условиях стационара, где получал антибактериальную терапию левомицетином.

Сомнение в диагнозе возникло в связи с отсутствием у больного сыпи на теле, прогрессированием тромбоцитопении и анемии. Антибиотик был заменён на тетрациклин, в результате чего пациент полностью поправился. Возбудитель, обнаруженный в организме пациента, относился к группе *Ehrlichia canis*, который в последующем был идентифицирован как *Ehrlichia chaffeensis* (Maeda K. et al., 1987).

Инкубационный период длится от нескольких дней до двух недель (в среднем шесть дней).

Моноцитарный эрлихиоз человека протекает у разных людей по-разному: от субклинических форм до тяжёлой молниеносной летальной инфекции (Ismail N. et al., 2010).

Лихорадочный период составляет 2–3 недели, иногда затягивается до шести недель. Характерно внезапное начало болезни. Большинство симптомов в начале заболевания неспецифично: озноб, лихорадка, головная боль, миалгии, артралгии. У больных отмечается инъекция сосудов склер и конъюнктив. В последующем нарастает головная боль, отмечаются катаральные явления со стороны ротоглотки.

Через 2–3 дня к симптомам интоксикации присоединяются другие проявления болезни, свидетельствующие о переходе в стадию разгара. В период разгара выявляются симптомы поражения многих органов и систем. Закономерны изменения со стороны пищеварительной, нервной, сердечно-сосудистой, дыхательной систем, кожи, опорно-двигательного аппарата. Иногда увеличиваются печень и селезёнка. Со стороны нервной системы выявляется атаксия, светобоязнь, явления менингизма. В редких случаях возможно развитие менингита с соответствующей симптоматикой и ликворологической картиной серозного менингита, а также поражение лицевого нерва по центральному типу. Со стороны органов дыхания отмечается сухой кашель. Как следствие прогрессирующей анемии и тромбоцитопении, у больных может наблюдаться петехиальная сыпь, более выраженная на конечностях. Сыпь наблюдается примерно у 10 % больных, как правило, в течение первой недели. У детей сыпь встречается гораздо чаще – до 50 % случаев – и может носить не только петехиальный на и пятнисто-папулёзный характер (Козько В.Н. и др., 2012).

В большинстве случаев заболевание протекает легко и заканчивается спонтанным выздоровлением даже без применения антибиотиков. Тяжёлые случаи встречаются примерно у 15 % всех заболевших, и летальность в этой группе больных колеблется от 2 до 5 %. Смерть пациентов обусловлена такими осложнениями, как менингоэнцефалит, острая почечная недостаточность, острый респираторный дистресс-синдром, миокардит, желудочно-кишечное кровотечение, диссеминированная коагулопатия, сепсис. Тяжёлые случаи чаще наблюдаются у пожилых людей, а также у лиц с иммунодефицитом (Fishbein D.B. et al., 1994).

Поскольку клещи одновременно могут переносить несколько патогенных микроорганизмов, вероятность развития трансмиссивных микст-инфекций достаточно высока. Вместе с тем в литературе имеется не так много документированных случаев микст-инфекций у человека. Это касается сочетания моноцитарного эрлихиоза человека и пятнистой лихорадки Скалистых гор в США, других анаплазмозов, боррелиозов (James A.M. et al., 2001).

Диагноз и дифференциальная диагностика

В течение первой недели заболевания у больных наблюдается тромбоцитопения, лейкопения, лимфопения, анемия, повышается активность печёночных трансаминаз. На второй неделе появляется относительный реактивный лимфоцитоз, при этом количество тромбоцитов продолжает снижаться, что нередко сопровождается появлением петехиальной сыпи. При лёгком и субклиническом течении эрлихиоза лабораторные показатели не отличаются от нормы.

В связи с отсутствием патномоничных симптомов клиническая диагностика моноцитарного эрлихиоза человека затруднена. Даже в эндемичных регионах в первые дни госпитализации диагноз моноцитарного эрлихиоза человека подозревается лишь у 20 % больных (Dawson J.E. et al., 2005). Большинству пациентов ставят такие клинические диагнозы, как острый аппендицит, гастроэнтерит, холангит, вирусный гепатит, менингит, пневмония, острый лейкоз, тромбоцитопеническая пурпура, васкулит, сепсис. Этот набор диагнозов определяет основной дифференциально-диагностический круг моноцитарного эрлихиоза человека.

Лечение и прогноз

Тетрациклины являются основной и, практически, единственной группой антибактериальных препаратов, эффективно действующих на *Ehrlichia chaffeensis* (Dawson J.E. et al., 2005). Их использование позволяет добиться значительного

улучшения самочувствия пациента и нормализации температуры уже в течение первых двух суток терапии. Доксициклин назначается по 100 мг для взрослых и 1,5 мг/кг массы тела для детей два раза в день *per os* или внутривенно при тяжёлом течении. Тетрациклин назначается по 25 мг/кг/ в сутки в четыре приёма. Курс лечения обычно составляет 7–14 дней (Kalinová Z. et al., 2009). В отличие от других риккетсиозов левомицетин не эффективен при моноцитарном эрлихиозе человека. Нет также убедительных данных об эффективности фторхинолонов (Ganguly S., Mukhopadhyay S.K., 2008; Козько В.Н. и др., 2012).

Патогенетическая терапия проводится дезинтоксикационными растворами, антигистаминными, жаропонижающими и противовоспалительными препаратами.

После перенесённого заболевания формируется стойкий иммунитет. Повторных заболеваний не наблюдается.

Лабораторная диагностика и профилактика описаны в разделе «Анаплазмозы и эрлихиозы».

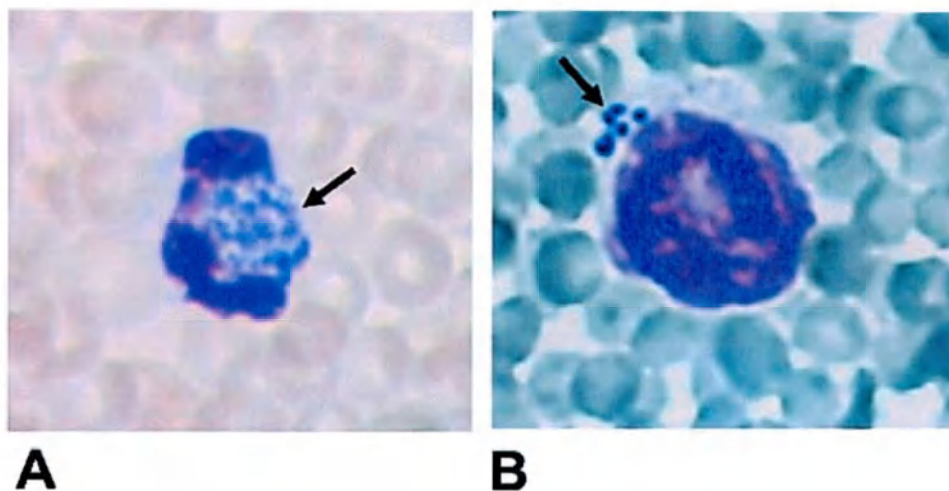


Рис. I. Морулы (стрелка) *Anaplasma phagocytophilum* в окрашенных по Giemsa в мазках крови теленка: Морула в нейтрофиле через 2 часа после рождения (А). Морулы в лимфоците через день после рождения (В). Увеличение: 10×100
https://www.researchgate.net/figure/236601481_fig1_Morulae-arrow-of-Anaplasma-phagocytophilum-in-Giemsa-stained-blood-smears-of-the-calf

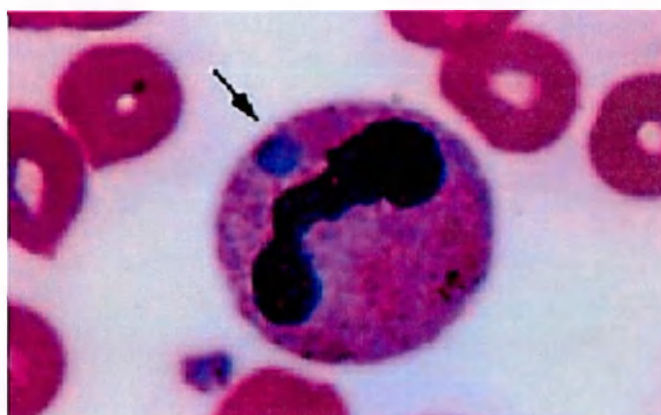


Рис. II. Морула *Anaplasma phagocytophilum* (стрелка)
<http://www.infectionlandscapes.org/2011/06/ehrlichiosis.html>

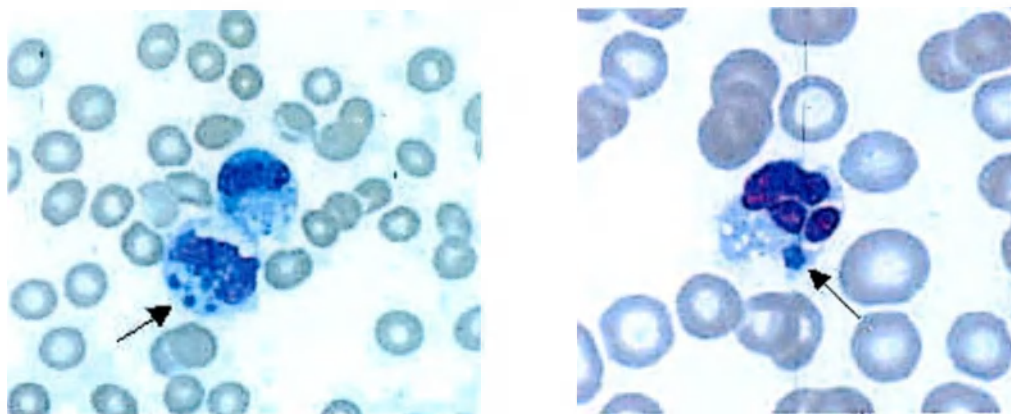


Рис. III. А – *Ehrlichia chaffeensis*; В – *E. ewingii* в мазках крови
<http://www.infectionlandscapes.org/2011/06/ehrlichiosis.htm>

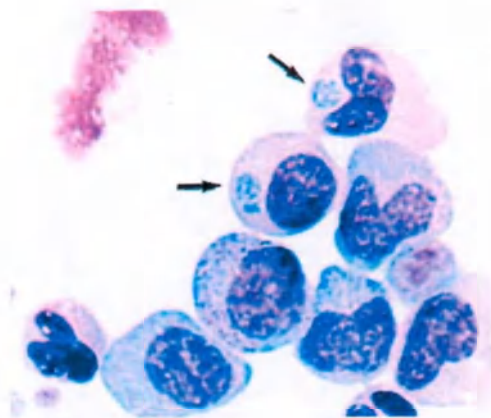


Рис. IV. Микрофотография мазка крови пациента с окраской по методу Wright. Включения *A. phagocytophilum* в цитоплазме двух различных стадий гранулоцитов (метамиелоцит и миелоцит). Стрелки указывают на морулы Bayard-Mc Neeley M. et al. (2004).

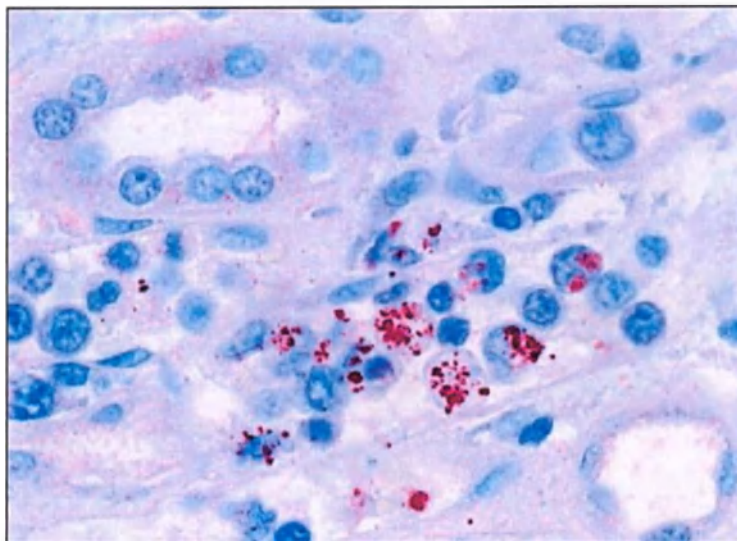


Рис. V. Иммуногистохимическая окраска демонстрирует морулы (красный цвет) *Ehrlichia chaffeensis* внутри моноцитов в почке пациента с эрлихиозом <http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/rr/rr6502a1.htm>

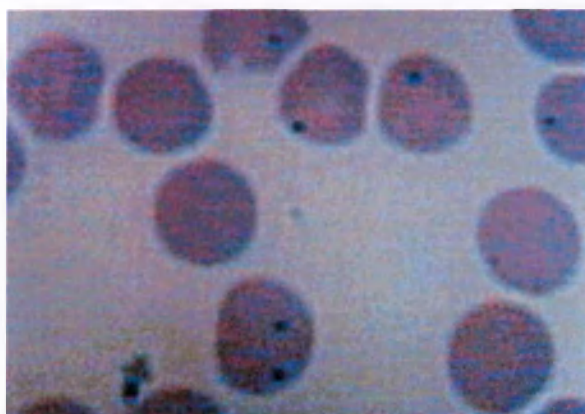


Рис. VI. Эритроциты крупного рогатого скота, инфицированные анаплазмами штамма «*Anaplasma sp. Omsk*»

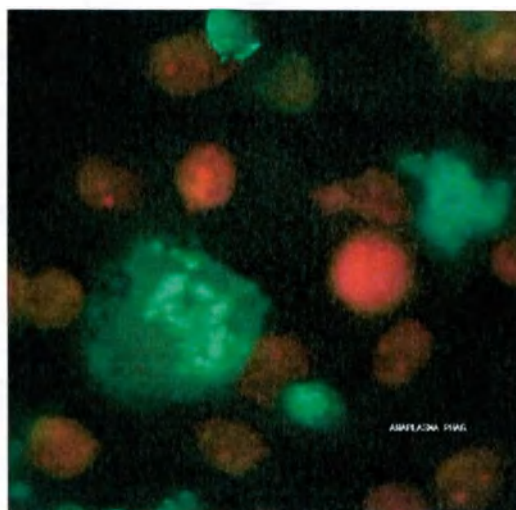
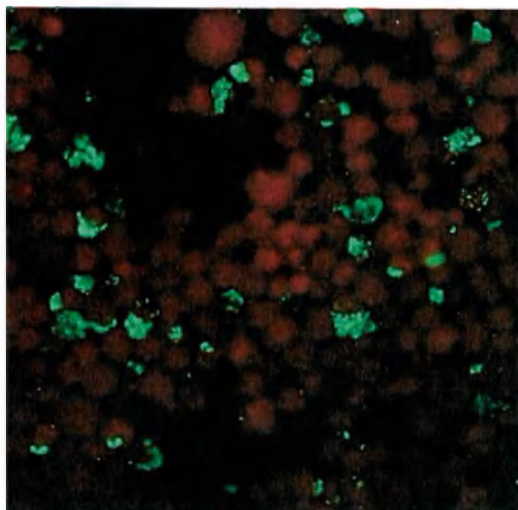


Рис. VII. *Anaplasma phagocytophilum* в мазках крови животных (метод МФА)
http://euroveterinaria.com/index.php?id_product=25&controller=product

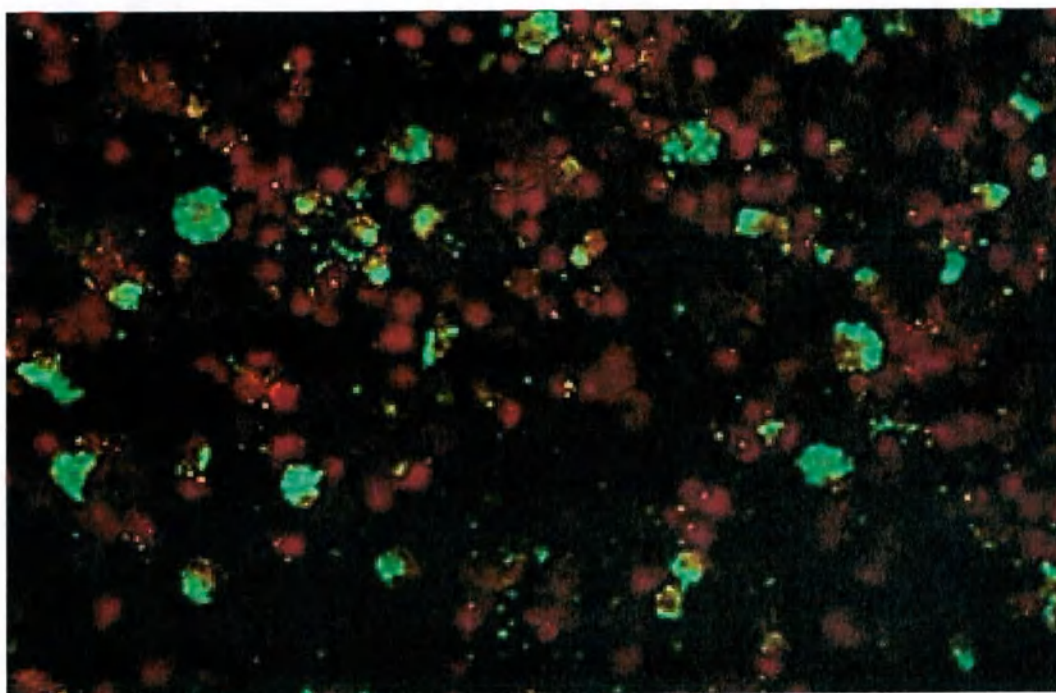


Рис. VIII. *Anaplasma phagocytophilum* в культуре клеток

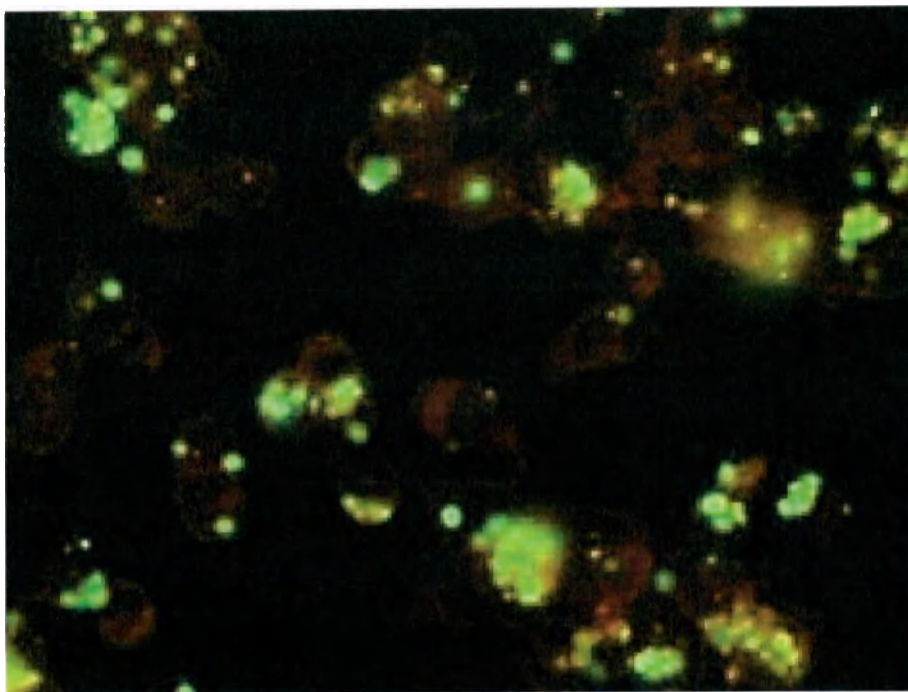


Рис. IX. E. chaffeensis в культуре клеток

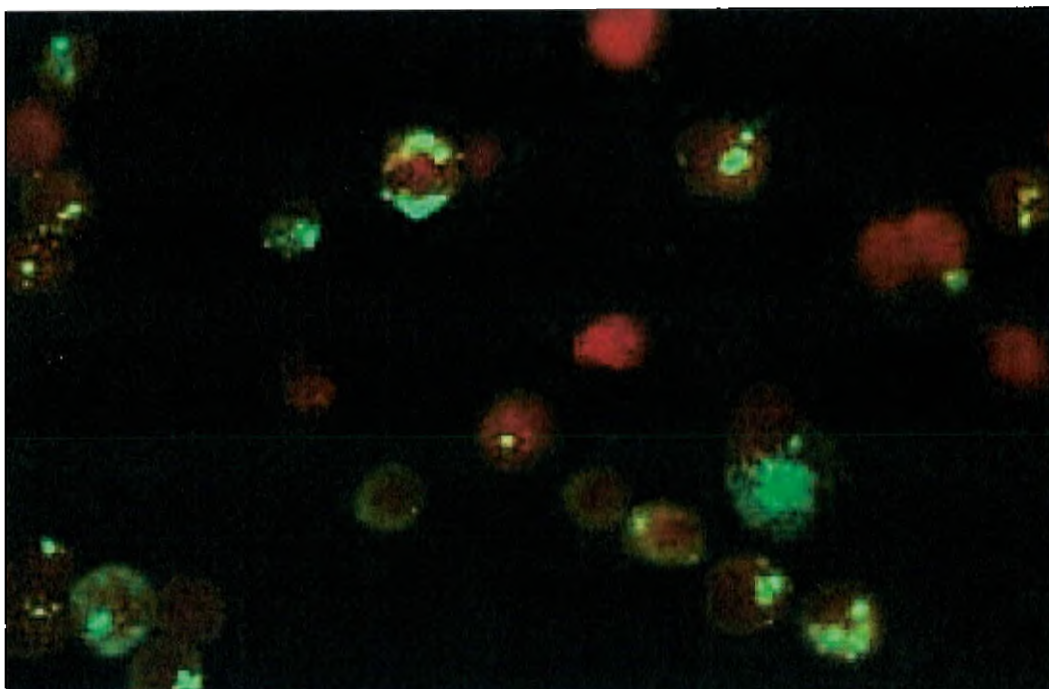


Рис. X. Neorickettsia risticii в культуре клеток
http://www.genoprice.com/new_page_97.htm

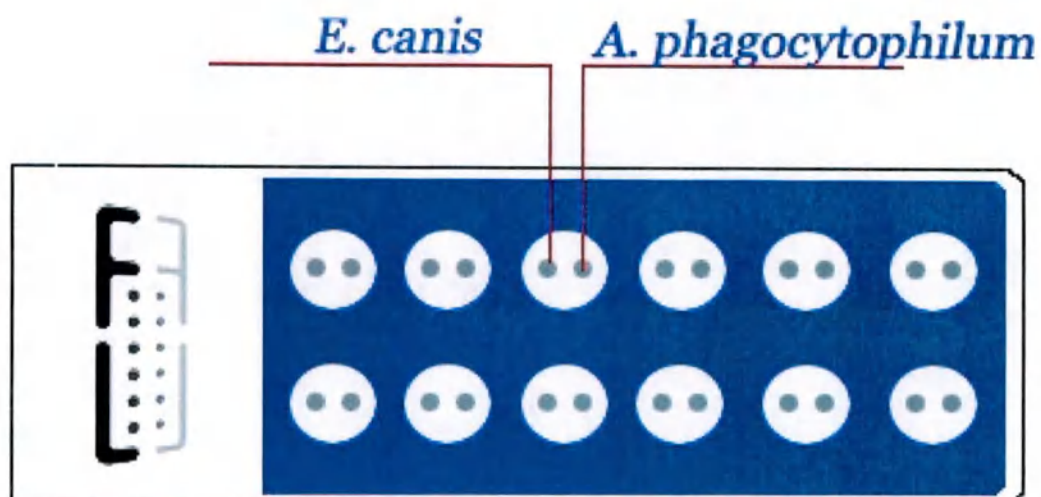


Рис. XI. Слайд-антигены анаплазм для реакции
непрямой иммунофлюоресценции



Рис. XII. Взрослая самка *Amblyomma americanum* (lone star tick) – основной
переносчик *Ehrlichia spp.* в США. Имеет характерное
белое пятно на спине <http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/rr/rr6502a1.htm>

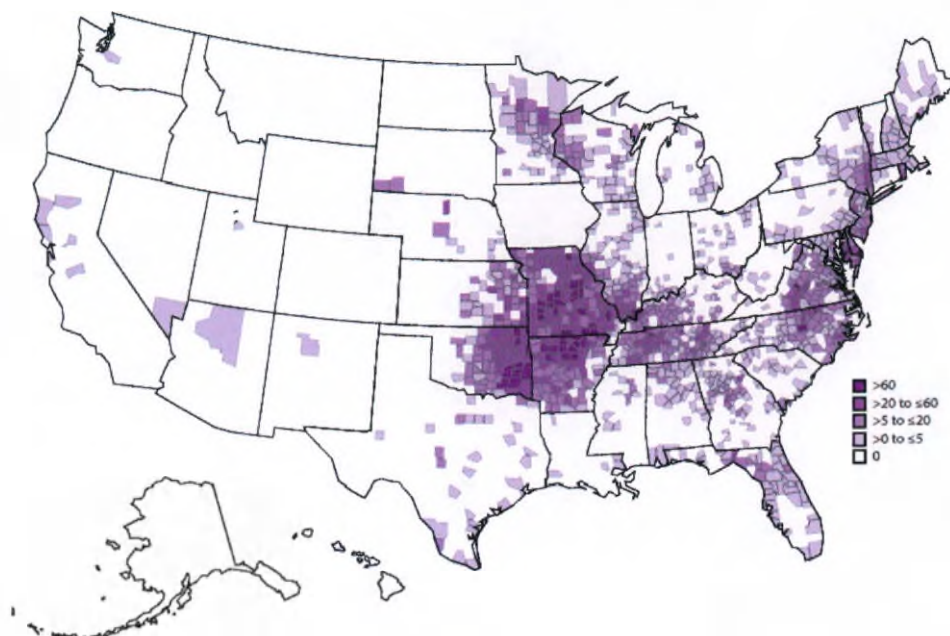


Рис. XIII. Уровень заболеваемости в США на 1 млн человек в год эрлихиозом, вызванным *Ehrlichia chaffeensis*, 2000–2013 гг.
<http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/rr/rr6502a1.htm>

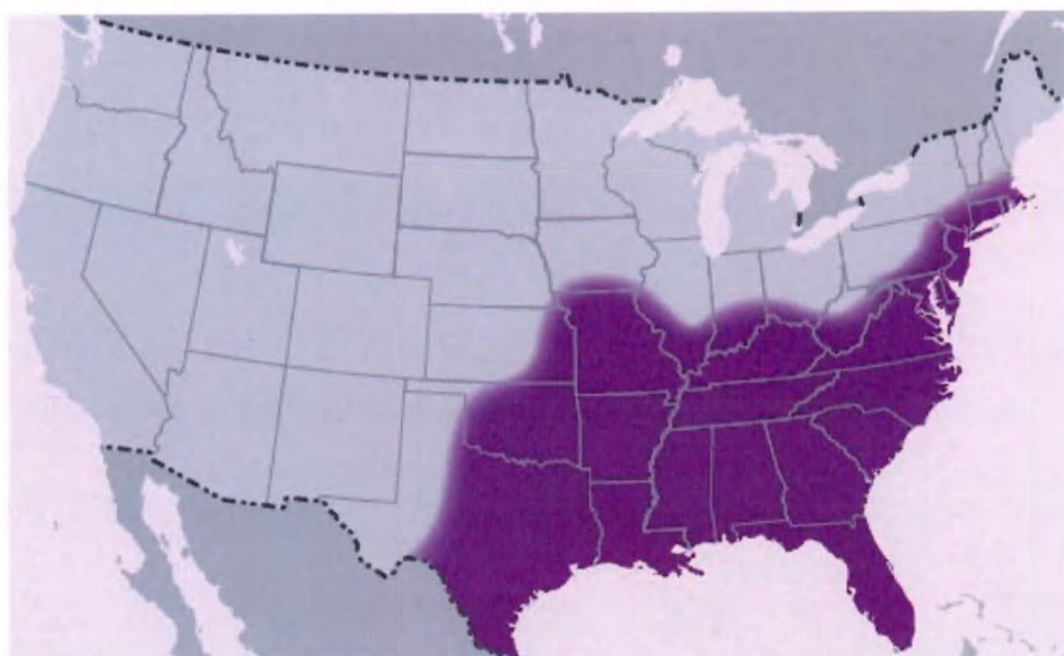


Рис. XIV. Примерное распространение в США клещей *Amblyomma americanum*. Основные векторы *A. phagocytophilum*: *Ixodes scapularis* на северо-востоке США, *Ixodes pacificus* на западе США и *Ixodes ricinus* в Европе, Средиземноморье, на Ближнем Востоке и в Центральной Азии
<http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/rr/rr6502a1.htm>



Рис. XV. Взрослая самка *Ixodes scapularis* (blacklegged tick)
<http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/rr/rr6502a1.htm>



Рис. XVI. Взрослая самка *Ixodes pacificus* (western-blacklegged tick)



Рис. XVII. Взрослая самка *Ixodes ricinus*
<http://ednieuw.home.xs4all.nl/Spiders/Ixodidae/ixodidae.htm>

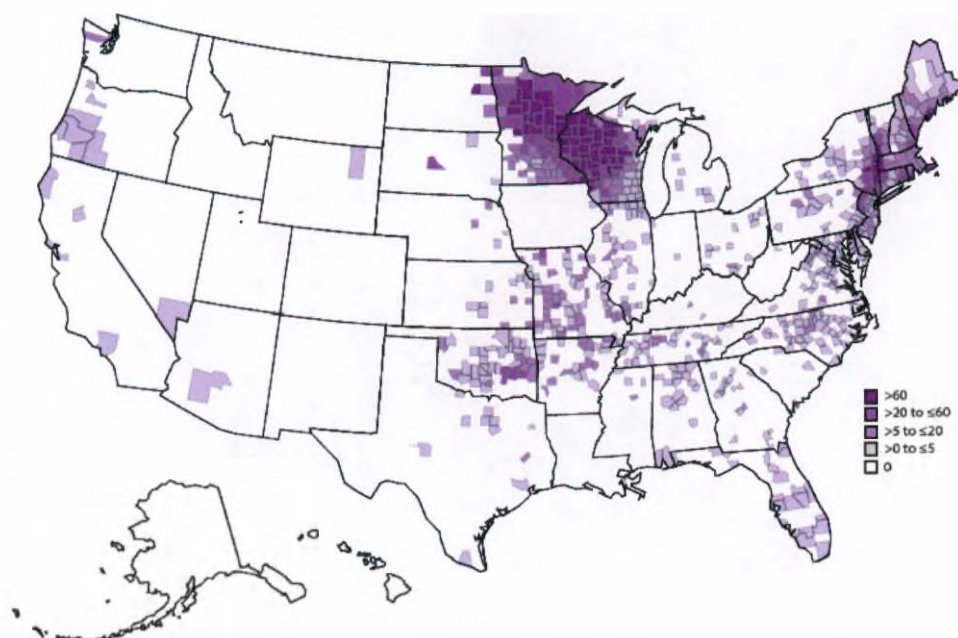


Рис. XVIII. Уровень заболеваемости в США на 1000000 человек в год анаплазмозом, 2000–2013 гг.

<http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/rr/rr6502a1.htm>

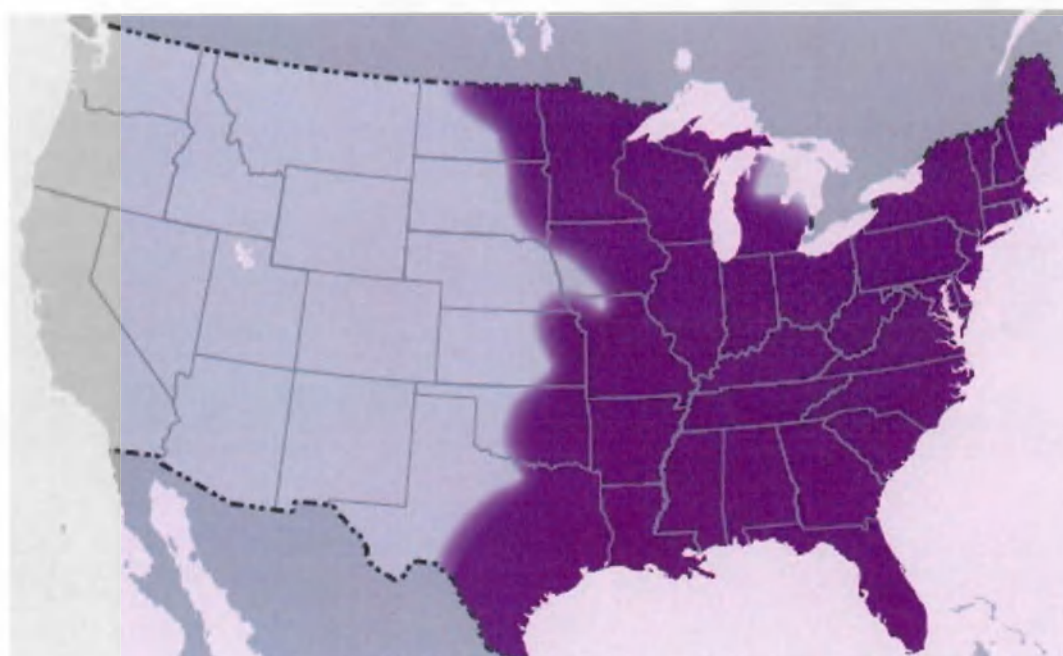


Рис. XIX. Примерное распространение в США клещей *Ixodes scapularis* (blacklegged tick)

<http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/rr/rr6502a1.htm>

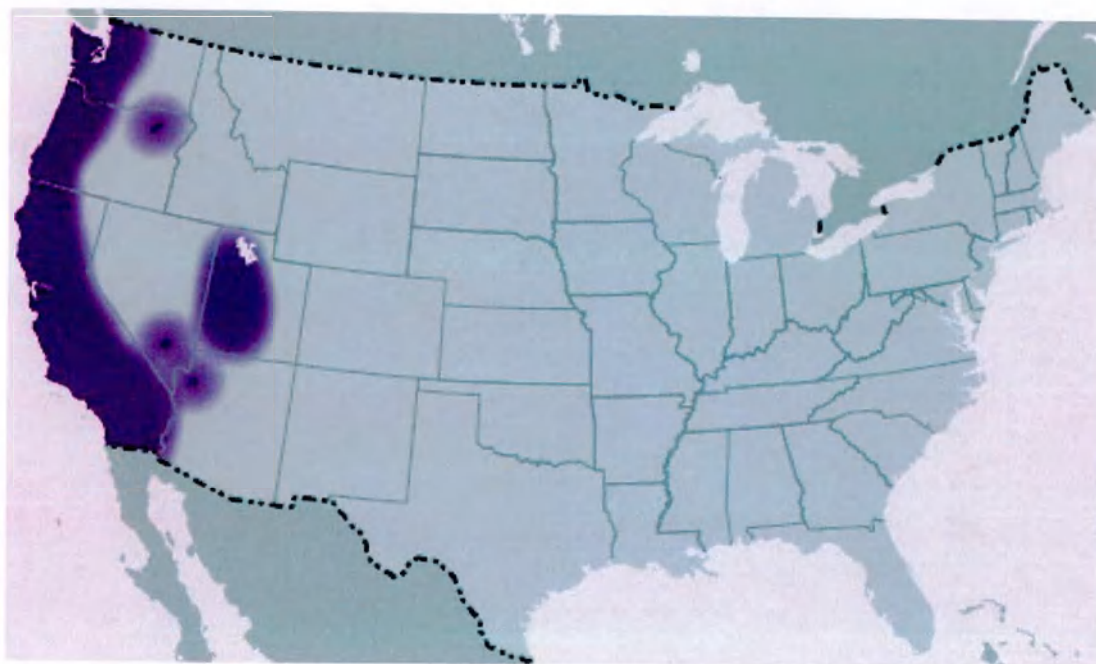


Рис. XX. Примерное распространение в США клещей *Ixodes pacificus* (western-blacklegged tick)

<http://www.infectionlandscapes.org/2011/06/ehrlichiosis.html>



Рис. XXI. Примерное распространение клещей *Ixodes ricinus* в Евразии

<http://www.infectionlandscapes.org/2011/06/ehrlichiosis.html>

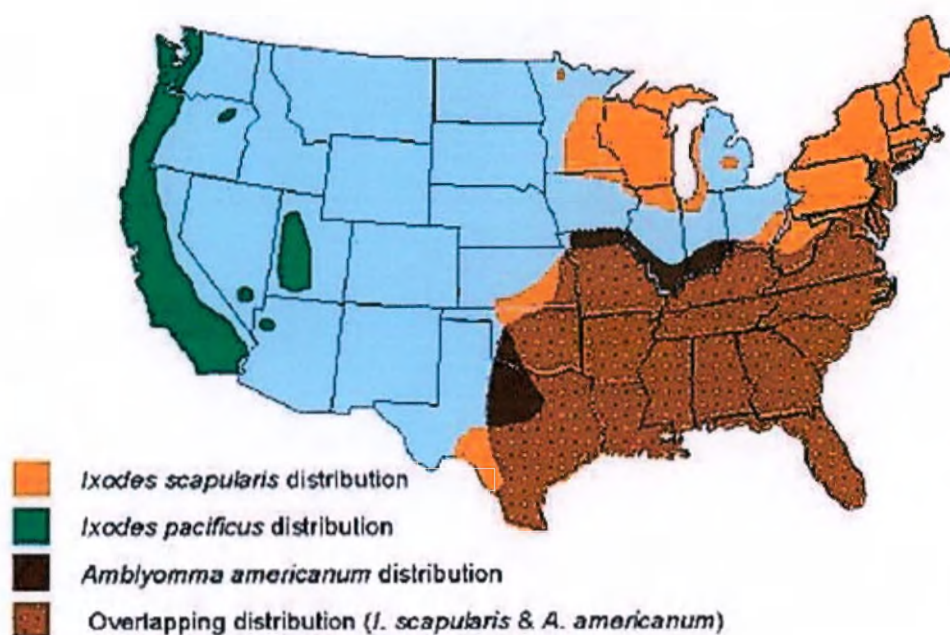


Рис. XXII. Примерное распространение в США
 эпидемически значимых видов клещей
<http://www.infectionlandscapes.org/2011/06/ehrlichiosis.html>

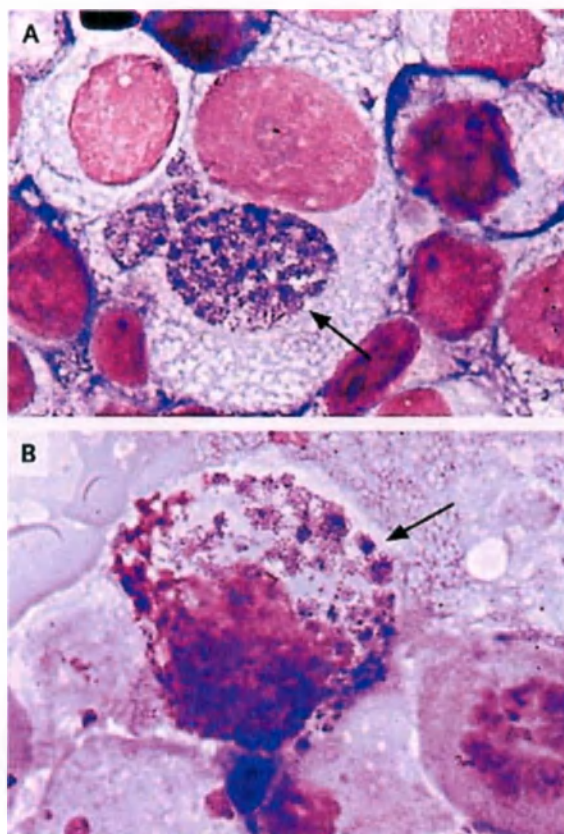


Рис. XXIII. А – клеточная линия ISE6, В – клеточная линия RF/6A
 Морюлы EML-агента показаны стрелочкой (окраска по Giemsa)

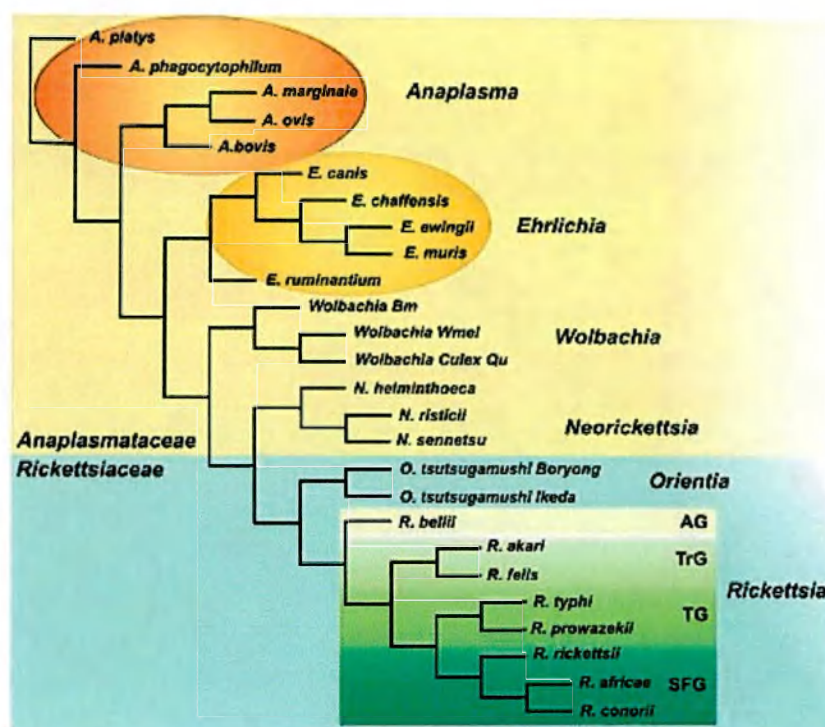


Рис. XXIV. Филогенетическое дерево порядка *Rickettsiales*
Дерево построено на основе clustalW alignment of 16S ribosomal RNA gene sequences using POWER (<http://power.nhri.org.tw/power/home.htm>)

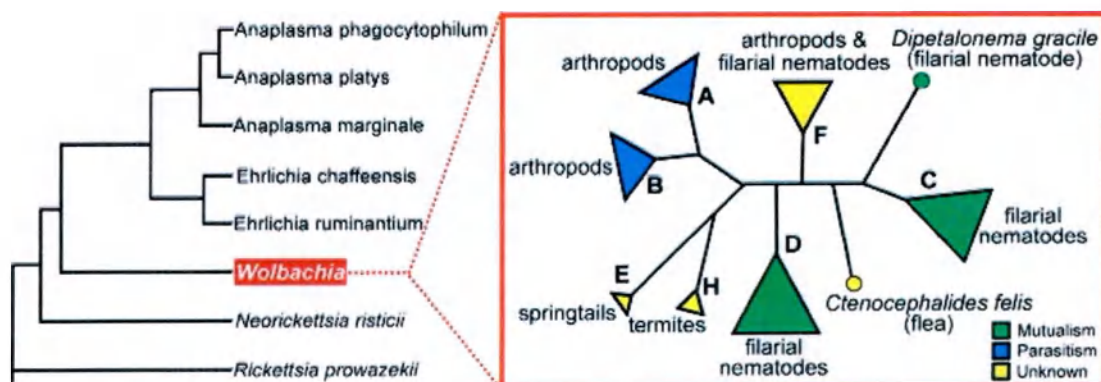
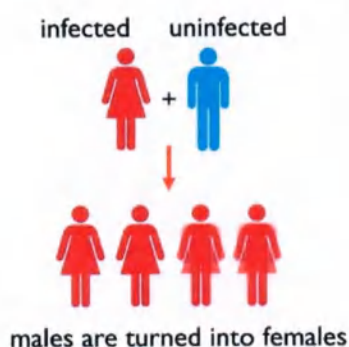


Рис. XXV. Таксономическое положение *Wolbachia* и взаимосвязи между различными группами *Wolbachia* и их взаимодействия с хозяевами
<http://www.werrenlab.org/wolbachia/wolbachia-biology/>

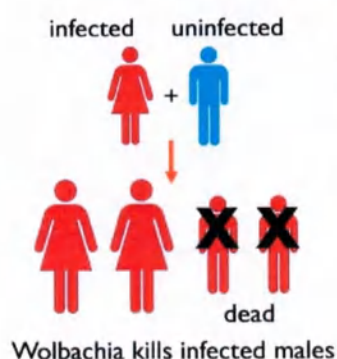
Feminization



Parthenogenesis



Male Killing



Cytoplasmic Incompatibility

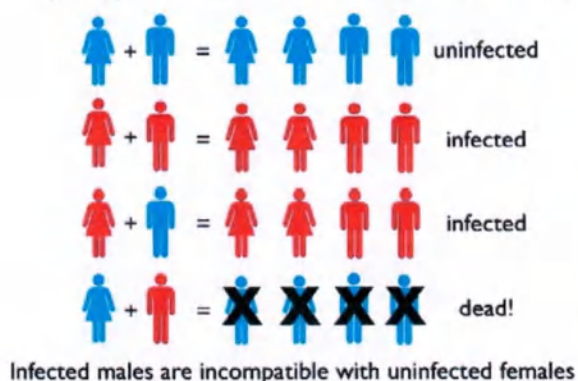


Рис. XXVI. Способы управления вольбахиями репродуктивной биологией хозяина:

- 1) феминизация инфицированных мужчин; 2) индуцированный партеногенез;
 - 3) male-killing эффект; 4) цитоплазматическая несовместимость
- <http://www.werrenlab.org/wolbachia/wolbachia-biology/>

ГРАНУЛОЦИТАРНЫЙ АНАПЛАЗМОЗ ЧЕЛОВЕКА

История изучения

Хотя *Anaplasma phagocytophilum* была известна как патоген животных ещё с 1932 года, вызываемый этим микроорганизмом гранулоцитарный анаплазмоз человека не был известен по 1990 год. ГАЧ был впервые выявлен в 1991 году в штате Миннесота Д. Бэккенем (Bakken J.S. et al., 1994) как клинический синдром потенциально летального заболевания с лихорадкой у пациента с цитоплазматическими включениями в нейтрофилах. Бэккен предположил эрлихиозную этиологию заболевания.

Дальнейшие исследования были проведены им совместно с сотрудниками лаборатории Дэвида Волкера (Walker D.H., Dumler J.S., 1996) в Гальвестоне (University of Texas Medical Branch) и в лаборатории Стефена Дамлера (Dumler J.S. et al., 1993; Dumler J.S., Walker D.H., 2001) в Мэрилендском университете (Балтимора). Серологическое обследование на антитела к возбудителю МЭЧ дало отрицательные результаты. От Д. Бэккена 18 июня 1992 года (в последний день перед переездом С. Дамлера в Балтимор) поступила проба крови от 78-летнего больного. Культуру эрлихий выделить не удалось, результаты серологического обследования на *E. chaffeensis*, *E. canis*, *E. sennetsu* и *E. risticii* были отрицательными.

Амплификация в ПЦР и последующее секвенирование гена 16S rRNA выявили наиболее тесные связи инфекционного агента с *E. phagocytophilum* (патоген овец, крупного рогатого скота и оленей), *E. equi* (патоген лошадей), тесные связи с патогеном собачьих (canids) *E. platys*. Связи с *E. chaffeensis* оказались слабее. В наименьшей степени отмечено родство с *E. sennetsu*. Выявление ещё двенадцати аналогичных случаев заболеваний с наличием морул в нейтрофилах и подтверждённых в ПЦР со специфическими праймерами свидетельствовало о существовании отдельного эрлихиоза человека с преимущественным поражением гранулоцитов, аналогичного гранулоцитарным анаплазмам животных (Walker D.H., Dumler J.S., 1996).

Эпидемиология

К 1997 году было выявлено более 450 случаев ГАЧ в США, а также в Европе. В период с 2003 по 2010 год в США было зарегистрировано более 4500 случаев ГАЧ (MMWR, 2010). В США инфекция распространена преимущественно на северо-востоке, среднем Западе, в северной Калифорнии (рис. XVIII в цв. вкл.).

В Европе ГАЧ выявлена преимущественно на северо-западе и востоке одновременно с распространением соответствующих инфекций у жвачных животных, собак и лошадей. Первые случаи ГАЧ выявлены в Словении (Petrovec M. et al., 1999). В Европе случаи ГАЧ относительно редки (Bjorsdorff A. et al., 1999; Van Dobbenburgh A. et al., 1999), хотя специфические антитела у людей распространены достаточно широко (Oteo J.A. et al., 2001).

Заболевания ГАЧ встречаются не только в сельской местности, но и в пригородных зонах даже таких крупных городов, как Нью-Йорк. Хотя средние показатели заболеваемости в штатах Нью-Йорк и Коннектикут составляют 3–16 на 100 тысяч населения, активное выявление больных в очагах в Коннектикуте и северо-западном Висконсине увеличило эти показатели до 51–58 на 100 тысяч населения. Реальная интенсивность контактов с возбудителем значительно выше, чем заболеваемость, поскольку частота серопозитивных результатов к возбудителю ГАЧ в северо-западном Висконсине превышает 15 %, среди подвергшихся нападению клещей в Швеции – 15–20 %. От 75 до 85 % больных ГАЧ имеют в анамнезе нападение или присасывание иксодовых клещей за 7–11 дней до заболевания.

Средний возраст больных выше, чем при других клещевых инфекциях, и составляет в среднем от 44 до 60 лет. Соотношение мужчин и женщин среди заболевших составляет три к одному. Наибольшему риску подвергаются жители сельских районов, а также люди, содержащие собак. Большинство случаев в восточных районах США и в Европе выявляют в летние месяцы с пиком в июне-июле, что соответствует активности взрослых (имаго) клещей.

Экология возбудителя. Природная очаговость

Основным вектором возбудителя ГАЧ считают клещей группы *Ixodes ricinus* – *I. persulcatus* (рис. XV–XVII в цв. вкл.). *Anaplasma marginale* была выявлена в клещах *Boophilus microplus* с крупного рогатого скота в Тибете, гранулоцитарные анаплазмы были идентифицированы с помощью ПЦР и секвенирования в северо-восточных районах Китая, эндемичных по иксодовым клещевым боррелиозам, в клещах *Ixodes persulcatus* (Cao W. et al., 2000; Wen B. et al., 2003).

В процессе метаморфоза иксодовые клещи способны передавать анаплазмы трансфазо (от личинок к нимфам и от нимф к имаго), но не трансвариально (через яйца новому поколению клещей). Прокармливаясь на ранее инфицированных животных, незаражённые клещи становятся инфицированными и на последующей стадии могут передавать инфекционный агент другим млекопитающим.

На примере *A. marginale* было показано, что при питании на инфицированных хозяевах анаплазмы вначале проникают в эпителий кишечника клеща, где происходит первоначальная репликация патогена, который затем попадает в слюнные железы клеща, где также проникает в эпителиальные клетки. В эпителиальных клетках слюнных желёз анаплазмы подвергаются второму циклу репликации и попадают в секрет слюнных желёз при кормлении клеща на следующем позвоночном хозяине (Ueti M. et al., 2009). Помимо кишечника и слюнных желёз другие ткани клеща также могут быть инфицированы (de la Fuente J. et al., 2010).

Клещи, которые известны как специфические переносчики *A. phagocytophilum*, включают представителей *Ixodes persulcatus* комплекса (рис. XV–XXII в цв. вкл.): *I. scapularis* (восток Северной Америки), *I. pacificus* (западная часть Северной Америки), *I. ricinus* (Европа) и *I. persulcatus* (Восточная Европа, Азия). На востоке Северной Америки нимфы *I. scapularis*, которые инфицируются на стадии личинок при питании на содержащих в крови анаплазмы мелких млекопитающих, появляются поздней весной и ранним летом и питаются преимущественно на белоногих мышах (*Peromyscus*

leucopus), у которых наблюдается транзиторная или персистентная инфекция. Новое поколение личинок, которое появляется в середине лета, часто питается на уже содержащих в крови анаплазмы мелких млекопитающих, что поддерживает цикл циркуляции. Инфицированные нимфы и имаго клещей могут нападать и присасываться к людям, передавая им анаплазмы.

Поскольку иксодовые клещи могут передавать *A. phagocytophilum* трансфазово, но не трансвариально, наличие теплокровных – резервуара инфекции – играет важную роль в поддержании паразитарной системы.

На севере США основными резервуарными хозяевами *A. phagocytophilum* являются белоногие мыши (*Peromyscus leucopus*) и белохвостые олени (*Odocoiles virginianus*) (Telford S.T. III et al., 1996; Ravyn M. et al., 2001; Tate C. et al., 2005). С помощью серологических и молекулярных методов *A. Phagocytophilum* были обнаружены у большинства исследованных видов млекопитающих, включая древесных крыс, бурундуков, белок, кроликов и енотов (Foley J. et al., 2008a; Nieto N. and Foley J., 2008).

Олени играют важную роль как прокормители (хозяева) имаго *Ixodes spp.* и резервуар гранулоцитарных анаплазм. В Великобритании и на Европейском континенте в качестве резервуарного хозяина гранулоцитарных анаплазм рассматривают косуль *Capreolus capreolus*. Интересно, что лесные крысы *Neotoma spp.* и их паразиты *I. spinipalpis*, которые редко нападают на людей, также способны поддерживать отдельный энзоотический цикл этого возбудителя, что выявлено в нескольких южных штатах США.

Наблюдается диспропорция между относительно высокой инфицированностью переносчиков в очагах и небольшим числом описанных случаев ГАЧ (Petrovec M., Avsic Zupanc T., 2002), что может быть связано с гетерогенностью генетических и биологических свойств анаплазм. На одной территории могут циркулировать штаммы *A. phagocytophilum*, различающиеся по биологическим свойствам. В клещах *Ixodes scapularis* выявлены генетические варианты *Anaplasma phagocytophilum*, вызывающие и не вызывающие заболевания человека,

отличающиеся по патогенности для мышей (Massung R.F. et al., 2002).

Выявлены патогенный для людей вариант Ap-ha и непатогенный для людей вариант, названный Ap-Variant 1 (Courtney J. et al. 2003). Эти два варианта *A. phagocytophilum* различаются между собой двумя нуклеотидными заменами в гене 16S рРНК, а также по генам основных поверхностных белков (Courtney J. et al., 2003; de la Fuente J. et al., 2005).

Напротив, патогенные для людей штаммы *A. phagocytophilum* варианта Ap-ha могут инфицировать мышей, но не оленей (Reichard M. et al., 2009). Ap-Variant 1 был выявлен в природных биоценозах у белохвостых оленей; показана способность данного варианта экспериментально инфицировать коз и оленей, но не мышей, хомяков и песчанок (Massung R. et al., 2003, 2006). Следовательно, Ap-Variant 1 значительно менее вирулентен, чем европейские штаммы *A. phagocytophilum*, вызывающие анаплазмоз у крупного рогатого скота и овец, способен инфицировать только жвачных животных.

В целом, штаммы *A. phagocytophilum* из США отличаются от европейских штаммов по вирулентности для крупных животных. Так, вызываемый *A. phagocytophilum* анаплазмоз крупного рогатого скота широко распространён в Европе, но редко встречается в США. Было показано, что заражение крупного рогатого скота изолированным из лошадей Калифорнийским штаммом MRK не приводит к развитию инфекции (Pusterla N. et al., 2001).

На территории Европы бактерии *A. phagocytophilum* наиболее часто переносятся клещами *I. ricinus*, а на территории России и ряда стран Азии – клещами *I. persulcatus*.

На территории Европы *A. phagocytophilum* были выявлены молекулярными и серологическими методами во многих видах как крупных, так и мелких млекопитающих. Было показано, что дикие копытные, прежде всего благородные олени (*Cervus elaphus*), косули (*Capreolus capreolus*) и серны (*Rupicapra rupicapra*), играют важную роль в качестве резервуарных хозяев.

На территории Европы ДНК *A. phagocytophilum* была также выявлена в образцах от большинства исследованных видов

мелких млекопитающих, включая полёвок (*Myodes glareolus*, *Microtus arvalis*, *Mi. agrestis* и *Mi. oeconomus*), лесных мышей (*Apodemus sylvaticum*), желтогорлых мышей (*Ap. flavicollis*) и обыкновенных бурозубок (*Sorex araneus*) (Liz J. et al., 2000; Bown K. et al., 2003; Grzeszczuk A. et al., 2006; Hartelt K. et al., 2008).

В отличие от *I. ricinus*, личинки и нимфы *I. persulcatus* прокармливаются преимущественно на мелких и средних млекопитающих. Преимагинальные стадии развития клеща наиболее важны для сохранения *A. phagocytophilum* в трёхчленной паразитарной системе природного очага, поэтому в ареале *I. persulcatus* мелкие и средние млекопитающие являются наиболее существенными резервуарными хозяевами *A. phagocytophilum*. В России ДНК *A. phagocytophilum* была впервые обнаружена в образцах биоматериала от рыжих полёвок на Среднем Урале (Телфорд С. и др. 2002).

Изучение гранулоцитарного анаплазмоза человека в России

В России анаплазмы геногруппы ГАЧ были первоначально выявлены в клещах *Ixodes persulcatus* в Балтийском регионе (Дубинина Е.В., Алексеев А.Н., 1999; Alekseev A.N. et al., 2001), на Дальнем Востоке – в Приморском (Шпынов С.Н. и др., 2004) и Хабаровском (Медяников О.Ю. и др., 2001) краях. Гранулоцитарные анаплазмы выявлены в таёжных клещах на территории Пермской области, где ранее в этом виде переносчиков была выявлена *E. muris* (Ravyn M.D. et al., 1999). Гранулоцитарные анаплазмы выявлены также в Новосибирской области (Morožova O.V. et al., 2002) и Алтайском крае (Шпынов С.Н. и др., 2004).

В России диагноз ГАЧ впервые был поставлен в 2000 году в Хабаровском крае по наличию внутрицитоплазматических включений в нейтрофилах лихорадящего пациента и на основании серологических данных (Сидельников и др., 2003).

Случаи гранулоцитарного анаплазмоза у людей впервые были выявлены ретроспективно в Алтайском крае в 1999 году (Рудаков Н.В. и др., 2001) и в Новосибирской области

в 2002 году (Рудаков Н.В. и др., 2002). На территории Алтайского края на фоне роста заболеваемости клещевым риккетсиозом (сибирским клещевым тифом) часть случаев серонегативного «клещевого риккетсиоза» была нами верифицирована с использованием реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) как гранулоцитарный анаплазмоз. Случаи ГАЧ в Новосибирской области протекали более тяжело, часто на фоне описторхоза.

В дальнейшем в образцах крови пациентов из различных регионов России, госпитализированных после присасывания клещей, были выявлены антитела к возбудителю ГАЧ. Антитела к гранулоцитарным анаплазмам были обнаружены в образцах крови пациентов из Иркутской, Ярославской областей, Алтайского и Пермского краёв (Афанасьева М.В. и др., 2006; Борисов В.А. и др., 2010; Оберт А.С. и др., 2009; Самаров М.Н., 2009; Щучинова Л.Д., 2009), кроме того, ДНК *A. phagocytophilum* была выявлена в крови пациента на территории Пермского края (Нефедова и др., 2008).

ГАЧ в ряде случаев был диагностирован в виде микст-инфекций с КЭ, МЭЧ, но чаще всего с ИКБ (Тетерин В.Ю. и др., 2012). В Ярославской области антитела к ГАЧ были обнаружены у 40 % пациентов, госпитализированных с манифестными формами иксодового клещевого боррелиоза, при этом титр антител к ГАЧ в ряде случаев достигал 1:1600 – 1:6400 (Алешковская Е.С. и др., 2008).

Можно считать достаточно вероятным распространение возбудителя ГАЧ в России в пределах всего ареала клещей *Ixodes persulcatus* с возможными эпидемическими проявлениями очагов этой инфекции. Несомненна необходимость дифференциации случаев ГАЧ от других распространённых клещевых инфекций – прежде всего с клещевым энцефалитом (КЭ), иксодовыми клещевыми боррелиозами (ИКБ) и клещевыми риккетсиозами (КР), особенно учитывая наличие микстных форм.

На большинстве эндемичных территорий у больных после присасывания иксодовых клещей чаще выявляют антитела к возбудителю ГАЧ, антитела к МЭЧ выявляются реже.

Патогенез и патологическая анатомия

После присасывания клеща возбудитель со слюной попадает в кожу, подкожную клетчатку и гематогенно распространяется по всему организму.

Anaplasma phagocytophilum отличается узкоспецифическим тропизмом к нейтрофилам. Установлен лиганд PSGL-1, который анаплазма использует для первичного связывания с клеткой-мишенью. Этот рецептор нейтрофилы используют для адгезии на эндотелиальных клетках при развитии воспалительной реакции (Herron M.J. et al., 2000).

При взаимодействии с нейтрофилом *Anaplasma phagocytophilum* сначала связывается с клеточным рецептором, затем интернализируется путём рецепторного эндоцитоза. В дальнейшем происходит размножение возбудителя в эндосоме, лизис эндосомы, выход возбудителя с гибелью клетки. В инфицированной клетке происходит угнетение фагоцитоза, снижение концентрации активного кислорода, то есть нейтрофилы перестают выполнять свои защитные функции (Hayes S.F. et al., 2005).

Взаимодействие возбудителя с нейтрофилом сопровождается мощной цитокиновой реакцией (интерлейкин-1, интерлейкин-6, интерлейкин-8, альфа-фактор некроза опухоли). *Anaplasma phagocytophilum* индуцирует синтез цитокинов за счёт рецепторного сигнала посредством воздействия на toll-like рецептор TLR-2 (Von Loewenich F.D. et al., 2000).

В организме человека цитокины синтезируются раньше, чем появляются первые антитела, и играют роль первичной защиты организма. Именно цитокины обуславливают такие клинические проявления анаплазмоза, как лихорадка, миалгии, артралгии (Ohashi N. et al., 2013). Наибольшее значение в патогенезе анаплазмоза отводится интерлейкину-8 (ИЛ-8). Повышение концентрации ИЛ-8 угнетает продукцию гематопоеза. В период реконвалесценции повышается концентрация ИЛ-10 (Rikihisa Y. et al., 2010).

Гистологические изменения в организме человека описаны на основании четырёх летальных случаев анаплазмоза. На аутопсии выявляется лимфоидное перерождение селезёнки,

скопление макрофагов в печени, апатоз клеток, лимфоидная инфильтрация костного мозга. У некоторых погибших выявляли признаки пневмонии и миокардита. Как следствие снижения функции нейтрофилов, наблюдались вторичные инфекции многих органов и систем (иммунодефицит вследствие нейтропении) [Lepidi H. et al., 2000].

При тяжелом течении болезни особенно выражены периваскулярная инфильтрация лимфогистиоцитами, нарушение проницаемости сосудов и геморрагии во внутренних органах (Pozdnyakova O., Dorfman D.M., 2012).

Клиническая картина

Код по МКБ-10.

A79.8. Другие уточнённые риккетсиозы.

Клинические особенности подробно описаны в монографии В.И. Злобина с соавт. (2015). Клиническая классификация. Заболевания разделяют по степени тяжести на субклинические, лёгкие, средней степени тяжести, тяжёлые (Инфекционные болезни, 2009).

Первые случаи заболевания были описаны в США в 1994 году как острые лихорадочные заболевания с серьёзным прогнозом. Заболевание характеризовалось высокой лихорадкой, миалгиями, артралгиями, головной болью, часто сопровождалось тромбоцитопенией и лейкопенией (Bakken J.S. et al., 1994).

Инкубационный период, от момента присасывания клеща до начала клинических проявлений, варьирует от двух дней до трёх недель, в среднем составляя от 5 до 10 дней. Тяжесть течения болезни варьирует от бессимптомных стёртых форм до тяжёлых и с формированием полиорганной недостаточности и летальных исходов.

Клиника гранулоцитарного анаплазмоза человека очень разнообразна: от лёгких, субклинических форм до крайне тяжёлых, летальных случаев. Ни особенности возбудителя, ни преморбидный фон, ни иммунный статус больного не позволяют достоверно прогнозировать тяжесть течения начавшейся болезни (Aguero-Rosenfeld M.E. et al., 1996).

В начале заболевания симптомы неспецифичны. Отмечают острое начало с потрясающего озноба, повышения температуры до 39–40 °С. У больных появляется сильная головная боль, боли в мышцах, суставах, общая слабость, у части больных тошнота и рвота. При осмотре лицо гиперемировано, склеры склер инъецированы. Часто встречаются гриппоподобные симптомы, но ринореи не наблюдается. Лимфаденопатия, как правило, не развивается. Характерны летучие артралгии, но артриты в отличие от Лайм-боррелиоза не развиваются. На ранних этапах болезни можно обнаружить кашель, боли в груди, пневмонию. Печень и селезёнка увеличены, у отдельных больных может быть субиктеричность склер, в анализах отмечается повышение уровня билирубина и печёночных трансаминаз (Bakken J.S., Dumler S., 2008; Тетерин В.Ю. и др., 2012).

Наличие эритемы или сыпи не характерно для гранулоцитарного анаплазмоза человека, хотя малозаметная макулопапулёзная сыпь бывает у некоторых больных. Сыпь наблюдается примерно у 20 % больных. Она появляется в течение первой недели заболевания, локализуется по всему телу, исключая ладони и подошвы. Возможно также развитие эритематозной, папулёзной и петехиальной сыпи (Борисов В.А. и др., 2010; Vanicek J. et al., 2013).

В лёгких и среднетяжёлых случаях наблюдается спонтанное выздоровление, даже без лечения. У больных с отсутствием селезёнки заболевание протекает тяжелее, отмечается более высокая частота инфицирования нейтрофилов, постинфекционных осложнений (Лобан К.М. и др., 2002).

Лихорадочный период составляет 3–11 недель. Осложнения обычно обусловлены вторичной инфекцией. Чаще других встречается пневмония, миокардит, перикардит, почечная недостаточность. После перенесённой инфекции формируется стойкий иммунитет (Анисько Л.А. и др., 2012).

Диагноз и дифференциальная диагностика

В общем анализе крови обнаруживают тромбоцитопению (в 75 % случаев) и лейкопению (25 %), реже наблюдают анемию, повышение печёночных трансаминаз, щелочной фосфата-

зы, лактатдегидрогеназы и С-реактивного белка (Goodman J.L. et al., 2005). Примерно у 40 % больных наблюдаются изменения в общем анализе мочи: протеинурия, лейкоцитурия.

Диагностика осуществляется на основании клинико-эпидемиологических и лабораторных данных. Учитывают эпидемиологические предпосылки (пребывание в эндемичной местности, присасывания клеща), а также клинические признаки: симптомы интоксикации, сыпь.

Дифференцировать ГАЧ необходимо с многими заболеваниями, протекающими с лихорадкой, экзантемами, в том числе с природно-очаговыми трансмиссивными инфекциями, переносимыми клещами (клещевой энцефалит, клещевые риккетсиозы, болезнь Лайма, туляремия, бабезиоз, моноцитарный эрлихиоз человека, эрлихиоз, вызванный *E. ewingi*) (Афанасьева М.В. и др., 2006).

Лечение и прогноз

Доксициклин эффективен при ГАЧ (Maurin M.J. et al., 2003: табл. 2). In vitro *A. phagocytophilum* чувствительна к тетрациклинам, рифампицину, новым фторхинолонам (левофлоксацин, цiproфлоксацин), малочувствительна к офлоксацину и цiproфлоксацину, нечувствительна к бета-лактамам антибиотикам (амоксциллин, ампициллин, цефтриаксон, имипен), макролидам (эритромицин, азитромицин, кларитромицин), аминогликозидам (амикацин, гентамицин), клиндамицину, сульфаниламидам (Goodman J.L. et al., 2005).

Приоритетность назначения доксициклина определяется и тем, что многие другие возбудители инфекционных заболеваний, переносимых клещами, чувствительны к тетрациклину (доксициклину). Правильное назначение выбранного препарата важно в период отсутствия лабораторного подтверждения этиологии заболевания. Доксициклин эффективен не только в отношении *A. phagocytophilum*, но также *Borrelia burgdorferi*, большинства риккетсий, анаплазм, спирохет. Исключение составляют бабезии, которые не чувствительны к тетрациклинам и поддаются терапии клиндамицином и хинином (Анисько Л.А. и др., 2008). При использовании антибиотика, действующего на *Anaplasma phagocytophilum*, наблюдается быстрое улучшение

ние самочувствия больного: температура нормализуется в течение 24–48 часов, быстро происходит регресс симптомов. При отсутствии эффекта необходимо исключить микст-инфекцию (вирусные инфекции, переносимые клещами; бабезиоз) и вторичные бактериальные осложнения.

Таблица 2

**Препараты выбора при антимикробной терапии
гранулоцитарного анаплазмоза человека**

<i>Категория пациентов</i>	<i>Основной препарат</i>	<i>Препарат резерва</i>
Взрослые, дети старше восьми лет	Доксициклин 100 мг два раза в сутки, семь дней; микст-инфекция с Лайм-боррелиозом – 14 дней	Рифампицин 300 мг два раза в сутки или левофлоксацин 500 мг в течение семи дней
Дети до восьми лет, тяжёлое течение заболевания	Доксициклин 4 мг/кг веса в сутки в течение семи дней	Рифампицин 10 мг/кг веса в сутки в течение семи дней
Дети до восьми лет, лёгкое среднетяжёлое течение	Рифампицин 10 мг/кг веса в сутки в течение семи дней	Доксициклин 4 мг/кг веса в сутки в течение семи дней
Беременные женщины, тяжёлое течение	Доксициклин 100 мг два раза в день в течение семи дней	
Беременные женщины, лёгкое среднетяжёлое течение	Рифампицин 300 мг два раза в сутки	

Патогенетическая терапия проводится дезинтоксикационными растворами, антигистаминными и противовоспалительными препаратами. Возможно дополнительное назначение глюкокортикоидных гормонов. Около семи процентов больных может потребоваться интенсивная терапия (Тетерин В.Ю. и др., 2012). Прогноз благоприятный, летальность менее 1 %.

Лабораторная диагностика и профилактика описаны в разделе «Анаплазмозы и эрлихиозы».

ДРУГИЕ АНАПЛАЗМОЗЫ

Анаплазмозы животных, вызываемые внутриэритроцитарными анаплазмами

Три вида из рода *Anaplasma*: *A. marginale*, *A. centrale* и *A. ovis* – являются внутриэритроцитарными патогенами диких и домашних копытных животных. Болезнь распространена во всех частях света и наносит животноводству значительный экономический ущерб в результате резкого снижения продуктивности и гибели крупного рогатого скота (Казаков Н.А., 2003; Красиков А.П., Рудаков Н.В., 2013).

A. marginale, типовой вид рода *Anaplasma*, является инфекционным агентом анаплазмоза крупного рогатого скота (КРС), широко распространённого в тропических и субтропических зонах. Симптомы заболевания у КРС включают лихорадку, потерю веса, желтуху, часто смерть у молодых животных. Во время острой стадии заболевания до 70 % эритроцитов может быть инфицировано.

Основным переносчиком *A. marginale* являются клещи *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, кроме того, ещё около 20 видов клещей являются переносчиками *A. marginale*. *A. marginale* могут передаваться животным также через укусы двукрылых насекомых и механически – через загрязнённые инструменты (Kocan K. et al., 2010).

Генетическая вариабельность штаммов *A. marginale* была изучена путём сравнения нуклеотидных последовательностей генов основных поверхностных белков (MSP) – MSP1a и MSP4, которые участвуют во взаимодействии с клетками позвоночных и беспозвоночных хозяев. Кодированный геном *msp1a* белок MSP1a выявлен только у *A. marginale*. Показано, что белок MSP1a вовлечён в адгезию бычьих эритроцитов и клеток клещей, а также в перенос *A. marginale* клещами; функции белка MSP4 не установлены (de la Fuente J. et al. 2010).

Белок MSP1a – более вариабельный, чем MSP4. Штаммы *A. marginale* отличаются по числу копий и последовательностям N-концевых tandemных повторов в белке MSP1a. Различные последовательности *msp1a* и *msp4* генов были выявлены в

штаммах из одного и того же эндемичного района, более того, разные генотипы были обнаружены у животных с одной фермы во время вспышки анаплазмоза (Almazán C. et al., 2008).

A. centrale, филогенетически близкий к *A. marginale*, часто рассматривают как подвида *A. marginale* – *A. marginale subsp. centrale*. Вызываемый *A. centrale* клинически «мягкий» анаплазмоз КРС приводит к формированию напряжённого протективного иммунитета против заражения высоковирулентными штаммами *A. marginale*. Таким образом, *A. centrale* является природно аттенуированным вариантом *A. marginale*, который используется в качестве живой вакцины в течение ста лет (Kocan K. et al., 2010).

A. ovis вызывает анаплазмоз у овец, коз и диких копытных. Клеши *Dermacentor* spp. являются основными переносчиками *A. ovis* на западе США. Генетическое разнообразие *A. ovis* изучено недостаточно. Так же, как и у других видов анаплазм, ген *msp4*, кодирующий белок из суперсемейства MSP2, обычно используется для анализа генетического разнообразия. Семь различных генотипов *A. ovis* по гену *msp4* было идентифицировано у домашних овец, оленей и снежных баранов на западе США и на Сицилии. При этом разные генотипы были характерны для США и Сицилии (de la Fuente J. et al., 2007).

Анаплазмоз, вызываемый *Anaplasma bovis*

A. bovis вызывают инфекцию у крупного рогатого скота и буйволов на территории Африки, Южной Америки и Азии, а также у оленей на территории Японии и Южной Кореи (Dumler J. et al., 2001; Kawahara M. et al., 2006; Lee M. et al., 2009). Тяжесть заболевания варьирует от бессимптомного носительства до острых лихорадок, которые могут приводить к смерти. *A. bovis* инфицируют мононуклеарные клетки крови; до настоящего времени данный возбудитель не был культивирован *in vitro*.

Показано, что специфичными переносчиками *A. bovis* являются клещи *Amblyomma variegatum* и *Rhipicephalus appendiculatus* на территории Африки и *Hyalomma* spp. в Иране.

С помощью молекулярных методов ДНК *A. bovis* и *A. bovis-like* бактерий была обнаружена в клещах *Haemaphysalis longicornis* в Корее, Китае и Японии, в *Haemaphysalis lagrangei* в Таиланде и в *Haemaphysalis concinna* на Дальнем Востоке России (Dumler J. et al., 2001; Kim C. et al., 2003; Parola P. et al., 2003; Шпынов С.Н. и др., 2004; Kawahara M. et al., 2006; Shpynov S. et al., 2006).

Анаплазмоз, вызываемый *Anaplasma platys*

A. platys, инфекционный агент тромбоцитопении у собак, является единственным видом порядка *Rickettsiales*, основными клетками-мишенями для которого являются тромбоциты. Бактерии *A. platys* до настоящего времени не были культивированы *in vitro*. Основными переносчиками *A. platys* являются клещи *Rhipicephalus sanguineus*. Случаи инфекции отмечены на территории США, Европы и Тайваня (Dumler J. et al., 2001; Motoi Y. et al., 2001; Pinyoowong D. et al., 2008; Cardoso L. et al., 2010). Чаще всего заболевание протекает относительно легко, однако оно может приводить к смерти животных из-за нарушения свёртываемости крови при кровотечениях в результате несчастных случаев или операции.

Сравнение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК штаммов *A. platys* от собак показало, что последовательности *A. platys* образуют отдельный кластер на филогенетическом дереве с уровнем гомологии по гену 16S рРНК не менее чем 99,3 % (Pinyoowong D. et al., 2008).

Другие виды клещей также могут переносить *A. platys*. В Корее ДНК *A. platys* была обнаружена в клещах *H. longicornis* и *I. persulcatus*, а также в грызунах (Kim C. et al., 2006). Отдельный генетический вариант *A. platys* (99,3 % гомологии по гену 16S рРНК) был выявлен на территории Таиланда в крови собак и собранных с них клещах *D. auratus* (Parola P. et al., 2003).

ДРУГИЕ ЭРЛИХИОЗЫ

Род *Ehrlichia* включает в себя пять видов. Бактерии трёх видов: *E. canis*, *E. ewingii* и *E. chaffeensis* – способны вызывать инфекцию как у собак, так и у людей, *E. muris* являются патогеном мышевидных грызунов и может вызывать МЭЧ у людей в Евразии, а *E. ruminantium* вызывают тяжёлую инфекцию у жвачных животных и, вероятно, летальные МЭЧ-энцефалиты у детей в ЮАР.

Эрлихиоз, вызываемый *Ehrlichia canis*

E. canis инфицируют моноциты и являются основным инфекционным агентом моноцитарного эрлихиоза собак. По сравнению с другими видами эрлий, *E. canis* вызывают наиболее тяжёлые формы заболеваний у собак, что может приводить к летальному исходу. Моноцитарный эрлихиоз собак распространён в различных регионах мира, включая многие страны Африки, Азии, Европы, США (Цачев И.Ц., Димов И.Д., 2011).

Специфическими переносчиками для *E. canis* являются клещи *R. sanguineus* и *D. variabilis*, а резервуарными хозяевами – домашние собаки и дикие псовые. Инфекция, вызванная *E. canis*, широко распространена в мире, особенно в тропических и субтропических зонах (Skotarczak B., 2003; Cardoso L. et al., 2010). Заболевание у собак имеет три стадии: острую, характеризующуюся острой лихорадкой, потерей веса, тромбоцитопенией и лейкопенией; субклиническую, длящуюся от нескольких месяцев до года и более; хроническую, напоминающую по симптомам первую стадию. Следует отметить, что инфицированные *E. canis* собаки остаются носителями данного возбудителя в течение всей жизни, даже после проведённого лечения антибиотиками (Skotarczak B., 2003).

Случаи эрлихиозов у людей, вызванных *E. canis*, отмечены только в Венесуэле. Впервые штамм *E. canis*, названный VNE, был изолирован из крови человека с субклинической формой инфекции в 1996 году (Perez M. et al., 1996). Впоследствии ДНК *E. canis* была обнаружена в образцах крови у лихо-

радящих пациентов с клиническими симптомами, характерными для эрлихиозов: сыпь, суставные, мышечные и головные боли (Perez M. et al., 2006).

Сравнение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК показало, что последовательности от штаммов, изолированных от человека и от больной собаки, идентичны друг другу и последовательностям, определённым в образцах крови лихорадящих пациентов, больных собак и клещей *R. sanguineus*. Это подтверждает, что для патогенного для людей штамма *E. canis* резервуарными хозяевами являются собаки, а специфическими переносчиками – клещи *R. sanguineus* (Unver A. et al., 2001; Perez M. et al., 2006). Следовательно, *E. canis* может рассматриваться как вероятный патоген человека в эндемичных для эрлихиозов собак регионах.

Сравнение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК *E. canis* из различных частей света показало, что уровень гомологии между различными последовательностями составил не менее 99,6 %, при этом идентичные последовательности были выявлены в географически отдалённых регионах. Сравнение нуклеотидных последовательностей генов *gp19* и *gp36*, кодирующих антигенные белки, показало, что все проанализированные последовательности подразделяются на два кластера. При этом определённые последовательности *E. canis* из Тайваня относились к первому кластеру, а все последовательности из других стран – ко второму. Интересно, что как и в случае с *A. phagocytophilum*, нуклеотидные последовательности изолятов *E. canis* из США образовывали отдельную ветвь во втором кластере (Hsieh Y. et al., 2010). Таким образом, была показана кластеризация образцов *E. canis* в зависимости от географического региона.

Эрлихиоз, вызываемый *Ehrlichia ewingii*

В 1971 году Ewing с соавторами выявили новый штамм эрлихий, который в отличие от штаммов *Ehrlichia canis*, поражающих лимфоциты и моноциты, поражал гранулоциты и был назван «собачья гранулоцитарная эрлихия *Canine Granulocytic Ehrlichia*» (Ewing S.A. et al., 1971). *E. ewingii* была

признана как отдельный вид, вызывающий эрлихиоз у собак, в 1992 году (Anderson B. et al. 1992). Позднее, в результате ретроспективного исследования образцов крови людей с симптомами, характерными для эрлихиоза, была показана способность *E. ewingii* вызывать эрлихиоз у людей (Buller R. et al., 1999). До настоящего времени известно лишь несколько десятков случаев эрлихиозов людей, вызванных *E. ewingii*, и все эти случаи зарегистрированы в США (MMWR, 2009).

В отличие от других видов эрлихий *E. ewingii* инфицируют гранулоциты. Как правило, *E. ewingii* вызывают более мягкие формы заболеваний у собак и людей по сравнению с инфекциями, вызванными *E. canis* и *E. chaffeensis*. В большинстве случаев заболевания были отмечены у пациентов со сниженным иммунитетом – у ВИЧ-инфицированных или у пациентов, перенёсших трансплантацию органов.

В США основным переносчиком *E. ewingii* являются клещи *A. americanum*, кроме того, данные возбудители были выявлены в *D. variabilis* и *R. sanguineus*. Основными резервуарными хозяевами являются белоногие олени и собаки (Nicholson W. et al., 2010).

Эрлихиоз, вызываемый *Ehrlichia ruminantium*

E. ruminantium у животных инфицируют эндотелиальные клетки кровеносных сосудов (в том числе в мозге), нейтрофилы и макрофаги и способны размножаться в клеточных линиях, происходящих как от эндотелиальных клеток, так и от макрофагов (Dumler J. et al., 2001). *E. ruminantium* вызывают у крупного рогатого скота и овец в эндемичных районах Южной Африки и бассейна Карибского моря тяжёлую инфекцию – водянку сердца. Среди заболевших овец и коров доля смертельных исходов достигала 80 %.

E. ruminantium переносится клещами рода *Amblyomma*, для десяти видов клещей этого рода показана способность являться специфическими переносчиками. Область распространения инфекции совпадает с ареалом клещей-переносчиков. Резервуарными хозяевами для *E. ruminantium* могут служить

различные виды домашних и диких жвачных животных (Allsopp B., 2010).

Имеются данные об *E. ruminantium* как этиологическом агенте, вызывающем в Южной Африке (Претория) преимущественно у детей от 4 до 7 лет случаи быстро развивающегося энцефалита, заканчивающегося летально. Случаи подтверждены с помощью ПЦР-секвенирования материалов (проб мозга) от погибших (Allsopp MTEP et al., 2005; Louw M. et al., 2005).

В 2006 году генетический вариант эрлихий, схожий с *E. ruminantium*, был выявлен в США в районе гор Панола (Panola Mountain). Новый геновариант «РМ» *Ehrlichia* sp. переносится клещами *Am. americanum* и вызывает мягкую лихорадку у экспериментально инфицированных коз (Loftis A. et al., 2006). Позднее РМ *Ehrlichia* sp. были обнаружены в *Am. americanum* на территории десяти штатов США.

Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК различных штаммов *E. ruminantium* показал, что последовательности *E. ruminantium* образуют единый кластер на филогенетическом дереве и что генетический вариант РМ *Ehrlichia* sp. принадлежит к этому кластеру. Уровень гомологии между последовательностями гена 16S рРНК *E. ruminantium* и РМ *Ehrlichia* sp. составил 99,2 %. Анализ нуклеотидных последовательностей других генов, таких как *gltA*, *map1*, *map2* и рибонуклеазы III, подтвердил, что генетический вариант РМ *Ehrlichia* sp. является близкородственным с *E. ruminantium* и может являться либо штаммом *E. ruminantium*, либо отдельным близкородственным видом (Loftis A. et al., 2006).

Новые генетические варианты эрлихий

Помимо охарактеризованных видов эрлихий в последнее время ряд новых генетических вариантов *Ehrlichia* spp. был выявлен молекулярными методами в иксодовых клещах и у млекопитающих, однако их таксономическое положение окончательно не определено. Как правило, различные генетические группы *Ehrlichia* spp. ассоциированы с определёнными видами клещей-переносчиков или резервуарных хозяев.

Отдельную группу эрлихий составляют филогенетически близкие генотипы *Ehrlichia* sp. Tibet, *Ehrlichia* sp. strain EВm 52 и *Ehrlichia* sp. Fujian, выявленные в клещах *R. microplus*, снятых с крупного рогатого скота в Тибете, Таиланде и Китае. Эти генетические варианты различались между собой 2–4-нуклеотидными остатками по гену 16S рРНК: 99,7–99,9 % гомологии (Wen et al., 2002; Parola P. et al., 2003; Jiang B. et al., 2011). Эрлихии из этой группы также близки (99,2 % гомологии) с эрлихиями *Ehrlichia* sp. Erm 58 и *Ehrlichia* sp. Eht 224, выявленными в прокармливающихся на крупном рогатом скоте африканских клещах *Rhipicephalus muthsanae* и *Hyalomma truncatum* (Parola P. et al., 2001).

В клещах *I. ovatus* в Японии были выявлены HF штаммы эрлихий, вызывающие летальную инфекцию у иммунокомпетентных лабораторных мышей. Эти протеобактерии инфицируют моноциты и кровеносные сосуды различных органов, включая селезёнку, печень и тимус. Все шесть проанализированных HF-штаммов были идентичны на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и аминокислотных последовательностей GroEL белка (Shibata S. et al., 2000).

Генетические варианты эрлихий, филогенетически схожие с HF штаммами, были обнаружены в *I. ovatus* в различных частях Японии (Inokuma et al., 2007), а также в мышах *Ap. argenteus*, *Ap. speciosus* и *Eothenomys smithi* (Naitou et al., 2006; Tabara et al., 2007) и в крови больной собаки (Inokuma H. et al., 2001).

Ещё один генетический вариант эрлихий, первоначально названный *Ehrlichia* sp. TS37, был обнаружен в Японии в клеще *H. longicornis* и в оленях (*Cervus nippon nippon*). Изученные нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК ДНК эрлихий в клещах и оленях были практически идентичны друг другу (99,9 % гомологии). Было предложено назвать этот кластер бактерий «*Candidatus Ehrlichia shimanensis*» (Kawahara M. et al., 2006). Кроме того, новые генетические варианты эрлихий были обнаружены молекулярными методами в клещах *I. granulatus* в Японии (Takano A. et al., 2009), *I. ricinus* во Франции (Matsumoto K. et al., 2007), *H. longicornis* в Корее (GenBank GU075695 и GU075696) и в *Haemaphysalis* spp., снятых с собак в Японии (Inokuma H. et al., 2004).

РОДА *NEORICKETTSIA* и *WOLBACHIA*

В состав рода **Neorickettsia** включены *Neorickettsia sennetsu*, *Neorickettsia risticii*, *Neorickettsia helminthoeca*, *Stellantischisma falcatus* (SF) agent, *N. elokominica*. Из них только *Neorickettsia sennetsu* вызывает заболевание у людей — лихорадку сеннетсу.

Лихорадка сеннетсу

Эта инфекция встречается на южных островах Японии (Кюсю, Сикоку), известна под различными названиями (эпидемический инфекционный мононуклеоз, железистая лихорадка) с 1880 года. В 1915 году отмечена вспышка в префектуре Кумамото (остров Кюсю). Этиологический агент был выделен из крови, лимфатических узлов и костного мозга больных и описан как «риккетсия» *R. sennetsu* в 1953–1956 годах (Misao T. and Kobayashi Y., 1955; Fukuda T. et al., 1954; Fukuda T., 1958 и др.). Его можно культивировать на культурах макрофагальных или эпителиальных клеток, в организме белых мышей при внутрибрюшинном заражении (накопление в перитонеальных макрофагах, в селезёнке).

По морфологии неориккетсии, как и другие представители семейства *Anaplasmataceae*, представляют мелкие кокковидные или овоидные микроорганизмы, имеющие тёмно-голубой или пурпурный цвет при окраске по Романовскому-Гимза. Они выявляются в вакуолях (эндосомах) клеток моноцитарного ряда в виде компактных скоплений, по конфигурации напоминающих ягоды тутового дерева и называемых «морулы».

Заболевания лихорадкой сеннетсу связаны с употреблением в пищу термически не обработанной рыбы. Предполагается заражение человека и собак через метацеркарии трематод лососевых рыб.

Попадание *N. sennetsu* через рот с входными воротами инфекции в области рта и глотки приводит к увеличению заднешейных и заднеушных лимфатических узлов на пятый-седьмой дни болезни с последующей генерализацией инфекционного процесса с поражением костного мозга, лейкопенией

и лимфаденопатией. Для лихорадки сеннетсу наиболее характерны: лихорадка с подъёмом температуры до 38–39 °С, генерализованная лимфаденопатия, повышенное содержание моноцитов в крови. В ряде случаев отмечают гепатоспленомегалию и увеличение уровня печёночных ферментов – аспаратаминостраниферазы и аланинаминотрансферазы.

Окончательный диагноз определяют с учётом клинических и эпидемиологических данных с серологическим исследованием сывороток крови больных и реконвалесцентов в реакции непрямой иммунофлюоресценции со специфическим корпускулярным антигеном. Лечение проводят препаратами тетрациклинового ряда, прогноз благоприятный.

Лихорадка Потомак

Лихорадка лошадей Потомак впервые выявлена у лошадей в 1979 году на пастбищах вдоль реки Потомак, далее – во многих регионах, преимущественно в США и Канаде. *Neorickettsia risticii* – возбудитель лихорадки лошадей Потомака – найден в трематодах пресноводных улиток. Трематоды (*Pleuroceridae: Juga* spp.) имеют пять личиночных стадий в жизненном цикле: мирацидиум, спороцисты, редии, церкарии, метацеркарии. Улитки являются первыми промежуточными хозяевами трематод, в которых спороцисты развиваются в редии и церкарии. Вторыми промежуточными хозяевами, в которых выявляют метацеркарии нематод, инфицированные *N. risticii*, являются водные насекомые. Основные хозяева этой неориккетсии – лошади и собаки, у которых возбудитель поражает моноциты, энтероциты, тучные клетки. Предполагается природный цикл *N. risticii* с заражением основного хозяина через метацеркарии трематод из сырой рыбы и пресноводных улиток. У лошадей лихорадка Потомак проявляется лихорадкой, депрессией, анорексией, водянистой диареей, дегидратацией, коликами, лейкопенией. Выявлено наличие перекрёстных антител к *N. sennetsu*. Патогенность *N. risticii* для человека не установлена.

Другие инфекции, вызываемые неориккетсиями

Neorickettsia helminthoeca вызывает тяжёлое, часто летальное, заболевание собак, называемое «salmon poisoning» (отравление лососевыми рыбами). Это острое инфекционное заболевание, при котором инфекционный агент передаётся через различные стадии трематод в их жизненном цикле, включающем улитки, рыбу и собак. Жизненный цикл *Neorickettsia helminthoeca* поддерживается выделением инфицированных яиц трематод с фекалиями хозяина-млекопитающего. Заражённые мирацидии (*miracidia*) развиваются из этих яиц и заражают улиток *Juga plicifera* и *Julia silicula*, где формируют инфицированные редии (*rediae*). Редии развиваются в инфицированные церкарии, которые освобождаются от улитки, проникают в лосось или форель и развиваются в метацеркарии, инфицированные *Neorickettsia*. Цикл завершается, когда млекопитающие едят рыбу, а зараженные *метацеркарии* становятся зараженными взрослыми трематодами и передают неориккетсии в яйца. Хотя инфекция собак не требуется для жизненного цикла *Neorickettsia*, для поддержания жизненного цикла трематод требуется инвазия млекопитающих.

Заражение теплокровных животных происходит за счёт метацеркарий трематод *Nanophyetus salmincola*, паразитирующих в лососевых рыбах. Основной мишенью для *N. helminthoeca* у собак являются макрофаги. Инфекция выявлена в США (Северная Калифорния, Вашингтон, Орегон, Идахо).

N. elokominica вызывает «Elokomín fluke fever», поражающую преимущественно собак. Основной беспозвоночный хозяин – трематоды, у которых *N. elokominica* передается трансовариально. У собак эта неориккетсия инфицирует макрофаги. Инфекция выявлена в США (штат Вашингтон).

Род *Wolbachia*

Микроорганизмы, которые передаются от одного поколения к другому через своих хозяев (то есть наследуемые микроорганизмы), широко распространены среди животных. Они,

как правило, наследуются через цитоплазму их хозяев. Но существуют и другие механизмы передачи. Взаимодействия наследуемых микроорганизмов со своими хозяевами варьируются от мутуалистических (полезных) до паразитических. Растёт количество доказательств того, что наследуемые микроорганизмы чрезвычайно важны для эволюции. Наиболее известным наследуемыми микроорганизмами являются эндосимбионты рода *Wolbachia*. Эта удивительная группа внутриклеточных риккетсиальных микроорганизмов развивалась как репродуктивные паразиты членистоногих. Эти бактерии представляют особый интерес, поскольку они могут вызывать быстрое видообразование у их хозяев, и также имеют потенциальную ценность для биологического контроля насекомых-вредителей.

Wolbachia spp. впервые описали в 1924 году Маршалл Хертиг (Hertig M.) и Симеон Бурт Вольбах (Wolbach S. B.) как риккетсиоподобные микроорганизмы, инфицирующие яичники комаров *Culex pipiens* комплекса (Hertig M., Wolbach S.B., 1924). В 1936 году Hertig назвал микроорганизм *Wolbachia pipiens* в честь Wolbach S.B. (Hertig M., 1936). В 1971 году Иен и Барр обнаружили, что *Wolbachia* spp. вызывают несовместимость в скрещиваниях между инфицированными самцами и неинфицированными самками комаров *Culex pipiens* (Yen J.H., Barr A.R., 1971). В дальнейшем, особенно с развитием молекулярно-биологических методов, оказалось, что вольбахии вызывают различные модификации репродукции и поражают не только комаров.

Представители этого рода наиболее распространены по сравнению с другими родами семейства *Anaplasmataceae*. Вольбахии известны как внутриклеточные симбионты насекомых, арахнид, ракообразных и нематод. Эти эндосимбионты – альфапротеобактерии – передаются вертикально через яйцеклетки хозяина и изменяют биологию хозяина различными способами. Внутри членистоногих *Wolbachia* является репродуктивным паразитом, манипулируя репродуктивной биологией хозяев для увеличения собственной передачи. Хотя *Wolbachia*, как правило, передаётся по вертикали, также может

перемещаться горизонтально между видами хозяев, что приводит к их широкому и глобальному распространению у разных беспозвоночных хозяев. От 15 до 30 % видов насекомых содержат *Wolbachia* spp. По недавним оценкам (Werren J.N. et al., 2008) более половины видов насекомых могут заключать в себе вольбахий, что делает последних самым крупным родом внутриклеточных бактерий.

Морфологические особенности

Вольбахии – грамтрицательные бактерии палочковидной или кокковидной формы, варьируют в размере от 0,5 до 1,4 мкм и окружены трёхслойной оболочкой (рис. 8, а). Во всех типах клеток вителлярия яичников обнаружены *Wolbachia*, тесно контактирующие с округлыми электронно-плотными тельцами, расположенными под наружной оболочкой бактерий (рис. 8, б, в). Такие тельца диаметром 0,2–0,5 мкм имеют более плотный, чем у бактерий, гомогенный матрикс и покрыты двойной оболочкой. Можно предположить, что эти структуры представляют покоящуюся форму *Wolbachia* (Жукова М.В., 2011).

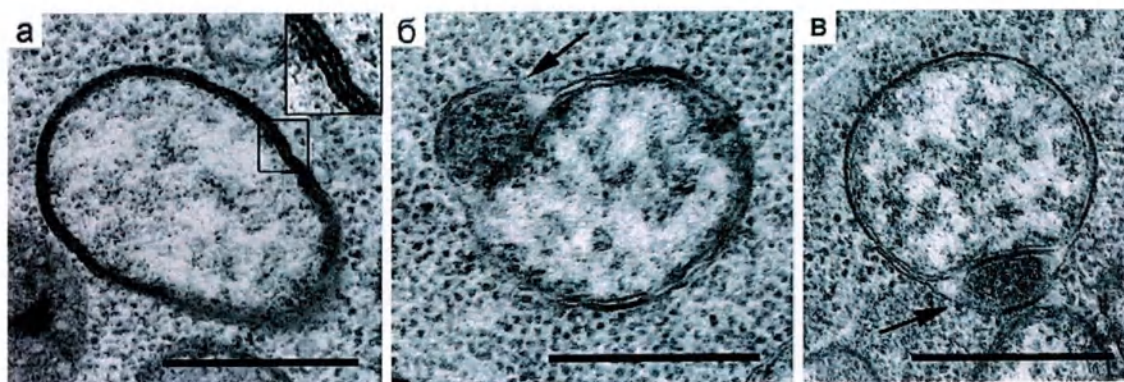


Рис. 8. Бактерии *Wolbachia* в цитоплазме клеток яичников (Жукова М.В., 2011): а – бактерия с типичной морфологией, на вставке сверху – тройная оболочка бактерии; б, в – *Wolbachia*, контактирующие с электронно-плотными тельцами (стрелки) в питающей (б) и фолликулярной клетке вителлярия. Масштаб: 0,5 мкм

Таксономические связи

Род *Wolbachia* таксономически тесно связан с другими родами семейства *Anaplasmataceae* – *Ehrlichia*, *Anaplasma* и *Rickettsia*. В отличие от этих близких родственников, *Wolbachia* не имеют механизмов, позволяющих непосредственно заразить

позвоночных животных, но инфицируют широкий спектр наземных членистоногих и филариальных нематод.

На рис. XXV (цв. вкл.) показаны филогенетические взаимоотношения *Wolbachia* и других близкородственных бактерий. Дерево было модифицировано из Lo N. et al. (2007). Взаимосвязь между различными группами *Wolbachia* и их взаимодействия с хозяевами показаны справа. Дерево модифицировано в соответствии с Dunning Hotopp J. et al. (2006). *Wolbachia* внутри членистоногих (синий цвет) – в большинстве случаев паразитические, манипулируют репродуктивной биологией хозяев (см. ниже). Вольбахии внутри филариальных нематод (зелёный цвет) в значительной степени являются мутуалистами, имеют важное значение для выживания хозяина (Taylor M.J. et al., 2005).

Вольбахии нематод образуют как минимум три линии из семи-восьми основных эволюционных линий вольбахий (Werren et al., 2008). Вольбахии выявлены у многих видов филариальных нематод, имеющих медицинское и ветеринарное значение (*Dirofilaria immitis*, *Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti*, *Onchocerca volvulus*). Хотя неизвестна способность вольбахий инфицировать клетки позвоночных, их можно найти в мазках крови позвоночных животных, инвазированных червями-филяриями. Имеются экспериментальные данные, свидетельствующие о возможном участии вольбахий в иммунопатологических реакциях, возникающих при некоторых филариозах (*Brugia malayi*) у человека.

Управление репродуктивной биологией хозяев

Представители рода *Wolbachia* вызывают все четыре известных способа управления репродуктивной биологией хозяина для увеличения своей трансмиссии, возникающей при воздействии микроорганизмов: цитоплазматическую несовместимость, феминизацию, партеногенез и андроцид (Горячева И.И., 2004; Werren J.H. et al., 2008).

Критически важным для понимания биологии и эволюции вольбахий является способ их передачи. Они крайне плохо передаются горизонтально от одного хозяина к другому. Вместо этого *Wolbachia* почти исключительно передаётся верти-

кально – от матери к потомству через заражённые яйца. Самцы могут быть инфицированы *Wolbachia*, но они не передают их потомству или другим хозяевам. Известные способы управления вольбахий репродуктивной биологией хозяина включают: 1) феминизацию инфицированных мужчин (превращение генетических самцов в самок); 2) индуцированный партеногенез (размножение без самцов); 3) убийство инфицированных самцов (male-killing эффект) и 4) цитоплазматическую несовместимость – модификацию спермы инфицированных самцов, приводящую к появлению эмбриональных дефектов и смерти, когда сперматозоиды оплодотворяют неинфицированные яйца.

Феминизация

Это, вероятно, наиболее эффективная стратегия для вертикальной передачи *Wolbachia* (рис. XXVI в цв. вкл.). Поскольку самцы являются тупиками для наследования большинства цитоплазматических факторов (таких как вольбахии и митохондрии), конверсия инфицированных генетических мужских потомков в самок удваивает потенциальную передачу вольбахий в следующее поколение. Однако индуцированная феминизация описывается наиболее редко из четырёх основных фенотипов, вызванных *Wolbachia*, и известна только у представителей трёх отрядов членистоногих. Чаще всего она документируется у некоторых видов наземных изопод (отряд высших раков) подотряда Oniscidae (мокрицы). Среди насекомых феминизация, индуцированная вольбахиями, известна только у Lepidoptera (чешуекрылые или бабочки) и Hemiptera (полужёсткокрылые).

Партеногенез

С самцами, являющимися эволюционным тупиком для наследования вольбахий, возможна и другая очевидная стратегия управления материнским наследованием эндосимбионта – вызвать партеногенез: производство женского потомства без оплодотворения спермой (рис. XXVI в цв. вкл.). Как и при феминизации, индукция партеногенеза удваивает потенциальную возможность передачи *Wolbachia* следующему поколению, потому что всё потомство – самки. Партеногенез, вызванный *Wolbachia*, известен для трёх отрядов

членистоногих: Thysanoptera (бахромчатокрылые, или трипы), Acari (клещи) и Hymenoptera (осы).

Male killing-эффект

Третий фенотип, вызванный *Wolbachia*, – убийство генетических самцов. Вольбахии могут вызывать этот фенотип, когда убийство инфицированных мужчин приносит пользу выжившим инфицированным самкам и потомству. Следовательно, только в хозяевах с высокой конкуренцией потомства за ресурсы «male-killing *Wolbachia*» могут сохраняться (рис. XXVI в цв. вкл.). На сегодняшний день «male-killing вольбахии» описаны в четырёх порядках членистоногих. Среди насекомых они включают Diptera (двукрылые – мухи, комары), Coleoptera (жесткокрылые или жуки) и Lepidoptera (чешуекрылые или бабочки). Вне насекомых данный эффект выявлен у псевдоскорпионов (класс Arachnida).

Цитоплазматическая несовместимость

Наиболее часто описываемый и филогенетически разнообразный фенотип, вызываемый *Wolbachia*, – это цитоплазматическая несовместимость, известная, по меньшей мере, из восьми отрядов членистоногих: Acari (клещи), Coleoptera (жуки), Diptera (мухи), Isopoda (раки), Lepidoptera (бабочки), Hymenoptera (перепончатокрылые – осы, муравьи и др.), Homoptera (равнокрылые) и Orthoptera (прямокрылые – кузнечики, саранча и др.). Цитоплазматическая несовместимость проявляется, когда инфицированный вольбахией самец встречается с самкой, не имеющей такого же типа *Wolbachia* (либо неинфицированной, либо инфицированной другим типом). Все другие комбинации скрещиваний совместимы (рис. XXVI в цв. вкл.).

У диплоидных организмов результатом несовместимого скрещивания является повышенная эмбриональная смертность. В наиболее экстремальном случае, когда инфицированный *Wolbachia* самец встречается с неинфицированной женской особью, всё потомство погибает (несовместимый кросс). При скрещивании инфицированного самца с аналогично инфицированной самкой (совместимый кросс) увеличения

смертности потомства не происходит. Распространение таких *Wolbachia* в популяциях хозяев легко объясняется, поскольку в смешанной популяции (с инфицированными и незараженными особями) присутствие инфицированных самцов повышает относительную пригодность инфицированных самок за счёт снижения пригодности неинфицированных самок.

***Wolbachia* и горизонтальный перенос генов**

Горизонтальный перенос генов от бактерий к многоклеточным эукариотам до недавнего времени считался невозможным. На примере *Wolbachia* впервые установлено, что такие передачи в геномы их хозяев не только возможны, но и широко распространены. Первый такой перенос был описан у жука *Callosobruchus chinensis* L. – китайской зерновки, у которого отмечен давний перенос большей части хромосомы вольбахии, которая была интегрирована в X-хромосому жука.

Анализ полногеномных последовательностей геномов нескольких видов членистоногих и нематод показал, что передача генов от *Wolbachia* к хозяину широко распространена. Передаваемые гены варьируют от небольших фрагментов гена, обнаруженных в геномах паразитической осы *Nasonia*, до переноса почти всей хромосомы вольбахий в геном дрозофилы (*Drosophila ananassae*).

Недавно была обнаружена ещё одна крупномасштабная передача гена вольбахии в геном хозяина у жука-усача. Хотя результат таких горизонтальных переносов генов в основном неизвестен, появляются примеры, когда перенесённые гены *Wolbachia* приобрели функцию в геноме хозяина. Внутри тлей гены из *Wolbachia* (или его близкого родственника) были перенесены в геном хозяина и высоко экспрессированы в бактериоците насекомых. В комаре *Aedes aegypti* два соседних гена, вероятно, были перенесены из *Wolbachia* в геном москита и экспрессируются на относительно высоких уровнях, что указывает на то, что эти гены приобрели функцию в геноме москитов (Dunning Hotopp J. C. et al., 2006).

***Wolbachia* в филяриальных нематодах**

Филяриальные нематоды — это небольшие паразитические черви, которые могут вызывать тяжёлые заболевания у людей и животных (рис. 9). Вольбахия была описана у значительной части видов филяриальных нематод. В отличие от большинства членистоногих, для которых *Wolbachia* является репродуктивным паразитом, с филяриальными нематодами у них развились мутуалистические отношения: вольбахии необходимы для выживания и размножения филяриальных нематод (Taylor M.J. et al., 2005). Стало также очевидным, что *Wolbachia* может значительно усиливать патогенное действие филяриальных нематод.



Рис. 9. Дирофилярии у собак
<http://vetconsultplus.ru>

Из-за существенного участия в биологии филяриальных нематод, *Wolbachia* теперь являются очевидными мишенями для антибиотиколечения (доксикаклином), для снижения инвазии филяриальными нематодами (Pfarr K. M., Hoerauf A. M., 2006).

ПРЕДСТАВИТЕЛИ СЕМЕЙСТВА *ANAPLASMATACEAE*, НЕ ОТНОСЯЩИЕСЯ К ИЗВЕСТНЫМ РОДАМ

Не все представители семейства *Anaplasmataceae* могут быть отнесены к одному из известных родов. Бактерии двух предполагаемых видов “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” и “*Candidatus Neoehrlichia lotoris*” схожи друг с другом и образуют отдельный кластер в семействе *Anaplasmataceae*.

“*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*”

Бактерии нового кандидатного вида “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*”, первоначально обнаруженные в клещах *Ixodes ovatus* и грызунах в Японии, образуют отдельный филогенетический кластер в семействе *Anaplasmataceae* (Kawahara M. et al., 2004). Впоследствии “*Candidatus N. mikurensis*” были также обнаружены в Европе в клещах *I. ricinus* и в крови собаки (von Loewenich F. et al., 2010). К этому кластеру относятся также бактерии, ранее выявленные в клещах *I. ricinus* и *I. persulcatus* и названные *Ehrlichia*-like бактерии “Schotti variant”, и бактерии, обнаруженные в Китае в крысах *Rattus norvegicus* и названные *Ehrlichia* sp. “*Rattus strain*” (Schouls L. et al., 1999; Pan H. et al., 2003; Шпынов С.Н. и др., 2004). В России “Schotti variant” впервые обнаружен в Омской области (Шпынов С.Н. и др., 2004). Недавно “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” был выявлен в клещах *I. persulcatus* в Монголии (Kamath C. et al., 2016).

В последние годы были получены свидетельства патогенности “*Candidatus N. mikurensis*” для людей. В образцах крови четырёх лихорадящих больных из Швеции, Германии и Швейцарии была обнаружена ДНК этого микроорганизма. Клиническая картина заболевания включала лихорадку, которая могла протекать в форме возвратной лихорадки длительностью до полугода, у двоих пациентов были отмечены тромбоэмболические осложнения, в одном случае заболевание привело к летальному исходу (Fehr J. et al., 2010; von Loewenich F. et al., 2010; Welinder-Olsson C. et al., 2010).

Было высказано предположение (von Loewenich F. et al., 2010), что тромбоэмболические осложнения характерны для

инфекций, вызванных “*Candidatus N. mikurensis*”, и что данные осложнения обусловлены тропностью возбудителя к эндотелиальным клеткам.

Семь случаев заболеваний, вызванных “*Candidatus N. mikurensis*”, подтверждены молекулярно-биологическими методами при обследовании в 2010 году 622-х лихорадящих больных после присасывания иксодовых клещей на северо-востоке Китая (провинция Heilongjiang). Лихорадка, головная боль и недомогание отмечались у всех семи пациентов. Другие проявления включали тошноту (5/7), рвоту (5/7), миалгию (4/7) и ригидность затылочных мышц (4/7). Реже отмечали артралгии (2/7), кашель (2/7), диарею (1/7) и эритему (1/7). Исследование в этом регионе 516-ти переносчиков из природных станций, включая 316 экземпляров *I. persulcatus*, 187 – *Haemaphysalis concinna* и 13 – *Dermacentor silvarum*, позволило выявить ДНК “*Candidatus N. mikurensis*” в шести (1,9 %) *I. persulcatus* и двух (0,8 %) *H. concinna*. Результаты исследования клещей *D. silvarum* отрицательные (Li H. et al., 2012). Нуклеотидные последовательности генов *rrs* и *groEL* проб ДНК из восьми клещей, восьми грызунов и семи пациентов были идентичны (рис. 10).

Филогенетический анализ *rrs* гена показал, что нуклеотидные последовательности были идентичны последовательностям “*Candidatus N. mikurensis*” из Японии и азиатской части России, но отличались от последовательностей из Европы (99,6–99,8 % гомологии) (рис. 10, А). Аналогичные филогенетические взаимоотношения были получены в neighbor-joining анализе нуклеотидных последовательностей *groEL* гена. При сравнении нуклеотидных последовательностей *groEL* гена в образцах от людей и клещей из Европы гомология составила 97,6–98,4 % (рис. 10, В).

К настоящему времени ПЦР является, вероятно, единственным методом, который может быть использован для диагностики заболеваний, вызванных “*Candidatus N. mikurensis*”. Бактерии не могут быть выявлены с помощью микроскопического анализа мазков крови, поскольку в инфицированных крысах бактерии “*Candidatus N. mikurensis*” были обнаружены в цитоплазме эпителиальных клеток, выстилающих кровенос-

ные сосуды, но не в клетках крови (Kawahara M. et al., 2004). В мазках крови пациентов данный возбудитель также не был обнаружен (von Loewenich F. et al., 2010).

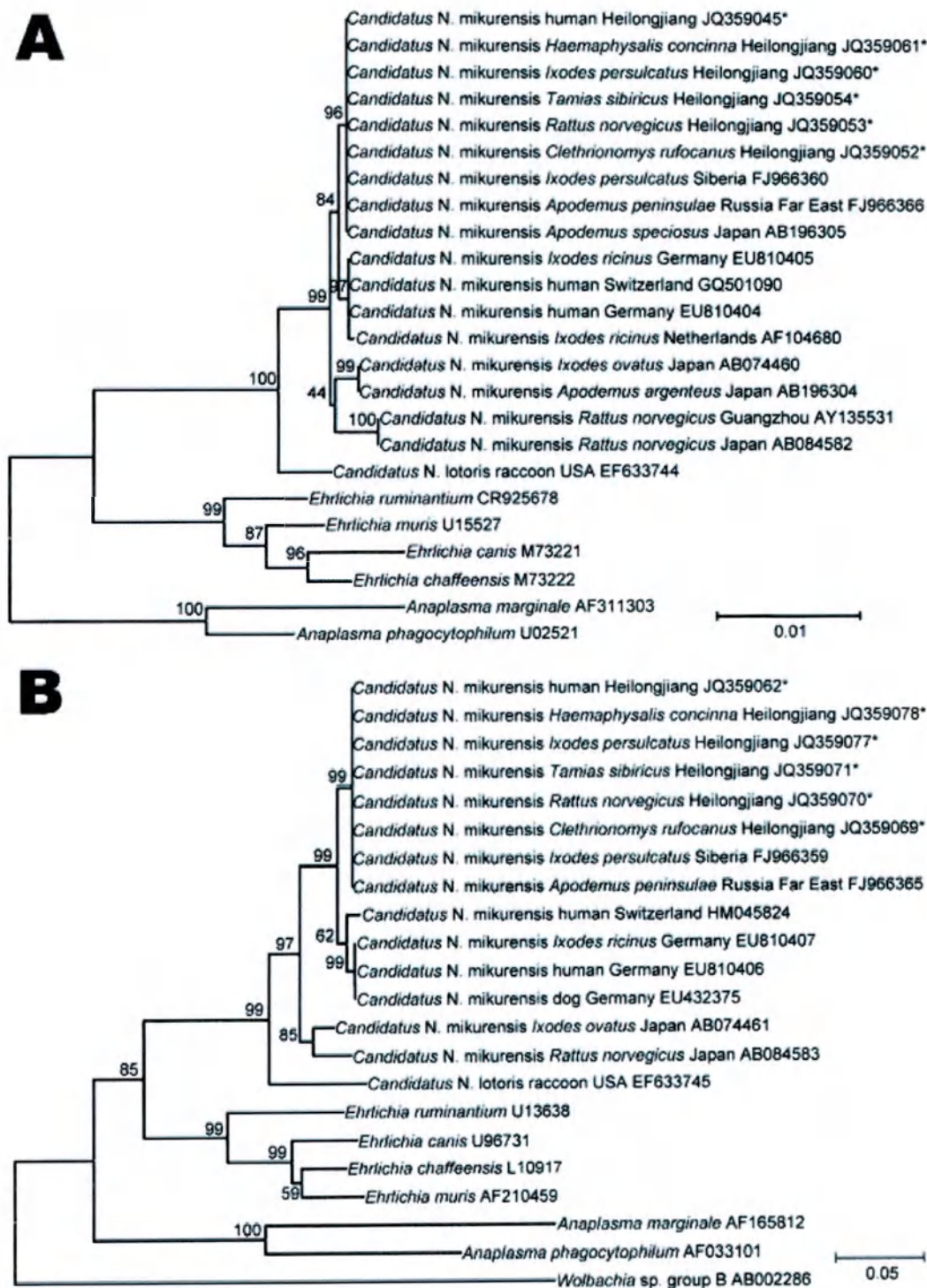


Рис. 10. Филогенетическое дерево проб ДНК *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* из Китая

“Candidatus *Neoehrlichia lotoris*”

ДНК ещё одного кандидатного вида из семейства *Anaplasmataceae*, наиболее генетически близкого к “Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*” и названного в дальнейшем “Candidatus *Neoehrlichia lotoris*”, было выявлено у 53 % обследованных енотов в регионе Piedmont в Джорджии (США) на основе частичного сиквенса гена 16S rRNA (Dugan V. et al., 2005).

Указанный микроорганизм был выделен в клеточной линии из клещей ISE6 (Munderloh U. et al., 2007). Эти бактерии при экспериментальном заражении способны инфицировать незараженных енотов, но не лабораторных мышей, крыс и кроликов (Yabsley et al., 2008a). Филогенетический анализ, основанный на сравнении нуклеотидных последовательностей четырёх генетических локусов (генов 16S рPHK, *groESL*, *gltA* и *rpoB*), подтвердил, что данные бактерии наиболее близки к “Candidatus *N. mikurensis*”. Выявленные последовательности “Candidatus *Neoehrlichia lotoris*” от енотов из географически изолированных популяций по генам 16S рPHK, *gltA* и *groESL* оперону были строго консервативны (Yabsley M. et al., 2008b).

Другие представители неоэрлихий

Недавно ещё два новых кандидатных вида семейства *Anaplasmataceae* были выявлены в австралийских парализованных клещах, *Ixodes holocyclus*, путём мета-штрих-кодирования гена 16S rRNA (Gofton A.W. et al., 2016). Анализ полученных последовательностей показал, что они близко родственны “Candidatus *Neoehrlichia*”. Филогенетический анализ последовательностей 16S rRNA (1264 bp), *groESL* (1047 bp) and *gltA* (561 bp) генов и консолидированных (2872 bp) последовательностей указывает, что эти новые виды принадлежат к роду “Candidatus *Neoehrlichia*”, “Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*” и “Candidatus *Neoehrlichia lotoris*”. Учитывая их уникальную молекулярную структуру, они заявлены как кандидаты в новые виды “Candidatus *Neoehrlichia australis*” (референтный штамм HT41^R) и “Candidatus *Neoehrlichia arcana*” (референтный штамм HT94^R). Идентичные “Candidatus *Neoehrlichia aus-*

tralis" 16S rRNA, *groESL* и *gltA* нуклеотидные последовательности были выявлены в 34 из 391 (8,7 %) экземплярах клещей *Ixodes holocyclus*, и эти последовательности были наиболее близки к "*Candidatus Neoehrlichia lotoris*" (96,2 ; 83,1 и 67,2 %, соответственно) и "*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*" (96,2 ; 84 и 68,4 % соответственно). Аналогично идентичные "*Candidatus Neoehrlichia arcana*" 16S rRNA, *groESL* and *gltA* сиквенсы были определены в 12 из 391 (3,1 %) клещей *Ixodes holocyclus*, они были наиболее гомологичны "*Candidatus Neoehrlichia lotoris*" (98,5; 88,7 и 79,3 % соответственно) и "*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*" (96,3; 84 и 67,4 % соответственно).

Патогенность обоих микроорганизмов до настоящего времени не установлена.

Библиографический список

1. Алексеев А.Н., Дубинина И.В., Семенов А.В. Смешанные инфекции в клещах-переносчиках рода *Ixodes* (Acarina: Ixodidae) – правило, а не исключение. Клещевые и паразитарные болезни: материалы «круглого стола» в рамках Всеросс. науч. конф. «Клинические перспективы в инфектологии». Санкт-Петербург. 2001: 9–16.
2. Алешковская Е.С., Благоев Н.А., Дружинина Т.А., Шалеев Е.В. Клещевые микстинфекции (иксодовый клещевой боррелиоз и гранулоцитарный эрлихиоз человека) в Ярославской области. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2008; 2: 6–8.
3. Анисько Л.А., Соловей Н.В., Карпов И.А. Гранулоцитарный анаплазмоз человека. Клиническая инфектология и паразитология. 2012; 3–4: 144–51.
4. Афанасьева М.В., Воробьева Н.Н., Коренберг Э.И., Фризен В.И., Манокина Т.Е. Гранулоцитарный анаплазмоз человека: особенности клинических проявлений в России. Инфекционные болезни. 2006; 2 (4): 24–8.
5. Борисов В.А., Козлова И.В., Аитов К.А., Туваков М.К., Верхожина М.М. и др. Гранулоцитарный анаплазмоз и моноцитарный эрлихиоз человека на территории Иркутской области. Журн. инфекционной патологии. 2010; 3: 35–7.
6. Горячева И.И. Бактерии рода *Wolbachia* – репродуктивные паразиты членистоногих. Успехи соврем. биологии. 2004; 124 (3): 246–59.
7. Григорян Е.В., Воробьева Н.Н., Коренберг Э.И. Первые данные о клиническом течении моноцитарного эрлихиоза в России. Эпидемиол. и инфекц. бол. 2000; 6: 20–3.
8. Григорян Е.В. Клинико-эпидемиологическая характеристика моноцитарного эрлихиоза человека в России: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. М., 2002.
9. Дубинина Е.В., Алексеев А.Н. Динамика биоразнообразия возбудителей болезней, переносимых клещами рода *Ixodes*: анализ многолетних данных. Медицинская паразитол. 1999; 2: 13–9.
10. Инфекционные болезни: национальное руководство. Под ред. Н.Д. Ющука, Ю.Я. Венгера. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2009: 1–1056.
11. Казаков Н.А. Анаплазмоз рогатого скота: диагностика, лечение, профилактика, меры борьбы. Ветинформ. 2003; 1: 6–8.
12. Красиков А.П., Рудаков Н.В. Риккетсиозы, коксиеллез и анаплазмозы человека и животных: монография. Омск: ОООИЦ «Омский научный вестник». 2013: 1–280.
13. Козлова И.В. Научное обоснование и пути совершенствования экстренной диагностики и профилактики трансмиссивных клещевых инфекций в условиях сочетанности природных очагов: автореф. дис. докт. мед. наук. Иркутск. 2008: 1–46.

14. Козько В.Н., Юрко Е.В., Похио С.И., Тимченко О.М. Эрлихиоз: современное состояние проблемы. Клиническая инфектология и паразитология. 2012; 3–4: 77–87.
15. Лобан К.М., Лобзин Ю.В., Лукин Е.П. Риккетсиозы человека. СПб.: ЭЛБИ, 2002: 1–471.
16. Медяников О.Ю., Сидельников Ю.Н., Иванов Л.И., Здановская Н.И. К вопросу об этиологии гранулоцитарного эрлихиоза человека на Дальнем Востоке России. Тихоокеанский мед. журн. 2001; 2 (7): 126.
17. Оберт А.С., Рудаков Н.В., Седых Н.Н. Эрлихиозы и анаплазмозы в очагах сибирского клещевого риккетсиоза Алтайского края. Детские инфекции. 2009; 2: 30–2.
18. Попонникова Т.В., Пиневиц О.С. Современные особенности микст-инфекций у детей. Сибирский консилиум. 2006; 4: 39–43.
19. Рар В.А., Пуховская Н.М., Высочина Н. П., Зайнулина З.У., Гуляко Л.Ф., Иванов Л.И. Распространение и генетическое разнообразие эрлихий и анаплазм в таежных клещах и мелких млекопитающих на территории Хабаровского края. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2007; 3 (Прил.): 156–159.
20. Рар В.А., Фоменко Н.В., Мельникова О.В., Черноусова Н.Я. Выявление антител к возбудителям гранулоцитарного анаплазмоза и моноцитарного эрлихиоза человека в крови пациентов из Новосибирской области. Бюллетень сибирской медицины. 2008; 7 (Прил. 1): 73–77.
21. Рар В.А., Епихина Т.И., Ливанова Н.Н., Панов В.В., Дорощенко Е. К., Пуховская Н.М., Высочина Н.П., Иванов Л.И. Изучение гетерогенности гена 16S рРНК и *groESL* оперона в образцах ДНК *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris* и “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*”, выявленных в таёжных клещах на территории Урала, Сибири и Дальнего Востока. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2011; 2: 17–23.
22. Рудаков Н.В., Оберт А.С., Калмин О.Б., Рудакова С.А., Самойленко И.Е. Новые и возвращающиеся природноочаговые инфекции и лабораторная верификация гранулоцитарного эрлихиоза в Алтайском крае. Материалы научно-практической конференции «Природные и антропогенные предпосылки состояния здоровья населения Сибири». Барнаул. 2001: 47–50.
23. Рудаков Н.В., Матущенко А.А., Шпынов С.Н., Рудакова С.А. Новые и возвращающиеся природноочаговые инфекции: теоретические и прикладные аспекты проблемы. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2002; 4 (2): 16–9.
24. Рудаков Н.В., Оберт А.С., Шпынов С.Н. Анаплазмозы и эрлихиозы человека – новая проблема инфекционной патологии в России: пособие для врачей. Омск. 2005: 1–35.
25. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Самойленко И.Е., Оберт А.С. Клещевой риккетсиоз и риккетсии группы клещевой пятнистой лихорадки в России. Омск: ИЦ «Омский научный вестник». 2011: 1–232.
26. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Самойленко И.Е., Ястребов В.К., Оберт А.С., Курепина Н.Ю. Риккетсии и риккетсиозы группы клещевой пят-

нистой лихорадки в Сибири. Омск: Издательский центр «Омский научный вестник». 2012: 1–288.

27. Самаров М.Н. Структура, клиническая характеристика и лабораторная диагностика заболеваний, возбудители которых передаются иксодовыми клещами, у детей: автореф. дис. канд. мед. наук. М., 2009. 20 с.

28. Сидельников Ю.Н., Медяников О.Ю., Иванов Л.И., Здановская Н.И. Первый случай гранулоцитарного эрлихиоза на Дальнем Востоке Российской Федерации. Клиническая медицина. 2003; 81: 67–8.

29. Телфорд III С.Р., Коренберг Э.И., Goethert Н.К., Ковалевский Ю.В., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., Spielman А. Выявление в России природных очагов бабезиоза и гранулоцитарного эрлихиоза. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2002; 6: 21–5.

30. Тетерин В.Ю., Коренберг Э.И., Нефедова В.В., Воробьева Н.Н., Фризен В.И. и др. Гранулоцитарный анаплазмоз человека и микст-инфекция с иксодовым клещевым боррелиозом. Инфекционные болезни. 2012; 10 (1):21–7.

31. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Fournier Р.-Е., Raoult D. Выявление эрлихий в клещах *Ixodes persulcatus* на Урале и в Азиатской части России. Бюллетень ВЦНЦ СО РАМН. 2002; 4 (2):139–41.

32. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Ястребов В.К., Леонова Г.Н., Хазова Т.Г., Егорова Н.В., Борисова О.Н., Прейдер В.П., Безруков Г.В., Федоров Е.Г., Федянин А.П., Шерстнева М.Б., Турышев А.Г., Гаврилов А.П., Танкибаев М.А., Fournier Р.-Е., Raoult D. Новые данные о выявлении эрлихий и анаплазм в иксодовых клещах в России и Казахстане. Медицинская паразитология. 2004; 2: 10–4.

33. Щучинова Л.Д. Эпидемиологический надзор и контроль инфекций, передающихся клещами, в Республике Алтай: автореф. дис. канд. мед. наук. Омск, 2009. 20 с.

34. Цачев И.Ц., Димов И.Д. Моноцитарный эрлихиоз у собак. Veterinary Parasitology. 2011; 5–6: 48–53.

35. Aguero-Rosenfeld M.E., Horowitz H.W., Wormser G.P. Human granulocytic ehrlichiosis: a case series from a medical center in New York State. Ann. Intern. Med. 1996; 125: 904–8.

36. Alekseev A.N., Dubinina H.V., Van de Pol I., Schouls L.M. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 2237–42.

37. Allsopp MTEP, Louw M., Meyer E.C. *Ehrlichia ruminantium* – an emerging human pathogen (Letter). S. Afr. Med. 2005; 95: 541.

38. Louw M., Allsopp MTEP, Meyer E.C. *Ehrlichia ruminantium* – an emerging human pathogen – a further report (Letter). SAMJ. 2005; 95 (12): 948.

39. Allsopp B.A. Natural history of *Ehrlichia ruminantium*. Vet. Parasitol. 2010; 167: 123–35.

40. Almazán C., Medrano C., Ortiz M., de la Fuente J. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from an outbreak of bovine anaplasmosis in an endemic area. Vet. Parasitol. 2008; 158: 103–9.

41. Anderson B.E., Dawson J.E., Jones D.C. and Wilson K.H. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. 1991; 29:2838–42.
42. Anderson B.E., Greene C.E., Jones D.C. and Dawson J.E. *Ehrlichia ewingii* sp. nov., the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. Int. J. Syst. Bacteriol. 1992; 42: 299–302.
43. Bayard-Mc Neeley M., Bansal A., Chowdhury I., Girao G., Small C.B., Seiter K., Nelson J., Liveris D., Schwartz I., Mc Neeley D. F., Wormser G.P., Aguero-Rosenfeld M.E. In vivo and in vitro studies on *Anaplasma phagocytophilum* infection of the myeloid cells of a patient with chronic myelogenous leukaemia and human granulocytic ehrlichiosis. J. Clin. Pathol. 2004; 57:499–503.
44. Bakken J.S., Dumler J.S., Chen S.M., Eckman M.R., van Etta L.L., Walker D.H. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper midwest United States. A new species emerging? JAMA. 1994; 272(3): 212–8.
45. Bakken J.S., Dumler S. Human Granulocytic Anaplasmosis. Infect. Dis. Clin. 2008; 22: 433–48.
46. Bjorsdorff A., Berglund J., Kristiansen B.E., Söderström C., Eliasson I. Varying clinical picture and course of human granulocytic ehrlichiosis. Twelve Scandinavian cases of the new tick-borne zoonosis are presented. Lakartidningen. 1999; 96: 4200–4.
47. Bown K.J., Begon M., Bennett M., Woldehiwet Z., Ogden N.H. Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. Emerg. Infect. Dis. 2003; 9: 63–70.
48. Brouqui P. Ehrlichiosis in Europe. Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millennium. Raoult D, Brouqui P, Eds. Elsevier. Paris. 1999: 220–32.
49. Brouqui P., Bacellar F., Baranton G., Birtles R.J., Bjoërsdorff A., Blanco J.R., Caruso G., Cinco M., Fournier P.E., Francavilla E., Jensenius M., Kazar J., Laferl H., Lakos A., Lotric Furlan S., Maurin M., Oteo J.A., Parola P., Perez-Eid C., Peter O., Postic D., Raoult D., Tellez A., Tselentis Y., Wilske B. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10: 1108–1132.
50. Buller R.S., Arens M., Hmiel S.P., Paddock C.D., Sumner J.W., Rikhsa Y., Unver A., Gaudreault-Keener M., Manian F.A., Liddell A.M., Schmulewitz N., Storch G.A. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. N. Engl. J. Med. 1999; 15:148–55.
51. Burgdorfer W. A review of Rocky Mountain spotted fever (tick-borne typhus) its agent, and its tick vectors in the United States. J. Med. Entomol. 1975; 11: 269–78.
52. Cao W.-C., Zhao Q.-M., Zhang P.-H., Dumler JS, Zhang XT, Fang LQ, Yang H. Granulocytic ehrlichiae in *Ixodes persulcatus* ticks from an area in China where Lyme disease is endemic. J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 4208–10.

53. Cardoso L., Tuna J., Vieira L., Yisaschar-Mekuzas Y., Baneth G. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. *Vet. J.* 2010; 183: 232–3.
54. Chen S.-M., Dumler J.S., Bakken J.S., Walker D.H. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32: 589–95.
55. Childs J.E., McQuiston J., Sumner J.W., Nicholson W.L., Comer J.A., Massung R.E. et al. Human monocytic ehrlichiosis due to *Ehrlichia chaffeensis*: how do we count the cases? Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millennium. (Raoult D, Brouqui P, Eds.). Elsevier, Paris. 1999: 220–232.
56. Courtney J.W., Dryden R.L., Montgomery J., Schneider B.S., Smith G., Massung R.F. Molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes scapularis* ticks from Pennsylvania. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 1569–73.
57. Cowdry E.V. Studies on the aetiology of heartwater. 1. Observation of a rickettsia, *Rickettsia ruminantium* (n.sp.) in the tissues of infected animals. *J. Exp. Med.* 1925; 42: 231–52.
58. Dawson J.E., Anderson B.E., Fishbein D.B., Sanchez J.L., Goldsmith C.S., Wilson K.H., Duntley C.W. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 2741–45.
59. Dawson J.E., Ewing S.A., Davidson W.R., Childs J.E., Little S.E., Standaer S.M. Human Monocytotropic Ehrlichiosis. Tick-borne diseases of humans. Ed. by J.L. Goodman, D.T. Dennis, D.E. Sonenshine. ASM Press. Washington, D.C. 2005: 1–399.
60. de la Fuente J., Massung R.F., Wong S.J., Chu F.K., Lutz H., Meli M., von Loewenich F.D., Grzeszczuk A., Torina A., Caracappa S., Mangold A.J., Naranjo V., Stuenkel S., Kocan K.M.,. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 1309–17.
61. de la Fuente J., Atkinson M.W., Naranjo V., Fernández de Mera I.G., Mangold A.J., Keating K.A., Kocan K.M. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma ovis* strains. *Vet. Microbiol.* 2007; 119: 375–81.
62. de la Fuente J., Kocan K.M., Blouin E.F., Zivkovic Z., Naranjo V., Almazán C., Esteves E., Jongejans F., Daffre S., Mangold A.J. Functional genomics and evolution of tick-*Anaplasma* interactions and vaccine development. *Vet. Parasitol.* 2010; 167: 175–186.
63. Donatien A. and Lestoquard F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. *Bull. Soc. Path. Exot.* 1935; 28: 418–9.
64. Dugan V.G., Gaydos J.K., Stallknecht D.E., Little S.E., Beall A.D., Mead D.G., Hurd C.C. & Davidson W.R. Detection of *Ehrlichia* spp. in raccoons (*Procyon lotor*) from Georgia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2005; 5: 162–71.

65. Dumler J.S., Dawson J.E., Walker D.H. Human ehrlichiosis: hemato-pathology and immunohistologic detection of *Ehrlichia chaffeensis*. Hum. Pathol. 1993; 24: 391–6.
66. Dumler J.S., Walker D.H. Tick-borne ehrlichioses. Lancet Infect. Dis. 2001; 1: 21–8.
67. Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y., Rurangirwa F.R. Reorganization of genera in families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia*, and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001; 51: 2145–65.
68. Dunning Hotopp J. C., Lin M., Madupu R., Crabtree J., Angiuoli S.V., Eisen J., Seshadri R., Ren Q., Wu M., Utterback T. R., Smith S., Lewis M., Khouri H., Zhang C., Niu H., Lin Q., Ohashi N. et al. Comparative Genomics of Emerging Human Ehrlichiosis Agents. Plos Genetics. 2006; 2 (2): e21. DOI: 10.1371/journal.pgen.0020021.
69. Eng T.R., Harkess J.R., Fishbein D.B. et al. Epidemiologic, clinical, and laboratory findings of human ehrlichiosis in the United States. JAMA. 1988; 264: 2251–8.
70. Ewing S.A., Roberson W.R., Buckner R.G., and Hayat C.S. A new strain of *Ehrlichia canis*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1971; 159: 1771–4.
71. Ewing S.A., Dawson J.E., Kokan A.A., Barker W., Warner C.K., Panciera R.J., Fox C.J., Kocan K.M., Blouin E.F. Experimental transmission of *Ehrlichia chaffeensis* (*Rickettsiales: Ehrlichieae*) among white-tailed deer by *Amblyomma americanum* (*Acari: Ixodidae*). J. Med. Entomol. 1995; 32: 368–74.
72. Fehr J.S., Bloemberg G.V., Ritter C., Hombach M., Lüscher T.F., Weber R., and P.M. Keller Septicemia Caused by Tick-borne Bacterial Pathogen *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. Emerging Infectious Diseases. 2010; 7 (16): 1127–9.
73. Fishbein D., Kemp A., Dawson J. E., Greene N.R., Redus M.A., Fields D.H. Human Ehrlichiosis: prospective active surveillance in febrile hospitalized patients. J. Infect. Dis. 1989; 160 (5): 803–9.
74. Fishbein D.B., Dawson J.E., Robinson L.E. Human ehrlichiosis in the United States. Ann. Intern. Med. 1994; 120: 736–43.
75. Foley J.E., Clueit S.B., Brown R.N. Differential exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in rodent species in northern California. Vector Borne Zoonotic Dis. 2008; 8: 49–55.
76. Fukuda T., T. Kitao, and Y. Keida. 1954. Studies on the causative agent of "hyuganetsu" disease. I. Isolation of the agent and its inoculation trial in human beings. Med. Biol. 32: 200–209.

77. Fukuda T. 1958. Rickettsial mononucleosis (synonyms: hyuganetsu, kagaminetsu). *Kitasato Arch. Exp. Med.* 31: 51–56.
78. Ganguly S., Mukhopadhyay S.K. Tick-borne ehrlichiosis infection in human beings. *J. Vector Borne Dis.* 2008; 45 (4): 273–80.
79. Gofton A.W., Doggett S., Ratchford A., Ryan U. and Irwin P. Phylogenetic characterization of two novel *Anaplasmataceae* from Australian *Ixodes holocyclus* ticks: “*Candidatus* Neoehrlichia australis” and “*Candidatus* Neoehrlichia arcana”. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016; 66: 4256–4261.
80. Goodman J.L., Dennis D.T., Sonenshine D.E. Human Granulocytic Anaplasmosis (Ehrlichiosis). In: Tick-borne diseases of humans. Ed. by J.L. Goodman, ASM Press. Washington, D.C. 2005: 218–38.
81. Gordon W.S., Brownlee A. and Wilson D.R. Studies in louping ill, tick-borne fever and scrapie. *Proc. 3rd Int. Congr. Microbiol.* NY. 1940: 362–3.
82. Grzeszczuk A., Karbowiak G., Ziarko S., Kovalchuk O. The root-vole *Microtus oeconomus* (Pallas, 1776): a new potential reservoir of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2006; 6: 240–3.
83. Harkess J.R., Ewing S.A., Crutcher J.M., Kudlac J., McKee G., Istre G.R. Human ehrlichiosis in Oklahoma. *J. Infect. Dis.* 1989; 159: 576–9.
84. Hartelt K., Pluta S., Oehme R., Kimmig P. Spread of ticks and tick-borne diseases in Germany due to global warming. *Parasitol. Res.* 2008; 103, Suppl. 1: 109–16.
85. Hattwick M.A., O'Brien R.J., Hanson B.F. Rocky Mountain spotted fever: epidemiology of an increasing problem. *Ann. Intern. Med.* 1976; 84: 732.
86. Hayes S.F., Nelson C.M., Goodman J.L. The life cycle of *A. phagocytophilum* in human cells. Tick-borne diseases of humans. Ed. by J.L. Goodman, D.T. Dennis, D.E. Sonenshine. ASM Press. Washington, D.C. 2005: 1–399.
87. Herron M.J., Nelson C.M., Larson J., Snapp K.R., Kansas G.S. Intracellular parasitism by the human granulocytic ehrlichiosis bacterium through the P-selectin ligand, PSGL-1. *Science.* 2000; 288: 1653–6.
88. Hertig M., Wolbach S.B. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. *J. Med. Res.* 1924; 44: 329–74.
89. Hertig M. The rickettsia, *Wolbachia pipiens* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito *Culex pipiens*. *Parasitology.* 1936; 28: 453–86.
90. Hsieh Y.C., Lee C.C., Tsang C.L., Chung Y.T. Detection and characterization of four novel genotypes of *Ehrlichia canis* from dogs. *Vet. Microbiol.* 2010; 146: 70–5.
91. Inokuma H., Ohno K., Onishi T., Raoult D., Brouqui P. Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan // *J. Vet. Med. Sci.* 2001. V. 63. P. 815–817.

92. Inokuma H., Beppu T., Okuda M., Shimada Y., Sakata Y. Detection of ehrlichial DNA in *Haemaphysalis* ticks recovered from dogs in Japan that is closely related to a novel *Ehrlichia* sp. found in cattle ticks from Tibet, Thailand, and Africa // J. Clin. Microbiol. 2004. V.42. P. 1353–1355.
93. Inokuma H., Ohashi M., Jilintai Tanabe S., Miyahara K. Prevalence of tick-borne *Rickettsia* and *Ehrlichia* in *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus* in Tokachi district, Eastern Hokkaido, Japan // J. Vet. Med. Sci. 2007. V. 69. P. 661–664.
94. Ismail N., Bloch K.C., McBride J.W. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. Clin. Lab. Med. 2010; 30 (1): 261–92.
95. James A.M., Liveris D., Wormser G.P., Schwartz I., Montecalvo M.A., Johnson B.J. *Borrelia lonestari* infection after a bite by an *Amblyomma americanum* tick. J. Infect. Dis. 2001; 183: 1810–4.
96. Jiang B.G., Cao W.C., Niu J.J., Wang J.X., Li H.M., Sun Y., Yang H., Richadus J.H., Habbema J.D. Detection and identification of *Ehrlichia* species in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in cattle from Xiamen, China. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011; 11: 325.
97. Kalinová Z., Cisláková L., Halánová M. Ehrlichiosis / Anaplasmosis. Klin. Mikrobiol. Infekc. Lek. 2009; 15 (6): 210–3.
98. Kamath C., Obiegala A., Speck S., Essbauer S., Derschum H., Scholz H., Kiefer D., Tserennorov D., Dashdavaa O., Tsogbadrakh N. Detection of *Babesia venatorum*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in *Ixodes persulcatus* ticks from Mongolia. Ticks and Tick-Borne Diseases. 2016; 7 (2): 357–360.
99. Kawahara M., Suto C., and Rikihisa Y. Characterization of ehrlichial organisms isolated from a wild mouse. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:89–96.
100. Kawahara M., Ito T., Suto C., Shibata S., Rikihisa Y., Hata K. and Hirai K. Comparison of *Ehrlichia muris* strains isolated from wild mice and ticks and serologic evidence of humans and animals with *E.muris* antigen. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 1123–9.
101. Kawahara M., Rikihisa Y., Isogai E., Takahashi M., Misumi H., Suto C., Shibata S., Zhang C., Tsuji M. Ultrastructure and phylogenetic analysis of “*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004; 54: 1837–43.
102. Kawahara M., Rikihisa Y., Lin Q., Isogai E., Tahara K., Itagaki A., Hiramitsu Y., Tajima T. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72: 1102–9.
103. Kim C.M., Kim M.S., Park M.S., Park J.H., Chae J.S. Identification of *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *A. bovis* in *Haemaphysa-*

lis longicornis and *Ixodes persulcatus* ticks from Korea. Vector Borne Zoonotic Dis. 2003; 3: 17–26.

104. Kocan K.M., de la Fuente J., Blouin E.F., Coetzee J.F., Ewing S.A. The natural history of *Anaplasma marginale*. Vet. Parasitol. 2010; 167: 95–107.

105. Lee M., Yu D., Yoon J., Li Y., Lee J., Park J. Natural co-infection of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma bovis* in a deer in South Korea. J. Vet. Med. Sci. 2009; 71: 101–3.

106. Li H, Jiang J, Liu W, Zheng Y, Huo Q, Tang K, Kun Tang, Shuang-Yan Zuo, Kun Liu, Bao-Gui Jiang, Hong Yang, and Wu-Chun Cao Human Infection with *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, China. Emerg Infect Dis. 2012; 18(10): 1636–1639. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1810.120594>

107. Lepidi H., Bunnell J.E. Martin M.E., Madigan J.E., Stuen S., Dumler J.S. Comparative pathology, and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila* – group infections. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2000; 62: 29–37.

108. Liz J.S., Anderes L., Sumner J.W., Massung R.F., Gern L., Rutti B., Brossard M. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 1002–7.

109. Lo N., Paraskevopoulos C., Bourtzis K., O'Neill S.L., Werren J.H., Bordenstein S.R. and Bandi C. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007; 57: 654–7.

110. Loftis A.D., Reeves W.K., Spurlock J.P., Mahan S.M., Troughton D.R., Dasch G.A., Levin M.L. Infection of a goat with a tick-transmitted *Ehrlichia* from Georgia, U.S.A., that is closely related to *Ehrlichia ruminantium*. J. Vector. Ecol. 2006; 31: 213–23.

111. Maeda K., Markowitz N., Hawley R.C., Ristic M., Cox D., McDade J.E. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. N. Engl. J. Med. 1987; 316: 853–6.

112. Maurin M.J., Bakken J.S., Dumler S. Antibiotic susceptibilities of *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* strains from various geographic areas in the United States. Antimicrob. Agents Chemother. 2003; 47: 413–5.

113. Massung R.F., Mather T.N., Priestley R.A and Levin M.L. Inability of a variant of *Anaplasma phagocytophila* to infect mice. Intern. Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases: Book of abstracts. Ljubljana. 2002: 18.

114. Massung R.F., Priestley R.A., Miller N.J., Mather T.N., Levin M.L. Inability of a variant strain of *Anaplasma phagocytophilum* to infect mice. J. Infect. Dis. 2003; 188: 1757–63.

115. Massung R.F., Mather T.N., Levin M.L. Reservoir competency of goats for the Ap-variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum*. Infect. Immun. 2006; 74: 1373–5.

116. Matsumoto K., Joncour G., Lamanda P., Inokuma H., Brouqui P. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia* sp. HF strains in *Ixodes ricinus* ticks in Brittany, France. Clin. Microbiol. Infect. 2007; 13: 338–41.
117. Misao T. and Kobayashi Y. Studies on infectious mononucleosis (glandular fever). 1. Isolation of etiologic agent from blood, bone marrow and lymph node of a patient with infectious mononucleosis by using mice. Kyushu J. Med. Sci. 1955; 6: 145–152.
118. MMWR. Final 2009 Reports of Nationally Notifiable Infectious Diseases. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2010; 59: 1025–1039.
119. Morozova O.V., Dobrotvorskyy A.K., Livanova N.N. et al. PCR detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, tick – borne encephalitis virus, and human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes persulcatus* ticks from Western Siberia, Russia. J. Clin. Microbiol. 2002; 40 (10): 3802–4.
120. Motoi Y., Satoh H., Inokuma H., Kiyuuna T., Muramatsu Y., Ueno H., Morita C. First detection of *Ehrlichia platys* in dogs and ticks in Okinawa, Japan. Microbiol. Immunol. 2001; 45: 89–91.
121. Munderloh U.G., Yabsley M.J., Murphy S.M., Luttrell M.P. & Howarth E.W. Isolation and establishment of the raccoon Ehrlichia-like agent in tick cell culture. Vector Borne Zoonotic Dis. 2007; 7: 418–25.
122. Nicholson W.L., Allen K.E., McQuiston J.H., Breitschwerdt E.B., Little S.E. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. Trends Parasitol. 2010; 26: 205–12.
123. Nieto N.C., Foley J.E. Evaluation of squirrels (Rodentia: Sciuridae) as ecologically significant hosts for *Anaplasma phagocytophilum* in California. J. Med. Entomol. 2008; 45: 763–9.
124. Ohashi N., Gaowa W., Kawamori F., Wu D., Yoshikawa Y., Chiya S., Fukunaga K., Funato T., Shiojiri M., Nakajima H., Hamauzu Y., Takanashi A., Kawabata H., Ando S., Kishimoto T. Human granulocytic Anaplasmosis, Japan. Emerg. Infect. Dis. 2013; 19 (2): 289–92.
125. Oteo J.A., Gil H., Barral M., Perez A., Jimenez S., Blanco J.R., Martinez de Artola V., Garcia-Perez A., Juste R.A. Presence of granulocytic ehrlichia in ticks and serological evidence of human infection in La Rioja, Spain. Epidemiol. Infect. 2001; 127(2): 353–8.
126. Pan H., Liu S., Ma Y., Tong S., Sun Y. Ehrlichia-like organism gene found in small mammals in the suburban district of Guangzhou of China. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2009; 990: 107–11.
127. Parola P., Inokuma H., Camicas J.L., Brouqui P., Raoult D. Detection and identification of spotted fever group Rickettsiae and Ehrlichiae in African ticks. Emerg. Infect. Dis. 2001 ; 7: 1014–7.
128. Parola P., Cornet J.P., Sanogo Y.O., Miller R.S., Thien H.V., Gonzalez J.P., Raoult D., Telford III S.R., Wongsrichanalai C. Detection of *Ehrlichia*

spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. J. Clin. Microbiol. 2003; 41: 1600–8.

129. Parola P., Davoust B., Raoult D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. Vet. Res. 2005; 36: 469–492.

130. Perez M., Rikihisa Y., Wen B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. J. Clin. Microbiol. 1996; 34: 2133–9.

131. Perez M., Bodor M., Zhang C., Xiong Q., Rikihisa Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2006; 1078: 110–7.

132. Petrovec M., Sumner J.W., Nicholson W.L., Childs J.E., Strle F., Barlič J., Lotrič-Furlan S., Avšič Županc T. Identity of ehrlichial DNA sequences derived from *Ixodes ricinus* ticks with those obtained from patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 209–10.

133. Petrovec M., Avsic Zupanc T. Epidemiology and ecology of ehrlichiosis in Europe. Intern. Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases: Book of abstracts. Ljubljana. 2002: 9.

134. Pinyoowong D., Jittapalapong S., Suksawat F., Stich R.W., Thamchai-penet A. Molecular characterization of Thai *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* strains detected in dogs. Infect. Genet. Evol. 2008; 8L 433–8.

135. Pfarr K.M., Hoerauf A.M. Antibiotics, which Target the *Wolbachia* Endosymbionts of Filarial Parasites: A New Strategy for Control of Filariasis and Amelioration of Pathology. Mini Rev. Med. Chem. 2006; 6(2): 203–210.

136. Popov V.L., Chen S.-M., Feng H.-M., Walker D.H. Ultrastructural variation of cultured *Ehrlichia chaffeensis*. J. Clin. Med. 1995; 43 (2): 411–21.

137. Popov V.L. Comparative ultrastructure of *Ehrlichiae*. Rickettsiae and rickettsial diseases: proceedings of the Vth International Symposium. Bratislava. Veda. 1996: 303–17.

138. Pozdnyakova O., Dorfman D.M. Human granulocytic ana-plasmosis. Blood. 2012; 13 (120): 4911.

139. Pritt B.S., Sloan L.M., Johnson D.K. H., . Munderloh U.G., Paske-witz S.M., McElroy K.M., McFadden J.D., Binnicker M.J., et al. Emergence of a New Pathogenic Ehrlichia Species, Wisconsin and Minnesota, 2009. New England Journal of Medicine. 2009. 365(5): 422–429.

140. Pritt B.S., Sloan L.M., Johnson D.K., et al. Emergence of a new patho-genic Ehrlichia species, Wisconsin and Minnesota, 2009. N Engl J Med. 2011; 365(5): 422–9.

141. Pusterla N., Anderson R.J., House J.K., Pusterla J.B., DeRock E., Madigan J.E. Susceptibility of cattle to infection with *Ehrlichia equi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2001; 218: 1160–2.

142. Rar V.A., Fomenko N.V., Dobrotvorskyy A.K. et al. Tick-borne pathogen detection, Western Siberia, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11: 1708–1715.
143. Rar V.A., Livanova N.N., Panov V.V., Doroschenko E.K., Pukhovskaia N.M., Vysochina N.P., Ivanov L.I. Genetic diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia* in Asian part of Russia. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2010; 1: 57–65.
144. Rar V.A., Epikhina T.I., Livanova N.N., Panov V.V., Doroschenko E.K., Pukhovskaia N.M., Vysochina N.P., Ivanov L.I. Genetic variability of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes persulcatus* ticks and small mammals in the Asian part of Russia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2011; 11:1013–1021.
145. Ravyn M.D., Goodman J.L., Kodner C.B., Westad D.K., Coleman L.A., Engstrom S.M., Nelson C.M., Johnson R.C. Immunodiagnosis of human granulocytic ehrlichiosis by using culture-derived human isolates. *Clin. Microbiol.* 1998; 36: 1480–8.
146. Ravyn M.D., Korenberg E.I., Oeding J.A., Kovalevskii Y.V., Johnson R.C. Monocytic *Ehrlichia* in *Ixodes persulcatus* ticks from Perm, Russia. *Lancet*. 1999; 353: 722–3.
147. Ravyn M.D., Kodner C.B., Carter S.E., Jarnefeld J.L., Johnson R.C. Isolation of the etiologic agent of human granulocytic ehrlichiosis from the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*). *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 335–338.
148. Reichard M.V., Roman R.M., Kocan K.M., Blouin E.F., de la Fuente J., Snider T.A., Heinz R.E., West M.D., Little S.E., Massung R.F. Inoculation of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) with Ap-V1 or NY-18 strains of *Anaplasma phagocytophilum* and microscopic demonstration of Ap-V1 in *Ixodes scapularis* adults that acquired infection from deer as nymphs. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009; 9: 565–568.
149. Rikihisa Y. The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 1991; 4: 286–308.
150. Rikihisa Y., Lin M. and Niu H. Type IV secretion in the obligatory intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum*. *Micro review. Cellular Microbiology*. 2010; 12 (9): 1213–21.
151. Ristic M., Holland C.I. Canine ehrlichiosis. *Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals*. Eds. Woldehiwet Z., Ristic M.: Pergamon Press, Oxford, 1993. P. 169–186.
152. Ristic M. and Huxsoll D. Tribe 11. *Ehrlichiae*. N.R. Krieg and J.G. Holt (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD. 1984; 1: 704–11.
153. Shibata S., Kawahara M., Rikihisa Y., Fujita H., Watanabe Y., Suto C., Ito T. New *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* isolated from *Ixodes ovatus* ticks in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 1331–8.

154. Schouls L.M., Van de Pol, Rijpkema S.G.T. and School C.S. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 2215–22.
155. Shpynov S., Fournier P.-E., Rudakov N., Tarasevich I. and Raoult D. Detection of members of the genera Rickettsia, Anaplasma and Ehrlichia in ticks collected in the Asiatic part of Russia. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2006; 1078: century of rickettsiology (emerging, reemerging rickettsioses, molecular diagnostics, and emerging veterinary rickettsioses): 378–83.
156. Skotarczak B. Canine ehrlichiosis. Ann. Agric. Environ. Med. 2003; 10: 137–41.
157. Spitalska E., Boldis V., Konstanova Z., Kocianova E., Stefanidesova K. Incidence of various tick-borne microorganisms in rodents and ticks of central Slovakia. Acta virol. 2008; 52: 175–9.
158. Takano A., Ando S., Kishimoto T., Fujita H., Kadosaka T., Nitta Y., Kawabata H., Watanabe H. Presence of a novel *Ehrlichia* sp. in *Ixodes granulatus* found in Okinawa, Japan. Microbiol. Immunol. 2009; 53: 101–6.
159. Tayler M.J., Bandi C., Hoerauf A. *Wolbachia*. Bacterial Endosymbionts of Filarial Nematodes. Advances in Parasitology. 2005; 60: 245–284.
160. Tate C.M., Mead D.G., Luttrell M.P., Howerth E.W., Dugan V.G., Munderloh U.G., Davidson W.R. Experimental infection of white-tailed deer with *Anaplasma phagocytophilum*, etiologic agent of human granulocytic anaplasmosis. J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 3595–601.
161. Theiler A. *Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov.). The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. Report to the Government, Transvaal, South Africa. Veterinary Bacteriology, Department of Agriculture. 1908–9, 1910, 7, 64.
162. Telford III S.R., Dawson J.E., Katavolos P., Warner C.K., Kolbert C.P., Persing D.H. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1996; 11: 6209–14.
163. Ueti M.W., Knowles D.P., Davitt C.M., Scoles G.A., Baszler T.V., Palmer G.H. Quantitative differences in salivary pathogen load during tick transmission underlie strain-specific variation in transmission efficiency of *Anaplasma marginale*. Infect. Immun. 2009; 77: 70–75.
164. Unver A., Perez M., Orellana N., Huang H., Rikihisa Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks and a human in Venezuela. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 2788–93.
165. Van Dobbenburgh A., van Dam A.P., Fikse E. Human granulocytic ehrlichiosis in Western Europe. N. Engl. J. Med. 1999; 340: 1214–16.

166. Vanicek J., Stastnik M., Kianicka B., Bares M., Bulik M. Rare neurological presentation of human granulocytic anaplasmosis. *Eur. J. Neurol.* 2013; 20 (5): 70–2.
167. Von Loewenich F.D., Scorpio D.G., Reischl U., Dumler J.S., Bogdan C. Frontline: control of *Anaplasma phagocytophilum*, an obligate intracellular pathogen, in the absence of inducible nitric oxide synthase, phagocyte NADPH oxidase, tumor necrosis factor, Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4, or TLR adaptor molecule MyD 88. *Eur. J. Immunol.* 2000; 34: 1789–97.
168. Von Loewenich F.D., Geissdörfer W., Disqué C., Matten J., Schett G., Sakka S.G., Bogdan C. Detection of "Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*" in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 2630–5.
169. Walker D.H., Dumler J.S. Emergence of the ehrlichioses as human health problems. *Emerg. Infect. Dis.* 1996; 2 (1): 18–27.
170. Welinder-Olsson C., Kjellin E., Vaht K., Jacobsson S., Wennerås C. First case of human "Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*" infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 1956–9.
171. Wen B., Rikihisa Y., Mott J., Fuerst P.A., Kawahara M. and Suto C. *Ehrlichiamuris* sp. nov., identified on the basis of 16S rRNA base sequences and serological, morphological, and biological characteristics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995; 45: 250–4.
172. Wen B., Jian R., Zhang Y., Chen R. Simultaneous detection of *Anaplasma marginale* and a new *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* by sequence analyses of 16S ribosomal DNA in *Boophilus microplus* ticks from Tibet. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 3286–90.
173. Wen B., Cao W., Pan H. Ehrlichiae and ehrlichial diseases in China. *Ann. NY Acad. Sci.* 2003; 990: 45–53.
174. Werren J.H., Baldo L., Clark M.E. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. *Nature reviews, microbiology.* 2008; 6: 741–751.
175. Yabsley M.J., Murphy S.M., Luttrell M.P., Wilcox B.R. & Ruckdeschel C. Raccoons (*Procyon lotor*), but not rodents, are natural and experimental hosts for an ehrlichial organism related to "Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*". *Vet Microbiol.* 2008a; 131: 301–8.
176. Yabsley M.J., Murphy S.M., Luttrell M.P., Wilcox B.R., Howerth E.W., Munderloh U.G. Characterization of "Candidatus *Neoehrlichia lotoris*" (family Anaplasmataceae) from raccoons (*Procyon lotor*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008b; 58: 2794–8.
177. Yen J.H., Barr A.R. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature.* 1971; 232: 657–8.

Производственно-практическое издание

Рудаков Николай Викторович

АНАПЛАЗМЫ И АНАПЛАЗМОЗЫ

Руководство для врачей



Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«Амплитек»
А. В. Ходяков

лист (алов)

Пронумеровано, скреплено и прошито
56 (подпись)

Редактор Г.И. Евсеева

Компьютерная вёрстка М.Е. Герасимова

Сдано в набор 10.07.2017. Подписано к печати 31.07.2017. Формат 60х84/16.

Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman. Печать оперативная.

Усл.-печ. л. 7,0. Уч.-изд. л. 8,37. Тираж 300. Заказ 104.

ООО «Издательский центр “Омский научный вестник”»

Тел.: 8-905-921-98-22. E-mail: evga-18@mail.ru

Отпечатано в ИП Гусев Сергей Владимирович
644080, г. Омск, просп. Мира, 7. Тел. 8-904-323-38-43