

УДК 616.37-007.2

Обзор Европейских рекомендаций по диагностике клещевых бактериальных инфекций

По материалам рекомендаций ESCAR (Исследовательская группа Европейского общества по клинической микробиологии и инфекционным болезням по изучению *Coxiella*, *Anaplasma*, *Rickettsia* и *Bartonella* и Европейской наблюдательной сети по клещевым инфекциям)*

В.В. Малеев

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва, Россия

Клещи представляют собой облигатных акарид-гематофагов, паразитирующих на всех классах позвоночных (включая человека) и широко распространенных во всем мире. Повышение осведомленности врачей-клиницистов и научных исследователей о переносимых ими болезнях привело к получению в последние годы новой информации о ряде клещевых бактериальных инфекций. С момента выявления роли *Borrelia burgdorferi* как возбудителя болезни Лайма в 1982 г., в Европе было описано 11 бактериальных патогенов, переносимых клещами. Этиологическая диагностика клещевых трансмиссивных инфекций часто вызывает затруд-

нения и основывается на данных специфических тестов, проводимых в специализированных лабораториях. Интерпретация полученных результатов чрезвычайно важна для постановки диагноза. Данные рекомендации были составлены с целью оказать помощь врачам-клиницистам и микробиологам в диагностике инфекций, передающихся в результате присасывания клеща, и обеспечить лучшее понимание данной группы заболеваний научной и медицинской общественностью.

Ключевые слова: *Borrelia*, болезнь Лайма, обзор, рекомендации, *Rickettsia*, клещевые трансмиссивные инфекции.

Контактный адрес:
Виктор Васильевич Малеев
Центральный научно-исследовательский институт
эпидемиологии
111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3-а

* P. Brouqui, F. Bacellar, G. Baranton, R. J. Birtles, A. Bjoërsdorff, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. Clin Microbiol Infect 2004; 10:1108–1132.

Review of Guidelines for the Diagnosis of Tick-Borne Bacterial Diseases in Europe

According to the guidelines of ESCAR (ESCMID Study Group on *Coxiella*, *Anaplasma*, *Rickettsia* and *Bartonella* and the European Network for Surveillance of Tick-Borne Diseases)

V.V. Maleyev

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Ticks are obligate haematophagous acarines that parasitise every class of vertebrate (including man) and have a worldwide distribution. An increasing awareness of tick-borne diseases among clinicians and scientific researchers has led to the recent description of a number of emerging tick-borne bacterial diseases. Since the identification of *Borrelia burgdorferi* as the agent of Lyme disease in 1982, 11 tick-borne human bacterial pathogens have been described in Europe. Aetiological diagnosis of tick-transmitted diseases is often difficult

and relies on specialised laboratories using specific tools. Interpretation of laboratory data is very important in order to establish the diagnosis. These guidelines aim to help clinicians and microbiologists in diagnosing infection transmitted by tick bites and to provide the scientific and medical community with a better understanding of these infectious diseases.

Key words: *Borrelia*, Lyme disease, review, guidelines, *Rickettsia*, tick-borne diseases.

Введение

Клещи представляют собой широко распространенных во всем мире облигатных акарид-гематофагов, паразитирующих на всех классах позвоночных, включая человека. Повышение интереса научной и медицинской общественности к переносимым ими болезням привело к получению в последние годы новой информации о ряде клещевых бактериальных инфекций. С момента выявления роли *Borrelia burgdorferi* как возбудителя болезни Лайма в 1982 г., в Европе было описано 11 бактериальных патогенов, переносимых клещами [1, 2].

Россия является одним из самых больших ареалов клещевых трансмиссивных инфекций в мире; данные заболевания отмечаются на территории 56 административных единиц нашей страны. В 1992 г. с введением обязательной регистрации заболеваемости клещевым боррелиозом было зафиксировано 2477 случаев инфекции. В последующие годы их число неуклонно возрастало, достигнув к 2003 году 8669 случаев или 6,04 на 100 тыс населения, причем в ряде регионов, таких как Томская, Костромская, Кировская области и Удмуртская республика он был значительно выше (70, 42,7, 39 и 33 случая соответственно). Ежегодно в медицинские учреждения России обращаются за помощью после укуса клеща в среднем 150 тыс. человек. Вместе с тем в 2004 году только в 19 регионах России было зарегистрировано в этой связи почти 234 тысячи обращений. Однако показано, что только в 5–7% случаев присасывания клеща сопровождается инфицированием риккет-

сиями [3]. В то же время истинная распространенность клещевых трансмиссивных инфекций также как и их структура на территории нашей страны неизвестны и должны быть объектом целенаправленных исследований.

Данная статья представляет собой обзор рекомендаций ESCAR (Исследовательская группа Европейского общества по клинической микробиологии и инфекционным болезням по изучению *Coxiella*, *Anaplasma*, *Rickettsia* и *Bartonella*) и Европейской наблюдательной сети по клещевым инфекциям. Представленные рекомендации были разработаны с целью оказать помощь клиницистам, работающим с данными инфекциями, а также микробиологам в процессе стандартизации методов диагностики, сопоставления микробиологических, клинических и эпидемиологических данных, а также разработки диагностических критериев. Дополнительная информация о заболеваниях, ограничениях диагностических методик, а также о самих клещах отражена в ряде других работ, представленных в списке литературы.

Риккетсиозы

Возбудители и переносчики

Возбудителями клещевых риккетсиозов являются облигатные внутриклеточные бактерии рода *Rickettsia* [1]. Многие риккетсии способны колонизировать клещей за счет трансстадийной (от личинки к нимфе и далее к взрослой особи) и трансвариальной (от поколения к поколению посредством

яиц) передачи. Клещи служат резервуаром для риккетсий и источником инфекции, поэтому география риккетсиозов определяется распространением самих клещей. Роль позвоночных как резервуара в поддержании зооантропонозных очагов окончательно не определена. При заражении человека патогенные риккетсии размножаются в эндотелиальных клетках, вызывая васкулит, являющийся патогенетической основой клинической и лабораторной картины риккетсиозов [1].

Ранее считалось, что *средиземноморская пятнистая лихорадка* (СПЛ), которая вызывается *Rickettsia conorii* и передается собачьим клещом *Rhipicephalus sanguineus*, является единственным широко распространенным в Европе риккетсиозом. В России она известна как марсельская лихорадка. Однако за последнее десятилетие в Европе были описаны пять новых клещевых риккетсиозов, включая инфекции, вызываемые *Rickettsia mongolotimonae* (Южная Франция) [4], *Rickettsia slovaca* (вся Европа) [5], *Rickettsia helvetica* (вся Европа) [6], *R. conorii* израильский штамм (Сицилия и Португалия) [7] и *R. conorii* астраханский штамм (Астрахань, Косово) [8]. Кроме того, *африканская клещевая лихорадка* (АКЛ), вызываемая *Rickettsia africae*, в настоящее время достаточно часто выявляется как болезнь путешественников у туристов, возвратившихся в Европу [9]. В США в 2004 г. была описана новая разновидность пятнистой лихорадки, вызываемая *Rickettsia parkeri* [10].

Каждый вид риккетсий способен переживать только в присущих ему одному или нескольких разновидностей клещей-переносчиков. Эпидемиологическими определяющими являются географическая распространенность, сезонная активность, особенности поиска объекта паразитирования и склонность клещей к укусам человека [1]. В дополнение к вышеописанным микроорганизмам у клещей может выделяться ряд других риккетсий, связь которых с заболеваниями людей пока не доказана [1].

Клиническая и лабораторная картина

Клинические симптомы клещевых риккетсиозов возникают на 6–10-й день после укуса и включают появление первичного аффекта на месте присасывания, представляющего собой типичный инкубационный струп («tache noir») и регионарный лимфаденит, общептоксикационный синдром в виде озноба, повышение температуры тела, головной и мышечной боли, высыпаний на коже [1]. Клиника варьирует в зависимости от вида риккетсии (табл. 1). Неспецифические лабораторные показатели включают тромбоцитопению с опусто-

ствующими нарушениями гемостаза, изменения лейкоцитарной формулы и повышение активности печеночных ферментов [11]. Исследования атипичных случаев привели к описанию новых клинических симптомов, которые были обусловлены микроорганизмами, ранее относимыми к «риккетсиям с неопределенной патогенностью», включая *R. slovaca* и *R. helvetica* [5, 6].

Забор и хранение диагностических образцов

До начала антимикробной терапии должно быть взято как минимум 5 мл крови в пробирку, содержащую гепарин или цитрат, для выполнения культурального исследования или ЭДТА для молекулярной диагностики. Пробирки с ЭДТА не следует использовать для хранения и транспортировки биологического материала, если планируется применять культуральный метод, так как ЭДТА оказывает повреждающее воздействие на монослой клеток, используемый для выделения риккетсий. Гепаринизированная кровь также может быть использована для иммуноцитологического выявления риккетсий в циркулирующих эндотелиоцитах. Если проведение культуральной или молекулярной диагностики (методом ПЦР) откладывается на срок более 24 ч, образцы (плазма, плазма с лейкоцитами или кровь) следует заморозить при -70°C или в жидком азоте для культурального исследования или при -20°C для молекулярной диагностики [1].

Для серологической диагностики необходимо забрать 10 мл крови на ранних стадиях заболевания и повторно спустя 2 нед. Отсутствие 4-кратного нарастания титра является показанием к забору третьего образца через 4–6 нед. Сыворотка может храниться при -20°C в течение нескольких месяцев. Альтернативным методом забора, хранения и транспорта образцов крови для серологического исследования является забор нескольких капель крови на поверхность промокательной бумаги. Образцы биопсии кожи (предпочтительно из зоны прикрепления клеща), полученные до начала антимикробной терапии, являются особенно ценным клиническим материалом и могут использоваться для культурального, иммуногистохимического исследования или ПЦР. При отсрочке проведения исследования биопсийный материал следует заморозить при -70°C (культуральное исследование или ПЦР) или поместить в формалин (иммуногистохимическое исследование) [1].

Диагностика

Серологические исследования. Серологические тесты являются наиболее простыми методами

Таблица 1. Географическая распространенность и симптоматика клещевых риккетсиозов в Европе

Заболевания	Риккетсии	Переносчики	Распространенность	Эпидемиологические характеристики	Клинические характеристики				
					повышение температуры	диффузная сыпь	струп	увеличение регионарных лимфоузлов	частота летального исхода в отсутствие терапии
Средиземноморская пятнистая лихорадка	<i>R. spongi</i>	<i>Rhipicerphalus sanguineus</i>	Средиземноморье ¹	Городские (2/3) Сельские (1/3) Поздняя весна и лето	100%	97% (у 10% пурпурная)	72%	Редко	1–2,5%
Клещевая лимфаденопатия	<i>R. slovaca</i>	<i>Dermacentor marginatus</i> <i>D. reticulatus</i>	От Западной Европы до Центральной Азии	Весна, осень и зима	24%	Редко (8%)	Да (волосяная часть головы)	Шейные (у 44% болезненные)	Нет
Израильская пятнистая лихорадка	<i>R. spongi</i> Израильский штамм	<i>Rh. sanguineus</i> ²	Португалия, Сицилия		Да	100%	Нет	Нет	<1%
Астраханская лихорадка	<i>R. spongi</i> Астраханский штамм	<i>Rh. pumilio</i> <i>Rh. sanguineus</i>	Астрахань, Косово		Да	100%	23%	Нет	Нет
Без названия	<i>R. ngolotimonae</i>	Не известен	Южная Франция ³		Да	Да	Да (могут быть множественными)	Нет	?
Без названия	<i>R. helvetica</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	От Северо-западной Европы до Центральной Азии		Да	?	?	?	?
Африканская клещевая лихорадка	<i>R. africae</i>	<i>Amblyomma hebraeum</i> <i>A. variegatum</i>	Центральная Африка Вест-Индия ⁴	«Привозное» заболевание Сафари Случаи групповые или эпидемические	81–92%	42–50% (у 50% везикулярная)	53–98% (у 55% множественные)	49–57%	

Примечание: 1 – может возникать в северных странах, поскольку клещи легко выживают в домах и среди людей;

2 – израильский штамм *R. spongi* до сих пор не был выявлен у клещей в Португалии, переносчик остается неизвестным для данной страны;

3 – зафиксированы сообщения о нескольких случаях;

4 – привезенная из Центральной Африки или Вест-Индии.

Таблица 2. Диагностическое значение серологических тестов при риккетсиозах [1]

Заболевание	Тест	Ч	Сп	ППУ	ОПУ
Пятнистая лихорадка Скалистых гор ¹	ИФА	100	–	–	–
Пятнистая лихорадка Скалистых гор ²	ИФА	–	–	–	–
	$\geq 1/64$	84,6	100		
	$\geq 1/32$	97,4	99,8		
Средиземноморская пятнистая лихорадка ³	ИФА $\geq 1/40$	–	–	–	–
	Образец на 5–9-й день	46			
	Образец на 20–29-й день	90			
	Образец после 29 дня	100			
Африканская клещевая лихорадка ⁴	–	–	–	–	–
	ИФА	26	100	100	–
	РПА	83	100	100	–
	ИБ	53	100	100	–
	IF+CA+WB	56			

Примечание: Ч – чувствительность; Сп – специфичность; ППУ – положительный предсказательный уровень; ОПУ – отрицательный предсказательный уровень; ИФА – иммуноферментный анализ; РПА – реакция перекрестной абсорбции; ИБ – иммуноблоттинг.

¹ – 60 парных сывороток, включая образцы со стационарными титрами (5%) и 4-кратным увеличением титров (95%);

² – исследование 417 сывороток от 178 пациентов с низкой вероятностью инфицирования риккетсиями и 88 образцов сыворотки от 41 пациента с высокой вероятностью инфицирования пятнистой лихорадкой Скалистых гор;

³ – протестированы 184 образца;

⁴ – 414 пациентов протестированы на инфицирование *R. africae*; у 39 из них диагноз подтвержден ПЦР или данными культурального исследования, у 81 – ИФА+ИБ+РПА.

диагностики клещевых риккетсиозов. *Микроиммунофлуоресценция* (МИФ) считается референтным методом [12] и может применяться для выявления IgM и IgG в сыворотке в острую фазу и в период реконвалесценции. Согласно данным Unité des Rickettsies (Марсель) титр IgG ≥ 128 и/или титр IgM ≥ 64 является индикатором инфицирования *R. conorii* при подозрении на СПЛ, в то время как титр IgG ≥ 64 и/или титр IgM ≥ 32 – индикатором инфицирования другими риккетсиями. IgG и IgM обычно выявляются к 7–15 дню с момента возникновения заболевания. Изменение концентрации IgG и IgM в ответ на инфицирование *R. africae* у пациентов с АКЛ наступает позднее – средние сроки сероконверсии – 28 и 25 дней с момента возникновения заболевания для IgG и IgM соответственно [13]. Показано, что терапия доксициклином в первые 7 дней от начала заболевания предотвращает образование антител к *R. africae* [13]. Таким образом, чувствительность МИФ на ранних стадиях АКЛ является низкой и для подтверждения диагноза у пациентов с подозрением на наличие инфекции, вызванной *R. africae*, рекомендуется использовать сыворотку, забранную через 4 недели с момента возникновения заболевания [13]. Существует предположение, что серологический ответ также развивается более медленно

у пациентов, инфицированных *R. slovaca*, что требует дальнейшего изучения, поскольку количество исследованных пациентов было незначительным.

При интерпретации результатов серологических тестов следует учитывать перекрестную реактивность среди риккетсий группы пятнистой лихорадки, в связи с чем тесты на выявление одного антигена не позволяют сделать однозначный вывод об этиологическом агенте [14]. Выявление ряда антигенов на одном планшете позволяет определить этиологический агент по сравнительно более высокому уровню антител к нему [9]. Использование метода иммуноблоттинга (Western blotting) может в ряде случаев сопровождаться ложноположительными результатами из-за перекрестно реагирующих антител, преимущественно к липополисахариду. Однако данный метод может применяться на ранних стадиях СПЛ. Иммуноблоттинг, особенно при использовании сывороток после перекрестной абсорбции, может также применяться для определения вида риккетсий, вызвавших инфекцию, однако данная техника доступна только в референтных лабораториях [15]. В табл. 2 представлена сравнительная диагностическая способность вышеупомянутых серологических тестов. В табл. 3 изложены диагностические критерии интерпретации результатов стандартной процедуры МИФ.

Таблица 3. Стандартная процедура диагностики риккетсиозов при возникновении перекрестной реактивности между несколькими риккетсиозными антигенами в реакции микроиммунофлуоресценции [12]

1. Риккетсиозный антиген считается вовлеченным в инфекционный процесс в случаях, когда титры IgG и/или IgM против данного антигена, по крайней мере, на 2 разведения выше, чем против других риккетсиозных антигенов.
2. Если различия в титрах между антигенами составляют < 2 разведений, используется иммуноблоттинг. Об участии риккетсиозного антигена в инфекционном процессе свидетельствует избирательная реактивность к его специфическим протеинам в сыворотке, забранная в острую фазу инфекции.
3. При неинформативности иммуноблоттинга выполняется реакция перекрестной абсорбции при титре IgG/IgM $\geq 128/32$. К специфическим диагностическим критериям после ее проведения относятся: (1) положительный результат иммуносерологического исследования для одного антигена; или (2) иммуноблоттинг, показывающий избирательную реактивность к специфическим протеинам данного антигена.

Методы иммунодетекции могут также применяться для идентификации риккетсий в биопсийных образцах и у членистоногих.

Культивирование. Выделение риккетсий от клеща или у пациента чрезвычайно важно, поскольку является абсолютным диагностическим критерием. Риккетсии группы пятнистой лихорадки относятся к облигатным внутриклеточным патогенам и представляют собой короткие палочки [1]. Риккетсии можно выращивать *in vitro* на клеточных культурах тканей, однако выделение должно проводиться только в лабораториях III степени биологической безопасности (по техническому регламенту биологической безопасности РФ – 2-я степень). Риккетсии выделяют преимущественно из крови (отфильтрованная плазма на гепарине или цитратном антикоагулянте), из биопсийных образцов кожи (оптимально – из области инокуляционного струпа) или биомассы клещей. Техника центрифугирования монослоя клеток (*centrifugation shell vial technique*), разработанная для культивирования цитомегаловируса и раннего выявления антигенов, была в последующем адаптирована для выделения *R. conorii*. В большинстве случаев культивируемые микроорганизмы определяются через 48–72 ч с момента инокуляции [1]. При исследовании образцов, забранных до назначения антибактериальных препаратов от 157 пациентов с подозрением на СПЛ, *R. conorii* была выделена у 59% пациентов с сопутствующим титром при МИФ $\leq 1/32$ [12]; у 34 из них *R. conorii* выявлялась уже через 3 дня с момента укуса клеща, т. е. до наступления сероконверсии. Однако, если инокуляция не производилась в день забора материала и образцы оставляли при комнатной температуре или при температуре 4 °C на ночь, ни одна культура не была положительной. При использовании техники монослоя клеток, в силу небольшой площади (1–2 см) участков поверхности, к которым прикреплены монослои, соотношение риккетсии/клетки увеличивается, что обеспечивает лучшее выявление патогенов. Было показано, что

клетки Vero и L929 являются более подходящими для выделения риккетсий, нежели HEL или MRC5. Тем не менее, использование клеток HEL или MRC5 считается более удобным, поскольку после закрепления монослоя дальнейшее разделение предотвращается контактным ингибированием, и клетки могут использоваться для продолжительной инкубации. Центрифугирование монослоя клеток после введения материала, предположительно содержащего риккетсии, необходимо для обеспечения чувствительности теста, так как усиливает прикрепление риккетсий и их проникновение в клеточный монослой. Выявление риккетсий внутри клеток достигается микроскопией после окрашивания по методу Гименез, методами иммунодетекции или ПЦР. Если реакция иммунофлуоресценции отрицательна через 20 дней, культура считается отрицательной. При положительном результате проводится инокуляция на параллельные монослои для слияния HEL-клеток во флаконах в попытке выделить риккетсии.

Молекулярные методы. Использование молекулярной диагностики на основе ПЦР позволило создать чувствительные, специфичные и быстрые методы для выявления и идентификации риккетсий в крови, биопсийных образцах кожи и даже клещах. Наборы праймеров для выявления различных генов риккетсий известны и могут использоваться в любой лаборатории при наличии соответствующего оборудования.

Диагностические критерии

Диагностические критерии разработаны только для АКЛ (табл. 4) и СПЛ (табл. 5).

Анаплазмоз (эрлихиоз)

Возбудитель и его переносчики

Возбудитель человеческого (гранулоцитарного эрлихиозного) анаплазмоза – *Anaplasma phagocytophilum* (ранее называемая человеческая

Таблица 4. Диагностические критерии Африканской клещевой лихорадки (АКЛ); пациент расценивается как страдающий лихорадкой при наличии критериев А, В и С

Критерий	Характеристика критерия
А	Прямое выявление <i>R. africae</i> культуральным методом и/или ПЦР <i>или</i>
В	Клинические и эпидемиологические критерии с высокой степенью вероятности, свидетельствующие в пользу наличия АКЛ: множественные инокуляционные струпы и/или регионарный лимфаденит, и/или везикулезные высыпания, и/или наличие аналогичных симптомов у других членов той же группы путешественников, прибывших из эпидемической зоны (Центральная Африка или французская Вест-Индия) <i>и</i> положительный результат серологических тестов на риккетсии группы пятнистой лихорадки <i>или</i>
С	Клинические и эпидемиологические критерии, согласующиеся с инфицированием риккетсиозом группы пятнистой лихорадки и/или кожные высыпания, и/или единственный инокуляционный струп после путешествия в Центральную Африку или французскую Вест-Индию <i>и</i> данные серологических исследований, специфичные для недавнего инфицирования <i>R. africae</i> (сероконверсия или присутствие IgM $\geq 1:32$) с титром антител к <i>R. africae</i> , превышающим таковой к <i>R. conorii</i> по крайней мере на 2 разведения, и/или результаты иммуноблоттинга или реакции перекрестной абсорбции, специфичные для <i>R. africae</i> .

Таблица 5. Диагностические критерии Средиземноморской пятнистой лихорадки, вызываемой *Rickettsia conorii*

Критерий	Балл
Эпидемиологические критерии	
Пребывание в эпидемическом очаге	2
Возникновение в мае–октябре	2
Контакт (известный или возможный) с клещами собак	2
Клинические критерии	
Повышение температуры тела $> 39^{\circ}\text{C}$	5
Струп	5
Пятнисто-папулезная или пурпурная сыпь	5
Два из вышеуказанных критериев	3
Все три вышеуказанных критерия	5
Неспецифические лабораторные показатели	
Тромбоциты $< 150 \cdot 10^9/\text{л}$	1
АсАТ или АлАТ $> 50 \text{ ME}/\text{л}$	1
Бактериологические критерии	
Положительный результат культурального исследования крови на <i>Rickettsia conorii</i>	25
Выявление <i>Rickettsia conorii</i> в биопсийном образце кожи	25
Серологические критерии	
Однократное исследование сыворотки и титр IgG $> 1/128$	5
Однократное исследование сыворотки и титр IgG $> 1/128$ и IgM $> 1/64$	10
4-кратное повышение титра антител в 2 сыворотках, забранных с интервалом 2 нед	20

Примечание: АсАТ – аспарагиновая аминотрансфераза; АлАТ – аланиновая аминотрансфераза. Положительный диагноз ставится при сумме баллов ≥ 25 .

гранулоцитарная эрлихия, *Ehrlichia phagocytophilia*, *Ehrlichia equi*) был впервые описан на севере США в 1994 г. [16]. Он принадлежит к порядку *Rickettsiales*, относящемуся к α -*Proteobacteria*, и является облигатным внутриклеточным патогеном, паразитирующим на гранулоцитах человека и животных [1]. Связь данного микроорганизма с развитием инфекций у человека была обнаружена только недавно, однако его роль в возникновении клещевой лихорадки у крупного рогатого скота на территории Европы была отмечена еще в 1930-х гг. [1]. Данный патоген был выявлен методом ПЦР у иксодовых клещей в большинстве европейских стран, включая Францию [17], Словению [18], Швейцарию [19], Нидерланды [20], Северную Италию [21], Болгарию [22], Южную Норвегию [23], Балтийский регион России [24], Южную Германию [25], Великобританию [26] и Испанию [27]. Частота обнаружения *A. phagocytophilium* у клещей варьирует от 2 до 45% [17, 20].

Первый случай человеческого анаплазмоза в Европе был зарегистрирован в 1995 г. в Словении [28]. До этого в большинстве европейских стран имели место сообщения о положительных серологических пробах при инфекциях неизвестной этиологии [27, 29, 30]. В ряде случаев заболевание было подтверждено 4-кратным нарастанием титра специфических антител, наличием морул в циркулирующих гранулоцитах или выявлением микроорганизма в крови методом ПЦР. По имеющимся данным, на настоящий момент зарегистрировано только 22 подтвержденных случая инфекции, включая один в Нидерландах [31], 2 – в Швеции [32, 33], 13 – в Словении [28, 34, 35], один – в Испании [36], один – в Австрии [37], 3 – в Польше [38] и один – во Франции [39].

Клиническая и лабораторная картина

Человеческий анаплазмоз является остро протекающей инфекцией. Большинство пациентов четко указывают на укус клеща перед возникновением заболевания. Длительность инкубационного периода варьирует от 5 до 21 дня (в среднем 11). В большинстве случаев инфицирование происходит между апрелем и октябрём, а пик заболеваемости приходится на июль. Анаплазмоз начинается с острой неспецифической лихорадки ($>38,5$ °C), ознобов, сильной головной боли, миалгий и/или артралгий. Инфекция значительно чаще возникает у мужчин, а возраст пациентов варьирует в пределах 11–73 года. Длительность лихорадки составляет 2–11 дней (в среднем 10). Реже наблюдаются тошнота, боли в животе, диарея, кашель. Высыпания на коже и нарушение ори-

ентации наблюдаются крайне редко. Результаты объективного обследования часто неспецифичны. Интересен тот факт, что несколько случаев человеческого анаплазмоза протекали как атипичная пневмония [39].

Приблизительно половина пациентов с острым анаплазмозом нуждается в госпитализации. Осложнения наблюдаются редко. Клинические симптомы и данные лабораторных исследований, приведенные для пациентов из стран Европы, аналогичны таковым, описанным у американских больных, однако заболевание у них имеет тенденцию к более легкому течению и более быстрому разрешению, даже при отсутствии специфической антимикробной терапии [34, 35, 40]. Не было сообщений о летальных случаях или развитии долговременных осложнений. В Европе до сих пор не зафиксировано хронических форм инфекции, хотя описано выявление ДНК *A. phagocytophilium* в крови выздоравливавшего пациента на 22-й день с момента возникновения заболевания и через 16 дней после нормализации температуры тела [35].

Лабораторные показатели могут оказать помощь в диагностике, однако изменения являются неспецифичными. Наиболее часто регистрируется тромбоцитопения (90%) и лейкопения (70%), обычно сопровождающиеся нарушением функции печени в виде небольшого повышения активности АСТ, АЛТ и, наиболее часто, ЛДГ. Повышение концентрации С-реактивного белка было обнаружено практически у всех пациентов с острым анаплазмозом. К более редким изменениям относят анемию, повышение сывороточной концентрации креатинина и азота мочевины в крови. В целом, все лабораторные изменения, обнаруженные у пациентов из стран Европы, разрешались в течение 14 дней с момента возникновения.

Острый человеческий анаплазмоз характеризуется клинической и лабораторной симптоматикой в значительной степени сходной с таковой в начальной фазе инфицирования вирусом клещевого энцефалита, являющегося эндемичным для стран Северной, Центральной и Восточной Европы. Сравнительная оценка клинических и лабораторных данных пациентов с этими двумя синдромами позволила выявить ряд значительных различий [41]. Заболевание человеческим анаплазмозом можно заподозрить при возникновении беспричинной лихорадки после укуса клеща или контакта с ним у пациента в эндемичном регионе.

Забор и хранение образцов

Для выделения возбудителя необходимо произвести забор крови в острой фазе заболевания,

Таблица 6. Диагностические критерии человеческого анаплазмоза

Подтвержденный человеческий анаплазмоз:
заболевание, сопровождающееся повышением температуры, в анамнезе укус клеща или контакт с клещом
и
доказанное инфицирование <i>Anaplasma phagocytophilum</i> при сероконверсии или при ≥ 4 -кратном нарастании титра антител ¹
или
положительный результат ПЦР с последовательным секвенированием ампликонов, доказывающий наличие <i>Anaplasma</i> -специфической ДНК в крови
или
выделение <i>A. phagocytophilum</i> при культуральном исследовании крови.
Возможный человеческий анаплазмоз:
заболевание, сопровождающееся повышением температуры, в анамнезе укус клеща или контакт с клещом
и
наличие стабильного титра антител к <i>A. phagocytophilum</i> в плазме крови, забранной в острую фазу и при выздоровлении, если титр в > 4 раз превышает диагностический уровень
или
положительный результат ПЦР без подтверждения последовательностей ²
или
наличие интрацитоплазматических морул в мазке крови.

Примечание: ¹ – при ИФА с использованием внутриклеточного или очищенного антигена в референтной лаборатории или диагностических наборов MRL Diagnostics (Cypress, США);
² – с использованием видоспецифических праймеров.

когда концентрация циркулирующих инфицированных нейтрофилов достигает наибольшего уровня [1]. Забор крови предпочтительно производить в емкость с ЭДТА и хранить при комнатной температуре не более 48 ч или замораживать при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до инокуляции [1]. Показано, что в образцах крови с цитратным антикоагулянтом, содержащих *A. phagocytophilum*, возбудитель сохраняется в течение 10 дней при комнатной температуре или 13 дней при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ [1]. Следует избегать использования гепарина в рутинной практике из-за его способности оказывать влияние на результаты ПЦР-диагностики. Транспортировку клинического материала в лабораторию следует осуществлять в максимально короткие сроки при комнатной температуре или при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, если время доставки превышает 48 ч.

Для серологических исследований производят забор, по крайней мере, 2 образцов сыворотки крови: в острую фазу и через 15–21 день в фазе реконвалесценции. Сыворотку хранят при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ или при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Данные о длительности и кинетике секреторного иммунного ответа при остром анаплазмозе в Европе носят ограниченный характер и полностью основаны на сообщениях из Словении. Значимые титры антител были выявлены у 40% пациентов через 2 года после первых проявлений инфекции [40].

Постановка диагноза на основании выявления инфицированных фагоцитов в мазках крови оптимальна, если мазки приготовлены немедленно после забора крови. Мазки высушивают на воздухе и хранят при комнатной температуре.

Диагностика

Серологические исследования. Выявление циркулирующих антител производится методом непрямой иммунофлуоресценции. Антигены, используемые для постановки реакции, варьируют. Антигеном к *A. phagocytophilum* покрывают поверхность стеклянных пластин, закрепляют охлажденным ацетоном или спиртом и хранят при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или в непроницаемой для света бумажной упаковке. Кроме того свободный от клеток антиген получают путем очищения инфицированной культуры клеток и хранят замороженным или при температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в 1% фосфат-буферном солевом растворе азида натрия. В последнем случае диагностическая пластина может быть приготовлена в день использования путем нанесения антигена с последующей фиксацией в холодном ацетоне или спирте [1].

Культивирование. Выделение *A. phagocytophilum* должно проводиться только в лабораториях III уровня биологической безопасности (2-го в России). Для культивирования патогена наиболее

широко используется линия клеток промиелоцитарной лейкемии HL-60 (ATCC CCL240). Рост этих клеток поддерживается на не содержащей антибиотиков среде RPMI-1640 с добавлением 2 mM глутамин и 20% сыворотки коровьего эмбриона в инкубаторе при 37 °C с 5% атмосферной концентрацией CO₂. Свежую кровь (100 мкл) или 0,5 мл лейкоцитарной фракции, полученной из предварительно замороженной при -20 °C крови с ЭДТА, инокулируют в колбу, покрытую HL-60 клетками плотностью 2×10⁵ клеток/мл. Степень инфицирования можно оценить при окраске клеток культуры CytoSpin по методу Гимзы. Инфицирование, как правило, проявляется формированием видимой морулы на 3–7-й день после инокуляции [1, 42].

Молекулярная диагностика. Методы на основе ПЦР еще не стандартизированы и могут показывать противоречивые результаты. ДНК *A. phagocytophilum* выявляют в крови и сыворотке пациентов в острой фазе инфекции (до 21 дня) [43]. Адекватно были оценены лишь несколько методик, описаны некоторые мишени для ПЦР. При изучении случаев человеческого анаплазмоза, подтвержденных сероконверсией, ПЦР, «мишенью» которой являлся фрагмент *epank*-гена, выявила ДНК у всех пациентов. В то же время реакция, «мишенью» которой служил фрагмент гена 16S рРНК, не показала аналогичных результатов [44]. Оценка ограничений данной методики на основании 13 опубликованных исследований ПЦР-анализа показала, что наибольшей чувствительностью обладала реакция, направленная на выявление *msp2* гомологов или 16S рРНК [45]. Различия в чувствительности ПЦР могут быть связаны с длиной использованных ампликона и праймера. Какой бы фрагмент ДНК не был выбран в качестве «мишени», установление последовательностей является обязательным для его идентификации. Использование родоспецифической ПЦР более широкого спектра не рекомендуется, поскольку информация об истинных отличительных признаках *A. phagocytophilum* или рода *Anaplasma* крайне ограничена [1, 20]. До тех пор, пока проблема чувствительности и специфичности различных методов исследований не будет до конца решена, в клинической практике рекомендуется применять наиболее изученные методики.

Критерии диагностики

Сообщений о случаях острого анаплазмоза у людей слишком мало, чтобы охарактеризовать спектр клинических проявлений инфекции на территории Европы. Критерии диагностики, суммированные в табл. 6, основаны на эпидемиологических, клинических и лабораторных данных, приво-

дившихся в сообщениях о случаях анаплазмоза в Европе, а также на результатах диагностических методик, описанных выше.

Болезнь Лайма

Возбудитель и его переносчики

Болезнь Лайма является заболеванием с множественным поражением органов и систем. Она вызывается *Borrelia burgdorferi sensu lato* (sl), которая представляет собой подвижную спирохету длиной 20–30 мкм и шириной 0,2–0,3 мкм [1]. Выделяют три варианта патогенных для человека *B. burgdorferi* sl, а именно: *B. burgdorferi sensu stricto* (ss), *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii* [46, 47]. В Северной Америке встречается только *B. burgdorferi* ss, тогда как на территории Европы персистируют все три микроорганизма. Еще один вид, *Borrelia lonestari*, согласно ряду сообщений, также способен вызывать заболевания у человека [48]. Недавно были описаны другие виды: *Borrelia japonica* [49], *Borrelia andersonii* [50], *Borrelia lusitaniae* [51], *Borrelia miyamotoi* [52], *Borrelia turdae* [53], *Borrelia tanukii* [53] и *Borrelia valaisiana* [54]. По неподтвержденным предположениям последний из них может быть патогенным для человека.

Иксодовые клещи переносят все виды бактерий, принадлежащие к *B. burgdorferi* sl. Личинки и нимфы клещей паразитируют на мелких грызунах и птицах, тогда как взрослые особи – на млекопитающих (олени, домашние и дикие плотоядные животные, крупный рогатый скот). Питание иксодовых клещей (в Европе преимущественно *I. ricinus*) является длительным процессом (от нескольких дней до >1 недели). В течение этого времени степень распространения клещей зависит от источника питания. Птицы, особенно пересекающие море в период миграции, могут переносить клещей (*Ixodes uriae*) на очень большие расстояния и таким образом способствовать распространению боррелий (особенно *B. garinii*) по всему миру [1]. Существует связь между разновидностью *B. burgdorferi* sl spp. и видом животного-«хозяина», например для *B. afzelii* – это мелкие грызуны, *B. garinii* и *B. valaisiana* – птицы [1].

Клиническая и лабораторная картина

Клинические симптомы болезни Лайма различаются при инфицировании *B. burgdorferi* ss, *B. afzelii* и *B. garinii* [1, 55]. Выделяют три стадии заболевания: I – ранняя/локализованная инфекция; II – ранняя/диссеминированная инфекция; III – поздняя/персистирующая инфекция. Ранние клинические проявления (стадия I) включают

Таблица 7. Типы образцов, используемых в диагностике болезни Лайма [55]

Клинические проявления	Образец для	
	прямого выявления патогена	выявления антител
Стадия I – ранняя/локализованная инфекция (дни – недели после укуса клеща):		
мигрирующая эритема	Биопсийный образец кожи	Плазма
Стадия II – ранняя/диссеминированная инфекция (недели – месяцы после укуса клеща):		
множественные эритематозные очаги	Биопсийный образец кожи	Плазма
боррелиозная лимфоцитома	Биопсийный образец кожи	Плазма
лайм-кардит	Биопсия эндокарда	Плазма
офтальмоборрелиоз	ЦСЖ	Парные плазма/ЦСЖ* Плазма
Стадия III – поздняя/персистирующая инфекция (месяцы – годы после укуса клеща):		
артрит	Синовиальная жидкость, синовиальная биопсия	Плазма
хронический атрофический акродерматит	Биопсийный образец кожи	Плазма
хронический нейроборрелиоз	ЦСЖ	Парные плазма/ЦСЖ*

Примечание: ЦСЖ – цереброспинальная жидкость;

* забор парных образцов плазмы/ЦСЖ производится в те же сроки, что и для выявления антител в плазме/ЦСЖ.

поражение кожи – *мигрирующая эритема* (МЭ), которая является патогномоничным симптомом инфицирования всеми тремя видами боррелий и возникает в ранние сроки на месте укуса клеща в виде постепенно увеличивающегося очага эритемы. В отдельных случаях возможно появление вторичных кольцевидных очагов. К редким, но типичным кожным симптомам относят боррелиозную лимфоцитому – синюшно-красный опухолеподобный инфильтрат на коже, наиболее часто локализующийся в области мочки уха, сосков или ареолы грудной железы. Поражение суставов развивается в период от нескольких недель до 2 месяцев с момента возникновения инфекции в виде полиартралгии или истинного артрита, как правило, коленного сустава (80% нелеченых пациентов в США) (II стадия). Существует мнение, что артрит при болезни Лайма наиболее часто развивается при инфицировании *B. burgdorferi* ss, однако данная гипотеза остается спорной [55].

Неврологические проявления наиболее часто возникают при инфицировании *B. garinii* и варьируют от изолированного менингита до энцефалопатии, включая менингоградикулит и повреждения черепных нервов (часто паралич лицевого нерва). В целом, данные проявления относят к поздним признакам инфекции, но которые могут наблюдаться и в период МЭ. В 5% случаев в течение нескольких недель после возникновения болезни наблюдается вовлечение в патологический процесс сердца,

обычно с появлением электрокардиографических признаков миокардита (нарушения проводимости и в отдельных случаях атриовентрикулярная блокада). *Хронический атрофический акродерматит* (ХАА) развивается при инфицировании *B. afzelii* и обычно наблюдается через несколько лет (III стадия) после появления МЭ. ХАА начинается с возникновения очагов синюшно-красного цвета, часто с мягкой инфильтрацией, которые затем переходят в участки атрофии кожи и иногда осложняются склеродермическими изменениями.

Забор и хранение образцов

При культивировании боррелий ключевым фактором является забор и хранение образцов в асептических условиях. Биологические жидкости транспортируются без каких-либо добавок, а биопсийный материал – помещенным в небольшое количество стерильного изотонического раствора хлорида натрия или подходящей для культивирования среды [55]. Образцы следует доставлять в лабораторию в максимально короткие сроки – в пределах 2–4 ч после забора. Если транспортировка почтой неизбежна, рекомендуется доставка в те же сутки.

Образцы, используемые в диагностике Лайм-боррелиоза

Сыворотка крови является одним из предпочтительных образцов (табл. 7), так как в диагностике

Таблица 8. Характеристика гуморального иммунного ответа при болезни Лайма [60]

Стадия	Иммунный ответ
I – ранняя/локализованная инфекция	Начальный ответ IgM (с третьей недели с момента инфицирования) с последующим появлением IgG антител (с 6-й недели с момента инфицирования). Часто выявляется серонегативность. IgM антитела иногда не определяются при короткой длительности инфекции
II – ранняя диссеминированная инфекция	Иммунный ответ аналогичен таковому на стадии I, с преобладанием IgG антител. Продукция интратекальных антител при нейроборрелиозе
III – поздняя/персистирующая инфекция	Как правило, высокие титры IgG антител при артрите и акродерматите. IgM антитела обычно не выявляются. Продукция интратекальных антител при хроническом нейроборрелиозе

болезни Лайма широко используются серологические исследования. При подозрении на нейроборрелиоз проводится забор спинномозговой жидкости и парных образцов сыворотки для определения количественного и качественного клеточного состава, концентрации белка и интратекального синтеза иммуноглобулинов. Наиболее быстрым способом подтверждения диагноза нейроборрелиоза является выявление интратекальной продукции боррелия-специфичных антител. Спинномозговую жидкость также можно использовать для проведения культурального исследования или ПЦР, однако чувствительность методов при данных условиях не превышает 20% [56]. Исследование синовиальной жидкости или, предпочтительно, синовиального биопсийного образца, с помощью ПЦР рекомендуется при подозрении на Лайм-артрит [57]. Благодаря высокой проницаемости эпителия суставной сумки для белка в синовиальной жидкости и плазме содержатся практически одинаковые титры антител. Биоптаты кожи являются оптимальным материалом для выделения *B. burgdorferi*. Спирохеты выделяются у большинства нелеченых пациентов с ранними или поздними кожными проявлениями боррелиоза (МЭ и ХАА соответственно). Частота положительного результата культурального исследования у пациентов с МЭ (до 86%) повышается при заборе биопсийных образцов в пределах 4 мм от краевой зоны роста очага [58]. В отсутствие терапии *B. burgdorferi* может персистировать в коже длительное время, что подтверждается выделением микроорганизма после 10 лет существования акродерматита [59]. При наличии возможности биопсийный материал сердца, головного мозга или глаз также может использоваться для выделения боррелий. В рамках эпидемиологических исследований часто изучают клещей на наличие боррелий для оценки степени риска заражения человеческой популяции в данном гео-

графическом регионе (см. заключительный раздел рекомендаций).

Диагностика

Серологические исследования. Доступные в настоящее время методики исследования часто не позволяют выявить специфические антитела на ранней стадии инфекции, однако на II стадии заболевания нередко обнаруживают IgG-антитела (табл. 8). В большинстве случаев нейроборрелиоза определяются также интратекальные антитела в ликворе [1]. У пациентов с инфекцией в III стадии, как правило, наблюдается высокий титр IgG, особенно при наличии артрита или ХАА [61]. Однако при поздних проявлениях инфекции IgM выявляются только у отдельных пациентов (10–40%, в зависимости от использованного метода) [62]. Интратекальные антитела продуцируются при хроническом нейроборрелиозе, и их обнаружение является наиболее важным диагностическим критерием, так как прямые методы выявления патогена могут показывать отрицательный результат, а IgM обычно не определяются.

Несмотря на широкое использование реакций по выявлению специфического иммунного ответа против *B. burgdorferi*, наличия антител в отсутствие клинической симптоматики недостаточно для постановки диагноза Лайм-боррелиоза. Серологическая диагностика затрудняется перекрестной реактивностью антигенов боррелий с антигенами других возбудителей, отсроченным появлением или даже стойким отсутствием иммунного ответа на ранней стадии Лайм-боррелиоза, а также отсутствием маркера активности заболевания на поздних стадиях.

Множество коммерческих наборов, предлагаемых в настоящее время для выявления антител против *B. burgdorferi*, недостаточно изучены. В основе их использования лежат разнородные диагности-

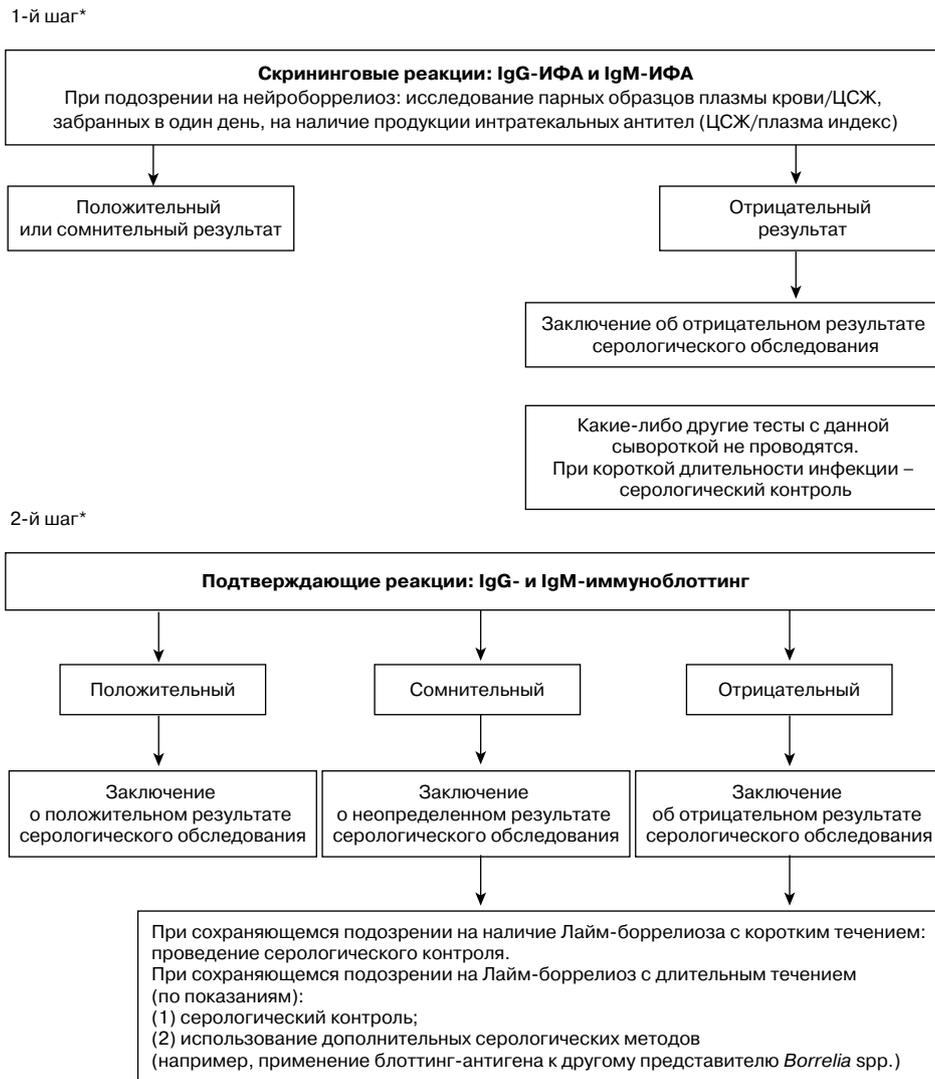
ческие критерии, нередко не известные как лаборантам, так и клиницистам. Несмотря на серийный выпуск теста фиксации комплемента, его применение для диагностики Лайм-боррелиоза не рекомендуется. Принцип, лежащий в основе теста, позволяет предположить его недостаточную чувствительность для использования в качестве скринингового. Для выявления специфических IgG и IgM антител может применяться также реакция непрямой иммунофлуоресценции. *Иммуноферментный анализ* (ИФА) позволяет дифференцировать различные классы антител (IgG и IgM), что имеет высокую диагностическую важность. Существуют коммерческие тесты для определения IgA антител, однако из-за отсутствия доказательных данных о клинической значимости их выявления, использование этих методик не рекомендуется. В целом, ИФА-тесты второго и третьего поколения с большей степенью вероятности полезны в диагностике Лайм-боррелиоза по сравнению с другими серологическим скрининговыми тестами.

Иммуноблоттинг используется в настоящее время для подтверждения Лайм-боррелиоза, и, как правило, проводится только после получения положительных результатов скрининговых тестов. Для корректной интерпретации индивидуальных показателей реактивности сыворотки пациента необходимо иметь представление о диагностической значимости иммуногенных протеинов в зависимости от стадии инфекции. Например, в диагностике раннего Лайм-боррелиоза выраженность, по крайней мере, некоторых профилей при иммуноблоттинге (p41, OspC) должна приниматься во внимание. Поэтому каждый анализ требует точного внутреннего контроля для полуколичественной оценки интенсивности блотов. Доступен анализ антигенов целой клетки, при котором методом электрофореза производится разделение лизатов полной клетки боррелии, с последующим переносом протеинов на мембраны блотов. Производители предлагают также рекомбинантный антигенный анализ с использованием протеинов боррелий, полученных методом генной инженерии. Преимущество иммуноблоттинга с полноклеточным лизатом заключается в возможности выявления большего числа иммунореактивных белков. Главным недостатком является трудность различения специфических полос и полос перекрестной реактивности, что требует привлечения эксперта. При рекомбинантном иммуноблоттинге отбираются специфические комбинации гомологичных протеинов различных видов боррелий [63]. Длительное время считалось, что рекомбинантные блоты обладают меньшей чувствительностью по сравнению с блотами

полноклеточного лизата (с учетом, что последние проводились при стандартных условиях со штаммом, вырабатывающим диагностически значимые иммунодоминантные протеины). Однако чувствительность рекомбинантного иммуноблоттинга в настоящее время значительно повысилась благодаря добавлению рекомбинантного VlsE, белка, изначально продуцировавшегося только *in vivo* [64]. Решающим критерием, квалифицирующим иммуноблоттинг как адекватный подтверждающий метод диагностики, является четкая идентификация иммунореактивных полос. Многочисленные тесты с использованием антигенов различных штаммов или генотипов *B. burgdorferi* sl доступны для широкого использования. В принципе, следует применять только тесты, обеспечивающие однозначную интерпретацию диагностически значимых полос. Еще одним условием является надежная, т. е. основанная на их идентификации моноклональными антителами, спецификация данных плоск производителем.

Не существует одного оптимального теста серодиагностики Лайм-боррелиоза. Используемые методы следует логически комбинировать для достижения максимально возможной диагностической эффективности. Рекомендуется использовать пошаговый диагностический подход, при котором на первом этапе проводится скрининговый тест, как описано выше (см. рисунок). При положительном или сомнительном результате теста для подтверждения проводится иммуноблоттинг. Двухступенчатый протокол был также рекомендован Центрами по контролю и профилактике заболеваний (CDC, США) [65], целью которого является повышение претестовой вероятности, что достигается только при последовательном выполнении тестов. При получении положительного результата скринингового теста следует принять во внимание возможность перекрестной реакции с *Treponema pallidum*, что можно исключить путем проведения реакции гемагглютинации *T. pallidum*.

Культивирование. Культивирование боррелий должно проводиться только в определенных клинических ситуациях (см. табл. 7) и выполняться в референтных лабораториях. *B. burgdorferi* культивируется на искусственных полужидких средах (модифицированная среда Келли) [1]. Поскольку данный подход трудоемок и требует времени, он редко используется для рутинной диагностики Лайм-боррелиоза. Выделение боррелий потенциально обладает наиболее высокой диагностической значимостью у пациентов с подозрением на боррелиоз при отсутствии иммунного ответа (серонегативный Лайм-боррелиоз), например, при ати-



Примечание: * возможно проведение скрининга с использованием поливалентного метода (например, реакции иммуноагглютинации) с последующим определением класса Ig; иммуноферментный анализ также может использоваться в качестве скринингового метода.

Алгоритм диагностики Лайм-боррелиоза [55].

пичной МЭ, подозрении на нейроборрелиоз, когда не определяются интратекальные антитела, или при подозрении на Лайм-боррелиоз у пациентов с иммунодефицитными состояниями. Такие серонегативные случаи часто характеризуются короткой продолжительностью заболевания. Попытки культивирования боррелий могут быть оправданными и у серопозитивных пациентов, например при наличии дерматологических симптомов, которые нельзя однозначно отнести к Лайм-боррелиозу.

Молекулярная диагностика. Существуют многочисленные публикации по поводу приме-

нения различных модификаций ПЦР в диагностике болезни Лайма. Однако в настоящее время для диагностики боррелиоза не используются ни стандартизированный метод выделения ДНК, ни рутинный метод ПЦР. Более того, поскольку отрицательный результат ПЦР не может считаться показателем отсутствия боррелий, исключительное использование данного метода в настоящее время не рекомендуется для рутинной практики [1, 55]. Тем не менее, в отдельных случаях молекулярные методы могут рассматриваться как ценное дополнительное средство диагностики, особенно при

проведении в специализированных лабораториях с достаточно опытным персоналом и возможностями установления последовательностей продуктов амплификации. Как было упомянуто выше, не существует общепринятого стандартизированного метода подготовки образцов ДНК для диагностических тестов. До сих пор невозможно проводить сравнение результатов тестов молекулярной диагностики, полученных в различных лабораториях.

В описанных на настоящий момент методах ПЦР-анализа в качестве «мишеней» используются различные фрагменты ДНК боррелий, включая *ospA* и *ospB*, гены жгутикового белка или р66 (клон 2Н1), 16S рРНК гены, или 5S/23S рРНК межгенный спейсерный участок. Рекомендуется применение более чем одной последовательности в качестве «мишеней». За исключением подтвержденной высокой диагностической значимости исследования синовиальной жидкости или синовиальных биопсийных образцов при Лайм-артрите, молекулярные методы не превышают значительно по чувствительности культуральный. Например, было обнаружено, что при использовании биопсийного участка кожи и цереброспинальной жидкости в качестве источников образца ДНК молекулярные методы обладают чувствительностью – 60 и 25% соответственно [56, 66].

Оценка степени риска. Критерии диагностики пациентов с подозрением на Лайм-боррелиоз, опубликованные в 1996 г. Рабочей группой Европейского Союза по вопросам Лайм-боррелиоза (European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis, EUCALB) [67], суммированы в табл. 9.

Туляремия

Возбудитель и переносчики

Туляремия является зоонозным заболеванием, вызываемым *Francisella tularensis* – аэробной плеоморфной каталазоположительной грамотрицательной факультативно-внутриклеточной коккобациллой малого размера, плохо растущей на большинстве обычных питательных сред [1]. Выделяют три основных подвида или биовара *F. tularensis*, из которых *F. tularensis* subsp. *tularensis* (или *nearctica*, или биовар А) обладает наибольшей вирулентностью. Данный подвид является преобладающим в Северной Америке, однако недавно он был обнаружен и на территории Центральной Европы [68]. *F. tularensis* subsp. *palaeartica* (или *holarctica*, или биовар В) менее вирулентна, распространена в Европе, Азии и Северной Америке. Географической областью мало вирулентной *F. tularensis* subsp. *novicida* (биовар С) является Северная Америка

[1]. Туляремия может возникать как спонтанно, так и эпидемически. Случаи инфекции были зафиксированы на территории всей Европы за исключением Великобритании. Сообщалось о случаях туляремии более чем у 250 животных, включая млекопитающих (зайцы, кролики, грызуны), птиц, рыб, амфибий, членистоногих и паразитов [69]. Инфекция передается многочисленными путями. Человек может заражаться при присасывании клеща (*Dermacentor* spp. и *Ixodes* spp.), инфицированных млекопитающих, слепней или москитов, за счет прямого контакта с инфицированными животными (даже через неповрежденную кожу), при вдыхании инфекционного материала, употреблении контаминированной воды или пищи, а также при профессиональном контакте [1, 69–71]. К группе повышенного риска заражения относятся работники лабораторий, ферм, ветеринары, охотники, повара и мясники. Возникновение инфекции в большинстве случаев связано с присасыванием клеща и отмечается с мая по июль (65%), тогда как случаи, связанные с общением с животными (кролики, грызуны), возникают в период с ноября по декабрь (33%) и с мая по июль (22%) [1, 72, 73].

Клиническая и лабораторная картина

Тяжесть инфекции варьирует в зависимости от пути попадания инфекции в организм, биовара, количества инфекционного материала и состояния иммунной системы организма. Инкубационный период длится 1–21 день (в среднем 4–5). В классическом варианте туляремия является тяжелым заболеванием, характеризующимся внезапным повышением температуры, ознобами, головными болями, лимфаденопатией, миалгиями, недомоганием и слабостью [1, 72, 73]. Диссоциация пульса и температуры считается патогномоничным симптомом инфекции (42%). Описано шесть классических форм туляремии: язвенно-бубонная (49–75%) [1, 72, 73], бубонная (12,5–15,9%), глазо-бубонная (0,5–3,5%), орофарингеальная (0–9,2%), тифоидная (8–14%) и легочная (от 1,5 до > 50%).

Результаты неспецифических диагностических тестов часто недостаточно информативны. Количество лейкоцитов, как правило, нормальное или несколько повышено, иногда присутствуют атипичные лейкоциты [74]. Активность печеночных аминотрансфераз в плазме крови нередко повышена. В общем анализе мочи может выявляться пиурия (25% случаев). Результаты исследования ликвора в 70% случаев – в пределах нормы, но может выявляться повышенное количество мононуклеаров, белка и снижение концентрации глюкозы в спинномозговой жидкости [1, 74].

Таблица 9. Критерии диагностики болезни Лайма (на основании критериев EUCALB [60, 67])

Проявления заболевания	Основные клинические критерии	Вспомогательные клинические критерии	Лабораторные показатели ¹ (основные критерии)	Лабораторные показатели ¹ (вспомогательные критерии)
Эритема (хроническая) мигрирующая	Увеличивающееся по периферии красноватое или синюшно-красное пятно, часто с центральным просветлением; края четкие, интенсивно окрашенные, но без выраженного возвышения; локализуется вокруг места инокуляции или (редко) диссеминированная	Предшествующий укус клеща той же локализации	Нет	Выявление <i>B. burgdorferi</i> культуральным методом или ТАНК в биопсийном образце кожи, значительное нарастание титра специфических антител ² или выявление специфических IgM
Боррелиозная лимфоцитомы (редкий симптом)	Безболезненный синюшно-красный узел или пятно, обычно локализованное в области мочки уха, ушной раковины, соска или мошонки; чаще возникает у детей (особенно в области уха), чем у взрослых	Присутствующая или предшествующая МЭ	Выявление антител к <i>B. burgdorferi</i> (IgG и/или IgM) <i>или</i> значительное нарастание титра IgG антител к <i>B. burgdorferi</i>	Гистологические признаки В-клеточной псевдолимфоцитомы
Хронический атрофический акродерматит	Длительно сохраняющийся красный или синюшно-красный патологический очаг, обычно на тыльной поверхности конечностей. Возможно развитие начального рыхлого отека кожи, со временем переходящего в атрофию, а также индуративных изменений кожи над костными выступами	Высокая концентрация специфических IgG антител <i>или</i> характерные гистологические признаки и выявление <i>B. burgdorferi</i> культуральным методом <i>или</i> ТАНК биопсийного образца кожи		
Ранний нейроборрелиоз	Болезненный менинго-радикулоневрит с параличом или без паралича лицевого нерва, или парезом других черепных нервов (синдром Gajin – Vujadoix – Bannwarth). У детей наиболее часто возникает изолированный монолатеральный (иногда билатеральный) менингит, паралич лицевого или других черепных нервов	Присутствующая или предшествующая МЭ	Лимфоцитарный плеоцитоз в ЦСЖ ³ <i>и</i> выявление продукции интра-текальных специфических антител ⁴ <i>или</i> выявление <i>B. burgdorferi</i> культуральным методом или ТАНК в ЦСЖ	Специфические олигоклональные полосы при исследовании ЦСЖ; значительное нарастание титра специфических плазменных антител
Хронический нейроборрелиоз (крайне редко)	Длительно сохраняющийся энцефалит, менингоэнцефалит, энцефаломиелит, радикуломиелит		Выявление продукции интраклеточных специфических антител <i>и</i> лимфоцитарный плеоцитоз в ЦСЖ <i>и</i> выявление плазменных антител к <i>B. burgdorferi</i>	Специфические олигоклональные полосы при исследовании ЦСЖ

Лайм-кардит	Острое возникновение атриоventрикулярной блокады (II и III степени), аритмий, иногда миокардита или панкардита (контакт с клещом учитывают независимо от факта укуса)	Присутствующая или предшествующая МЭ	Выявление IgG и IgM антител к <i>B. burgdorferi</i> или значительное нарастание титра IgG антител к <i>B. burgdorferi</i> или выявление <i>B. burgdorferi</i> культуральным методом в биопсийном образце ткани сердца
Лайм-артрит	<p>1. Рецидивирующие короткие атаки объективно выявляющегося отека одного или нескольких крупных суставов, со временем переходящего в хронический артрит и Исключение других причин возникновения симптоматики <i>или</i></p> <p>2. Рецидивирующие короткие атаки объективно выявляющегося отека одного или нескольких крупных суставов, со временем переходящего в хронический артрит при отсутствии в анамнезе подтвержденных клинических проявлений болезни Лайма</p>	<p>1. Высокая концентрация специфических плазменных IgG антител <i>или</i> только в сочетании с основным клиническим критерием №2.</p> <p>2. Высокая концентрация специфических плазменных IgG антител и выявление <i>B. burgdorferi</i> культуральным методом <i>или</i> ТАНК в синовиальной жидкости и/или синовиальном биопсийном образце</p>	

Примечание. ТАНК – техника амплификации нуклеиновых кислот.

- 1 – при оценке лабораторных показателей должны учитываться особенности каждого метода, приведенные в тексте;
- 2 – концентрация специфических плазменных антител может повышаться как реакция на прогрессирование заболевания или сразу после начала антибактериальной терапии и снижаться при разрешении патологического процесса;
- 3 – плеоцитоз в ЦСЖ может отсутствовать, если прошел короткий промежуток времени (несколько дней) с момента возникновения заболевания, или у детей с изолированным параличом лицевого нерва;
- 4 – интрацеллюлярные антитела могут не выявляться к течению короткого промежутка времени после возникновения заболевания.

Забор и хранение образцов

Работа со всеми образцами от пациентов с подозрением на туляремию должна осуществляться в лаборатории III уровня биологической безопасности (2-го в России). Биопсийные образцы кожи (особенно инокуляционного струпа) или лимфатического узла, а также кровь (во флаконе с добавлением гепарина), образцы из гортани или мокрота могут использоваться для культивирования. Они должны быть исследованы немедленно или храниться при температуре -80°C для дальнейшей работы с ними. Образцы для проведения ПЦР (кровь с добавлением ЭДТА) могут храниться при -20°C . Для серологических исследований образцы крови следует забирать на ранней стадии инфекции и повторно через 2–4 нед.

Диагностика

Микроскопическое исследование мокроты, как правило, не информативно [1]. Есть данные о ложноположительных результатах реакции прямого флуоресцентного окрашивания антител к *Legionella* в образце, полученном при бронхоскопии [75]. Плевральная жидкость носит серозно-геморрагический характер, с преобладанием лимфоцитов; микроскопия с окрашиванием по Граму, как правило, сопровождается отрицательным результатом. Была описана высокая концентрация аденозин дезаминазы в плевральной жидкости [76]. При гистопатологическом исследовании биоптата лимфатического узла или абсцесса выявляется комбинация абсцессов и участков казеозного некроза с инфильтрацией множественными полиморфонуклеарными лейкоцитами [74, 77].

Серологические исследования. Серологические исследования остаются наиболее информативной техникой диагностики туляремии [1, 78]. Описано использова-

ние с данной целью различных методик, включая стандартную реакцию агглютинации в пробирке, реакцию микроагглютинации, гемагглютинации, иммунофлуоресценции и твердофазный ИФА. При стандартной реакции агглютинации в пробирке специфические антитела обычно выявляются через 2 нед после возникновения клинических симптомов и достигают максимальной концентрации через 3–4 нед [1]. Однократное выявление антител в титре $\geq 1:160$ считается диагностически значимым. Антитела, как правило, появляются через 2 нед после возникновения симптомов и достигают максимальной концентрации через 4–5 нед. Существуют данные о том, что реакция микроагглютинации обладает более высокой чувствительностью по сравнению со стандартной реакцией агглютинации в пробирке [78]. Диагностические титры для других методик серологического исследования окончательно не определены и могут варьировать в зависимости от географического региона, с более высокими титрами для эндемичных районов. Поскольку антитела могут персистировать длительное время [1], однократное их выявление не является достоверным диагностическим критерием туляремии. Четырехкратное нарастание титра антител или сероконверсия между двумя сыворотками, первая из которых была забрана при возникновении клинических проявлений, а вторая – в период выздоровления, являются значительно более специфичными критериями. Перекрестная реактивность, особенно с IgM антителами, была описана для *Francisella philomiragia* и *F. tularensis* [79], *Brucella* spp., *Proteus* OX19 и *Yersinia pestis*. Соответственно подвид *F. tularensis*, вызвавший инфекционный процесс, не может быть определен при исследовании только IgM антител.

Культивирование. Культуральный метод редко используется в диагностике туляремии, поскольку выделение патогена является как опасным, так и малоэффективным [80]. Согласно Taylor et al. [81], *F. tularensis* выделяется только в 10% случаев, причем чаще у пациентов с иммунодефицитными состояниями [82] и пневмонией (28%) [83]. *F. tularensis* высоко контагиозна в виде аэрозоля, поэтому работу с патогеном следует осуществлять только в лабораториях III уровня биологической безопасности [1]. Рекомендуется проведение вакцинации персонала, работающего с *F. tularensis* [1].

F. tularensis плохо поддается культивированию, однако возможно выделение микроорганизма на цистеиновой или обогащенной цистеином среде после инкубации в течение 2–4 дней при 37 °С с 5% атмосферной концентрацией CO₂. Исторически сложилось, что цистеин-глюкозозный кровяной

агар является наиболее широко используемой средой для выделения *F. tularensis* [1]. Рост также может быть на шоколадном агаре с добавлением IsoVitalex (BBL, Cockeysville, США) или PolyVitex (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Франция) и на автоматизированных системах с кровяными средами [1]. Однако обычные среды, содержащие кровь, как правило, остаются стерильными (87,5–95%) [83]. Колонии имеют серо-голубой цвет, округлые, гладкие, слегка слизистые с небольшой зоной α -гемолиза на кровяном агаре. Недавно сообщалось о выделении *F. tularensis* с использованием системы клеточного культивирования, обладающей некоторыми преимуществами над аксенической средой [84]. Она более универсальна и позволяет выделять ряд строгих и факультативных внутриклеточных патогенов, вызывающих поражение кожных покровов и/или лимфаденопатию; использование системы является также более безопасным, поскольку флаконы герметично закрываются после инокуляции клинического образца.

Молекулярная диагностика. В диагностике туляремии применяются различные методы ПЦР [85, 86], используются праймеры, специфически амплифицирующие фрагменты ряда генов, включая 16S рДНК [85] и ген, кодирующий 17-кДа липопротеин [86]. Данные методики позволяют выявить наличие ДНК *F. tularensis*, не выделяя данный патоген, что является более безопасным. Однако молекулярные методы обладают более высокой стоимостью по сравнению со всеми другими доступными диагностическими тестами.

Идентификация видов и подвидов

Описан ряд биохимических тестов, позволяющих дифференцировать подвиды и биовары *F. tularensis*. Реакция агглютинации с использованием специфической сыворотки позволяет идентифицировать *F. tularensis*, но не биовар микроорганизма [1]. Более точная дифференцировка достигается при использовании молекулярных биологических методов. Forsman с соавт. [87] и Sandstorm с соавт. [88] сообщали о проведении дифференцировки *F. tularensis* subsp. *tularensis* и *F. tularensis* subsp. *polarctica* на основании 16S рДНК последовательностей. Современные методы типирования на основе ПЦР успешно применялись для характеристики штаммов *F. tularensis*, включая ПЦР повторяющихся палиндромных межгенных последовательностей, ПЦР энтеробактериальных повторяющихся межгенных консенсусных последовательностей и амплификацию произвольных участков генома в условиях нестрогого связывания праймеров [89]. Сообщалось также об амплификации тандемов

Таблица 10. Критерии диагностики туляремии Центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC, США) [92]

Клинические проявления
<p>Заболевание, характеризующееся рядом определенных форм, включая следующие:</p> <ul style="list-style-type: none"> язвенно-бубонная (кожные язвы с региональной лимфаденопатией) бубонная (региональная лимфаденопатия без язв) глазо-бубонная (конъюнктивит с преаурикулярной лимфаденопатией) орофарингеальная (стоматит или фарингит или тонзиллит и цервикальная лимфаденопатия) интестинальная (интестинальные боли, рвота и диарея) легочная (первичное плеврально-легочное поражение) тифоидная (повышение температуры без легко локализуемых симптомов и синдромов) <p>Клиническая диагностика подкрепляется анамнестическими данными об укусе клеща или слепня, контакте с тканями млекопитающего, являющегося носителем <i>Francisella tularensis</i>, или с потенциально контаминированной водой</p>
<p>Лабораторные критерии диагностики</p> <p><i>Предположительные</i></p> <p>Высокий плазменный титр(ы) антител к антигену <i>F. tularensis</i> (без документально подтвержденного 4-кратного или более нарастания) у пациента с отсутствием вакцинации от туляремии в анамнезе или выявление <i>F. tularensis</i> в клиническом образце при флуоресцентной микроскопии</p> <p><i>Подтверждающие</i></p> <p>Выделение <i>F. tularensis</i> из клинического материала или</p> <p>4-кратное или более нарастание плазменного титра антител к антигену <i>F. tularensis</i></p>
<p>Классификация случаев инфекции</p> <p><i>Вероятный:</i></p> <p>соответствующие клинические проявления и лабораторные данные, свидетельствующие о возможном инфицировании</p> <p><i>Подтвержденный:</i></p> <p>соответствующие клинические проявления, подтвержденные данными лабораторных исследований</p>

коротких повторяющихся последовательностей [90]. Применение различных диагностических подходов в настоящее время облегчается расшифровкой всего генома *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu4 [91], хотя недавно возникшая проблема возможности использования микроорганизма с биотеррористическими целями привела к ограничению доступа к данной информации.

Критерии диагностики

В табл. 10 представлены критерии серологической диагностики туляремии, определенные Центрами по контролю и профилактике заболеваний (CDC, США).

Эпидемический возвратный тиф

Возбудители и переносчики

Эпидемический возвратный тиф (ЭВТ) представляет собой инфекционное заболевание, сопровождающееся возникновением одного или более при-

ступов лихорадки и септицемии. Инфекция встречается по всему миру и вызывается 16 различными представителями *Borrelia* spp., присутствующими у аргасовых клещей рода *Ornithodoros* (*Alectorobius*). ЭВТ является тяжелым заболеванием и при отсутствии лечения частота летального исхода достигает 5%. У каждого вида боррелий, вызывающих инфекцию, есть специфический клещ-переносчик. Сообщалось о спорадических случаях возвратного тифа, вызванного *Borrelia hispanica* в Южной Европе на территории Пиренейского полуострова, Греции и Кипра [1]. Микроорганизм переносится клещом *Ornithodoros erraticus*, который обычно паразитирует на грызунах и мелких млекопитающих. Новый вид боррелий, вызывающий ЭВТ, был выделен и описан в Испании в 1996 г. [93]. Недавно в Швеции у 2 из 301 исследованных иксодовых клещей были выявлены новые виды боррелий, близкородственные *Borrelia miyamotoi*, вызывающей ЭВТ [94]. Многие грызуны и мелкие млекопитающие служат естественным резервуаром инфекции.

Боррелии способны персистировать годами в долгоживущих клещах-переносчиках.

Клиническая и лабораторная картина

ЭВТ характеризуется острым повторяющимся повышением температуры, ознобами, головными болями, миалгиями, артралгиями и кашлем [55]. Могут наблюдаться геморагии (редко тяжелые), ирит или иридоциклит, гепато- или спленомегалия. Абдоминальные боли, тошнота, рвота, диарея и фотофобия нередко встречаются при инфекции, развившейся в Африке. К концу первого приступа лихорадки появляются высыпания на коже, часто возникают неврологические симптомы, которые могут быть тяжелыми [55]. Желтуха развивается у 7% пациентов. Частота летального исхода достигает 2–5%. Первичный приступ длится около 3 дней, за ним через 7 дней следует второй, более короткий и легкий. Впоследствии один или более приступов длительностью около 2 сут могут возникать с интервалом в несколько дней.

Забор и хранение образцов

Для исследования предпочтителен забор крови. Во время приступов лихорадки большое количество боррелий легко выявляется при микроскопии влажных и окрашенных мазков крови в темном или светлом поле. Выраженность септицемии может достигать 10^6 – 10^8 клеток/мл. Кровь пациентов в острой фазе инфекции также является наилучшим материалом для культурального исследования. Однако выраженность бактеремии уменьшается с каждым последующим приступом, что затрудняет визуализацию или культивирование боррелий после афебрильных периодов. Плазма может использоваться для выявления непрямых (антитела) свидетельств инфицирования боррелиями.

Диагностика

Исследование крови. Диагностика осуществляется на основании обнаружения боррелий в периферической крови у пациентов с лихорадкой. Чувствительность теста достигает 70% при микроскопическом исследовании мазков крови в темном поле или при окрашивании по методу Гимза или Райта. Количественный анализ светлого слоя кровяного сгустка был недавно охарактеризован как высоко чувствительный и специфичный метод выявления боррелий [95].

Серологические исследования. Серологические тесты не доступны для широкого применения, а их диагностическая ценность ограничена из-за антигенных вариаций боррелий, вызывающих ЭВТ [55].

Культивирование. *Borrelia duttonii*, возбудитель восточно-африканского ЭВТ, была успешно выделена в виде чистой культуры. Спирохеты культивируются при 33 °C на BSK II среде с добавлением альбумина V фракции бычьей плазмы (Sigma, St Louis, США) без добавления антибиотиков. Культуру поддерживают серийными пассажами каждые 2–3 дня [1].

Молекулярная диагностика. Описано применение «гнездовой» ПЦР (nested PCR), использующей в качестве «мишени» фрагменты 16S рНК кодирующего гена или жгутиковый ген, для выявления боррелий, вызывающих ЭВТ, в крови человека и у клещей [93, 94].

Роль клещей в диагностике переносимых ими инфекций

Сами клещи могут использоваться в диагностике переносимых ими инфекций. Этапы исследования включают идентификацию клеща(ей) на уровне вида и выявление или выделение инфекционных агентов.

Идентификация клеща

Клещи можно идентифицировать на уровне семейства, рода и вида на основании множественных таксономических признаков, известных для клещей из различных регионов мира. Однако идентификация, особенно при изучении личинки, может вызывать затруднения и потребовать энтомологических навыков. В настоящее время разрабатываются молекулярные методы идентификации клещей, позволяющие дифференцировать близкородственные виды [1].

Хранение клещей

Клещей можно хранить живыми в лаборатории при относительной влажности 85% и температуре от 15 °C до 25 °C (в зависимости от вида). Альтернативным вариантом является хранение в темном помещении при 0–5 °C и относительной влажности 95% сроком до 3 мес прежде, чем им потребуется питание. Однако содержание живых клещей является задачей специализированных лабораторий, поскольку их жизнеспособность не влияет на сохранность самого патогена. Оптимальным вариантом хранения следует считать замораживание клещей до –80 °C, поскольку большинство возбудителей инфекций при этом сохраняется в состоянии, пригодном для культивирования. Клещи, замороженные для длительного хранения, могут быть исследованы молекулярными методами на наличие патогенов. Для данных методов могут использоваться недавно погибшие клещи, в том числе высушенные и поврежденные.

Выявление бактерий в клещах

Исследование гемолимфы проводят у живых клещей путем ампутации дистального отдела ножки. Из истекающей гемолимфы делают мазок, окрашивают и исследуют под микроскопом на наличие бактерий. Клещи, сегмент ноги которых был ампутирован, могут сохраняться живыми и использоваться для дальнейшего исследования гемолимфы или других тестов. Для получения мазков-отпечатков можно использовать слюнные железы или яичники, удаленные из препарированных клещей; внутренние органы также могут подвергаться гистологическому исследованию. Для выявления микроорганизмов в гемолимфе или мазках внутренних органов применяют иммунологические методы. Стекла высушивают на открытом воздухе, фиксируют уксусом с последующей обработкой поликлональными или моноклональными антителами, конъюгированными иммунофлуоресцентными метками.

Выделение бактерий из клещей и их культивирование

В настоящее время риккетсии, как правило, выделяют с использованием системы клеточно-го культивирования, причем центрифугирование монослоя клеток с HEL фибробластами считается в большинстве референтных лабораторий опти-

мальной техникой. Капля гемолимфы с простерилизованного снаружи клеща инокулируется на единственный монослой клеток. Мертвые особи также могут использоваться после поверхностной дезинфекции. Клеща помещают в 1 мл среды для культивирования клеток и затем производят инокуляцию на монослой клеток или на специализированную BSK II среду роста для боррелий [1].

Молекулярная диагностика

Алгоритмы идентификации, основанные на последовательности различных генов ДНК, были описаны для бактерий персистирующих в клещах, а также для вирусов и паразитов. Детальный обзор данных подходов был опубликован [96].

В заключение необходимо отметить, что этиологическая диагностика клещевых трансмиссивных инфекций часто вызывает затруднения и зависит от обученного персонала специализированных лабораторий, использующих специфические методы. Интерпретация лабораторных данных также крайне важна для постановки диагноза.

Приведенные рекомендации составлены с целью оказать помощь врачам-клиницистам и микробиологам в диагностике инфекций, передающихся в процессе присасывания клеща, и обеспечить понимание значимости данных заболеваний научной и медицинской общественностью.

Литература

1. Brouqui P., Bacellar F., Baranton G., et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:1108-32.
2. Parola P., Raoult D. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7:80-3.
3. Ананьева Л.П. Лайм-боррелиоз, или иксодовые клещевые боррелиозы. I часть: этиология, клиника, диагностика. *Инфекции и антимикробная терапия* 2002; 4(2):42.
4. Fournier P.E., Tissot-Dupont H., Gallais H., et al. *Rickettsia mongolotimonae*: a rare pathogen in France. *Emerg Infect Dis* 2000; 6:290-2.
5. Raoult D., Lakos A., Fenollar F., et al. Spotless rickettsiosis caused by *Rickettsia slovaca* and associated with *Dermacentor* ticks. *Clin Infect Dis* 2002; 34:1331-6.
6. Fournier P.E., Gunnenberger F., Jaulhac B., et al. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, Eastern France. *Emerg Infect Dis* 2000; 6:389-92.
7. Bacellar F., Beati L., Franca A., et al. Israeli spotted fever rickettsia (*Rickettsia conorii complex*) associated with human disease in Portugal. *Emerg Infect Dis* 1999; 5:835-6.
8. Tarasevich I.V., Makarova V.A., Fetisova N.F., et al. Astrakhan fever, a spotted-fever rickettsiosis. *Lancet* 1991; 337:172-3.
9. Raoult D., Fournier P.E., Fenollar F., et al. *Rickettsia africae*, a tick-borne pathogen in travelers to sub-Saharan Africa. *N Engl J Med* 2001; 344:1504-10.
10. Paddock C.D., Sumner J.W., Comer J.A., et al. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. *Clin Infect Dis* 2004; 38:805-11.
11. Jensenius M., Fournier P.E., Hellum K.B., et al. Sequential changes in hematologic and biochemical parameters in African tick bite fever. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9:678-83.
12. La Scola B., Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2715-27.
13. Fournier P.E., Jensenius M., Laferl H., et al. Kinetics of antibody responses in *Rickettsia africae* and *Rickettsia conorii* infections. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9:324-8.
14. Rolain J.M., Shpynov S., Raoult D. Spotted-fever-group rickettsioses in north Asia. *Lancet* 2003; 362:1939.
15. Teysseire N., Raoult D. Comparison of Western immunoblotting and microimmunofluorescence for diagnosis of

- Mediterranean spotted fever. *J Clin Microbiol* 1992; 30:455-60.
16. Chen S.M., Dumler J.S., Bakken J.S., et al. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol* 1994; 32:589-95.
 17. Parola P., Beati L., Cambon M., et al. Ehrlichial DNA amplified from *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in France. *J Med Entomol* 1998; 35:180-3.
 18. Petrovec M., Sumner J.W., Nicholson W.L., et al. 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.
 19. Liz J.S., Anderes L., Sumner J.W., et al. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1002-7.
 20. Schouls L.M., Van De Pol I., Rijpkema S.G., et al. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2215-22.
 21. Cinco M., Padovan D., Murgia R., et al. Coexistence of *Ehrlichia phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Italy as determined by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* 1997; 35:3365-6.
 22. Christova I.S., Dumler J.S. Human granulocytic ehrlichiosis in Bulgaria. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60:58-61.
 23. Jenkins A., Kristiansen B.E., Allum A.G., et al. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia* spp. in *Ixodes ticks* from southern Norway. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3666-71.
 24. Alekseev A.N., Dubinina H.V., Semenov A.V., et al. Evidence of ehrlichiosis agents found in ticks (Acari: Ixodidae) collected from migratory birds. *J Med Entomol* 2001; 38:471-4.
 25. Baumgarten B.U., Rollinghoff M., Bogdan C. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks from southern Germany. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3448-51.
 26. Alberdi M.P., Walker A.R., Paxton E.A., et al. Natural prevalence of infection with *Ehrlichia* (*Cytoecetes*) *phagocytophila* of *Ixodes ricinus* ticks in Scotland. *Vet Parasitol* 1998; 78:203-13.
 27. Oteo J.A., Gil H., Barral M., et al. Presence of granulocytic ehrlichia in ticks and serological evidence of human infection in La Rioja, Spain. *Epidemiol Infect* 2001; 127:353-8.
 28. Petrovec M., Lotric F.S., Zupanc T.A., et al. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1556-9.
 29. Brouqui P. Ehrlichiosis in Europe. In: Raoult D., Brouqui P., editors. *Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millenium*. Paris: Elsevier; 1999. p. 220-32.
 30. Brouqui P., Dumler J.S., Lienhard R., et al. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Lancet* 1995; 346:782-3.
 31. van Dobbenburgh A., van Dam A.P., Fikrig E. Human granulocytic ehrlichiosis in western Europe. *N Engl J Med* 1999; 340:1214-6.
 32. Karlsson U., Bjoersdorff A., Massung R.F., et al. Human granulocytic ehrlichiosis clinical case in Scandinavia. *Scand J Infect Dis* 2001; 33:73-4.
 33. Bjoersdorff A., Wittesjo B., Berglund J., et al. Human granulocytic ehrlichiosis as a common cause of tick-associated fever in Southeast Sweden: report from a prospective clinical study. *Scand J Infect Dis* 2002; 34:187-91.
 34. Lotric-Furlan S., Petrovec M., Zupanc T.A., et al. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe: clinical and laboratory findings for four patients from Slovenia. *Clin Infect Dis* 1998; 27:424-8.
 35. Lotric-Furlan S., Petrovec M., Avsic-Zupanc T., et al. Human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *Ann NY Acad Sci* 2003; 990:279-84.
 36. Oteo J.A., Blanco J.R., Martinez D.A., et al. First report of human granulocytic ehrlichiosis from southern Europe (Spain). *Emerg Infect Dis* 2000; 6:430-2.
 37. Walder G., Falkensammer B., Aigner J., et al. First documented case of human granulocytic ehrlichiosis in Austria. *Wien Klin Wochenschr* 2003; 115:263-6.
 38. Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T., Kondrusik M., et al. First cases of acute human granulocytic ehrlichiosis in Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20:196-8.
 39. Remy V., Hansmann Y., De Martino S.J., et al. Human anaplasmosis presenting as atypical pneumonitis in France. *Clin Infect Dis* 2003; 37:846-8.
 40. Lotric-Furlan S., Avsic-Zupanc T., Petrovec M., et al. Clinical and serological follow-up of patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8:899-903.
 41. Lotric-Furlan S., Petrovec M., Avsic-Zupanc T., et al. Epidemiological, clinical and laboratory distinction between human granulocytic ehrlichiosis and the initial phase of tick-borne encephalitis. *Wien Klin Wochenschr* 2002; 114:636-40.
 42. Bjoersdorff A., Bagert B., Massung R.F., et al. Isolation and characterization of two European strains of *Ehrlichia phagocytophila* of equine origin. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9:341-3.
 43. Edelman D.C., Dumler J.S. Evaluation of an improved PCR diagnostic assay for human granulocytic ehrlichiosis. *Mol Diagn* 1996; 1:41-9.
 44. Walls J.J., Caturegli P., Bakken J.S., et al. Improved sensitivity of PCR for diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis using epank1 genes of *Ehrlichia phagocytophila*-group ehrlichiae. *J Clin Microbiol* 2000; 38:354-6.
 45. Massung R.F., Slater K.G. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *J Clin Microbiol* 2003; 41:717-22.
 46. Baranton G., Postic D., Saint Girons I., et al. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp.

- nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42:378-83.
47. Canica M.M., Nato F., du Merle L., et al. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis* 1993; 25:441-8.
 48. James A.M., Liveris D., Wormser G.P., et al. *Borrelia lonestari* infection after a bite by an *Amblyomma americanum* tick. *J Infect Dis* 2001; 183:1810-4.
 49. Kawabata H., Masuzawa T., Yanagihara Y. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol Immunol* 1993; 37:843-8.
 50. Marconi R.T., Liveris D., Schwartz I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2427-34.
 51. Le Fleche A., Postic D., Girardet K., et al. Characterization of *Borrelia lusitanae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47:921-5.
 52. Fukunaga M., Takahashi Y., Tsuruta Y., et al. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *Int J Syst Bacteriol* 1995; 45:804-10.
 53. Fukunaga M., Hamase A., Okada K., et al. *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiol Immunol* 1996; 40:877-81.
 54. Wang G., van Dam A.P., Le Fleche A., et al. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47:926-32.
 55. Wilske B., Schriefer M.E. *Borrelia*. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenover F.C., Tenover R.H., editors. *Manual of clinical microbiology*. Washington: ASM Press; 2003. p. 937-54.
 56. Eiffert H., Ohlenbusch A., Christen H.J., et al. Nondifferentiation between Lyme-disease spirochetes from vector ticks and human cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* 1995; 171:476-9.
 57. Jaulhac B., Heller R., Limbach F.X., et al. Direct molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in synovial samples from patients with lyme arthritis. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1895-900.
 58. Berger B.W., Johnson R.C., Kodner C., et al. Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from erythema migrans lesions and perilesional skin. *J Clin Microbiol* 1992; 30:359-61.
 59. Asbrink E., Hovmark A. Early and late cutaneous manifestations in *Ixodes*-borne borreliosis (erythema migrans borreliosis, Lyme borreliosis). *Ann NY Acad Sci* 1988; 539:415.
 60. Wilske B., Zöller L., Brade V., et al. MIQ 12 Lyme-Borreliose. In: Mauch H., Lütticken R., editors. *Qualitätsstandards in der mikrobiologisch infektiologischen Diagnostik*. München:Urban and Fischer, 2000.
 61. Wilske B., Schierz G., PreacMursic V., et al. Serological diagnosis of erythema migrans disease and related disorders. *Infection* 1984; 12:331-7.
 62. Wilske B., Fingerle V., Herzer P., et al. Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme borreliosis-comparison with indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. *Med Microbiol Immunol* 1993; 182:255-70.
 63. Wilske B., Fingerle V., PreacMursic V., et al. Immunoblot using recombinant antigens derived from different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Med Microbiol Immunol* 1994; 183:43-59.
 64. Schulte-Spechtel U., Lehnert G., Liegl G., et al. Significant improvement of the recombinant *Borrelia*-specific immunoglobulin G immunoblot test by addition of VlsE and a DbpA homologue derived from *Borrelia garinii* for diagnosis of early neuroborreliosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1299-303.
 65. Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors and the Centers for Disease Control and Prevention. Proceedings of the second national conference on serological diagnosis of Lyme disease. Fort Collins, CO: Centers for Disease Control, 1995; 17.
 66. Brettschneider S., Bruckbauer H., Klugbauer N., et al. Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy and urine samples from patients with skin borreliosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2658-65.
 67. Stanek G., O'Connell S., Cimmino M., et al. European Union Concerted Action on Risk Assessment in Lyme Borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr* 1996; 108:741-7.
 68. Gurycova D. First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. *Eur J Epidemiol* 1998; 14:797-802.
 69. Morner T. The ecology of tularemia. *Rev Sci Tech* 1992; 11:1123-30.
 70. Syrjala H., Kujala P., Myllylä V., et al. Airborne transmission of tularemia in farmers. *Scand J Infect Dis* 1985; 17:371-5.
 71. Anda P., Segura D.P., Diaz Garcia J.M., et al. Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:575-82.
 72. Bachiller L.P., Perez Castrillon J.L., Martin L.M., et al. Preliminary report of an epidemic tularemia outbreak in Valladolid. *Rev Clin Esp* 1998; 198:789-93.
 73. Montejo M., Perez-Irezabal J., Gonzalez D.Z., et al. Tularemia: report of 16 cases in the Castilla-Leon community. *Rev Clin Esp* 1998; 198:794-8.
 74. Luotonen J., Syrjala H., Jokinen K., et al. Tularemia in otolaryngologic practice. An analysis of 127 cases. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1986; 112:77-80.
 75. Roy T.M., Fleming D., Anderson W.H. Tularemic pneumonia mimicking Legionnaires' disease with false-positive direct fluorescent antibody stains for Legionella. *South Med J* 1989; 82:1429-31.
 76. Syrjala H., Koskela P., Kujala P., et al. Guillain-Barre syndrome and tularemia pleuritis with high adenosine deaminase activity in pleural fluid. *Infection* 1989; 17:152-3.
 77. Blanco J.R., Gutierrez C., Zabalza M., et al. Clinical

- microbiological case: sore throat and painful bilateral cervical lymph nodes. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7:636-7.
78. Sato T., Fujita H., Ohara Y., et al. Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. *J Clin Microbiol* 1990; 28:2372-4.
79. Hollis D.G., Weaver R.E., Steigerwalt A.G., et al. *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup novicida (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1601-8.
80. Evans M.E., Gregory D.W., Schaffner W., et al. Tularemia: a 30-year experience with 88 cases. *Medicine (Baltimore)* 1985; 64:251-69.
81. Taylor J.P., Istre G.R., McChesney T.C., et al. Epidemiologic characteristics of human tularemia in the southwestcentral states, 1981-1987. *Am J Epidemiol* 1991; 133:1032-8.
82. Limaye A.P., Hooper C.J. Treatment of tularemia with fluoroquinolones: two cases and review. *Clin Infect Dis* 1999; 29:922-4.
83. Scofield R.H., Lopez E.J., McNabb S.J. Tularemia pneumonia in Oklahoma, 1982-1987. *J Okla State Med Assoc* 1992; 85:165-70.
84. Fournier P.E., Bernabeu L., Schubert B., et al. Isolation of *Francisella tularensis* by centrifugation of shell vial cell culture from an inoculation eschar. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2782-3.
85. Dolan S.A., Dommaraju C.B., DeGuzman G.B. Detection of *Francisella tularensis* in clinical specimens by use of polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1998; 26:764-5.
86. Johansson A., Berglund L., Eriksson U., et al. Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. *J Clin Microbiol* 2000; 38:22-6.
87. Forsman M., Sandstrom G., Sjostedt A. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int J Syst Bacteriol* 1994; 44:38-46.
88. Sandstrom G., Sjostedt A., Forsman M., et al. Characterization and classification of strains of *Francisella tularensis* isolated in the central Asian focus of the Soviet Union and in Japan. *J Clin Microbiol* 1992; 30:172-5.
89. de la Puente-Redondo V.A., del Blanco N.G., Gutierrez-Martin C.B., et al. Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1016-22.
90. Johansson A., Ibrahim A., Goransson I., et al. Evaluation of PCR-based methods for discrimination of *Francisella* species and subspecies and development of a specific PCR that distinguishes the two major subspecies of *Francisella tularensis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4180-5.
91. Karlsson J., Prior R.G., Williams K., et al. Sequencing of the *Francisella tularensis* strain Schu 4 genome reveals the shikimate and purine metabolic pathways, targets for the construction of a rationally attenuated auxotrophic vaccine. *Microb Comp Genomics* 2000; 5:25-39.
92. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 1997; 46:1-55.
93. Anda P., Sanchez-Yebra W., del Mar V., et al. A new *Borrelia* species isolated from patients with relapsing fever in Spain. *Lancet* 1996; 348:162-5.
94. Fraenkel C.J., Garpmo U., Berglund J. Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3308-12.
95. van Dam A.P., van Gool T., Wetsteyn J.C., et al. Tick-borne relapsing fever imported from West Africa: diagnosis by quantitative buffy coat analysis and *in vitro* culture of *Borrelia crocidurae*. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2027-30.
96. Parola P., Inokuma H., Camicas J.L., et al. Detection and identification of spotted fever group Rickettsiae and Ehrlichiae in African ticks. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:1014-7.