

# СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ РИККЕТСИОЗОВ

М.Е. Еремеева<sup>1</sup>, С.Н. Шпынов<sup>2</sup>, Н.К. Токаревич<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Университет Южной Джорджии, Джорджия, Статесборо, США

<sup>2</sup> ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** В настоящей статье представлен обзор и анализ современных лабораторных методов диагностики риккетсиозов с особым акцентом на заболевания, известные в России. Классические и новые риккетсиозы передаются разнообразными членистоногими переносчиками, в том числе клещами, блохами и вшами. Хотя эпидемиологические данные и клинические симптомы предоставляют необходимую информацию для предварительной диагностики риккетсиозной инфекции, использование чувствительных и специфичных лабораторных методов необходимо для подтверждения окончательного диагноза риккетсиозов. Точное и быстрое подтверждение риккетсиоза имеет важное значение для обеспечения надлежащей медицинской помощи и своевременного начала специфической антибактериальной терапии. Идентификация этиологии риккетсиозов также важна для раннего выявления периодических вспышек или появления новых очагов заболевания известных риккетсиозов, а также необходима для своевременного реагирования органами общественного здравоохранения в случаях вспышек риккетсиозов новой этиологии или заболеваний с лихорадкой неясной природы.

**Ключевые слова:** риккетсиозы, зоонозные инфекции, клинические симптомы, диагностика, серологические методы, полимеразная цепная реакция, Североазиатский клещевой риккетсиоз.

## Введение

Риккетсиозы включают постоянно расширяющуюся группу инфекционных заболеваний, возбудители которых в большинстве своем передаются человеку иксодовыми и гамазовыми клещами, блохами или вшами, зараженными риккетсиями. Сыпной и крысиный тиф и многие клещевые риккетсиозы, вызываемые бактериями из рода *Rickettsia*, так же как и лихорадка цуцугамуши, вызываемая *Orientia tsutsugamushi*, относятся к классическим и относительно хорошо изученным заболеваниям [30, 44, 112]. В последние двадцать лет было описано значительное количество новых риккетсиозов, вызываемых ранее неизвестными или недифференцированными риккетсиями, идентифицированы новые виды клещей и блох, осуществляющих передачу

риккетсий и служащих их природным резервуаром [115]. Помимо этого, две совершенно новые группы зоонозных заболеваний — анаплазмоз и эрлихиозы человека, вызываемые *Anaplasma phagocytophilum* и разными представителями рода *Ehrlichia* соответственно, были описаны в тот же промежуток времени [40, 64]. За исключением риккетсиозного заболевания, вызываемого *Rickettsia felis* и переносимого кошачьей блохой, *Ctenocephalides felis* [113], большинство новых риккетсиозов, так же как и анаплазмоз и эрлихиозы передаются человеку со слюной клеща во время кровососания. Лихорадка Ку, традиционно включаемая в список риккетсиозов и изучаемая риккетсиологами, представляет совершенно уникальное заболевание, вызываемое *Coxiella burnetii*, которая эволюционно, филогенетически и биологически более близка к *Legionella* [152].

### Авторы:

**Еремеева М.Е.**, д.б.н., зав. лабораторией, Университет Южной Джорджии, Джорджия, Статесборо, США;

**Шпынов С.Н.**, д.м.н., зав. лабораторией экологии риккетсий ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия;

**Токаревич Н.К.**, д.м.н., профессор, зав. лабораторией зооантропонозных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера; профессор кафедры эпидемиологии ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

### Адрес для переписки:

Marina E. Ereemeeva  
JPH COPH, Georgia Southern University, Statesboro, GA 30458, USA.  
Тел.: +1 912 478-05-04. Факс: +1 912 478-58-11.  
E-mail: meremeeva@georgiasouthern.edu

поступила в редакцию 07.03.2014  
отправлена на доработку 07.03.2014  
принята к печати 07.05.2014

© Еремеева М.Е., Шпынов С.Н.,  
Токаревич Н.К., 2014

В большинстве своем, возбудители риккетсиозов циркулируют в природной экосистеме, включающей членистоногих переносчиков и мелких и крупных диких или домашних животных и птиц, на которых паразитируют членистоногие переносчики [99, 127, 150]. Присутствие и персистенция риккетсий в клещах и блохах обеспечивается за счет процессов вертикальной и горизонтальной передачи [28, 146]. В первом случае риккетсии передаются трансвариально зараженной самкой, откладывающей зараженные яйца, и на следующих этапах развития при линьке зараженных ларв и нимф. В случае горизонтальной трансмиссии клещи и блохи заражаются риккетсиями при кормлении на животных с высоким уровнем риккетсиемии или при совместном кормлении зараженных и незараженных членистоногих на незараженном животном [164]. За небольшим исключением риккетсии, циркулирующие в клещах и блохах, не оказывают негативного влияния на жизнеспособность и плодовитость их членистоногих хозяев, которые остаются инфицированными в течение всего жизненного цикла [25, 90]. Выживаемость и плодовитость клещей, зараженными *R. rickettsii* и *R. conorii* заметно снижена по сравнению с другими патогенными риккетсиями, включая *R. sibirica* [85, 100]. Платяная вошь, *Pediculus humanis* является основным переносчиком *R. prowazekii*, которые вызывают гибель вшей [30]. Заражение *R. prowazekii* происходит при попадании инфицированных фекалий вшей через расчески и повреждения на коже [30]; похожим путем происходит заражение *R. typhi* и *R. felis*, передающимися блохами [29, 37].

Заражение людей клещевыми риккетсиозами происходит случайным образом при кровососании зараженного клеща и не оказывает существенного влияния на циркуляцию риккетсий в природном очаге. Нападение на человека зараженного риккетсиями клеща может привести к развитию острого заболевания. Типичный риккетсиоз характеризуется основной триадой симптомов, включающих головную боль, высокую температуру и сыпь, и сопровождается разной степени выраженности повреждением сосудистой системы паренхиматозных органов. Многие риккетсиозы также характеризуются появлением первичного аффекта на месте присасывания клеща, представляющего собой комплексный симптом, который обычно проявляется в виде красноватого, слегка возвышающегося инфильтрата покрытого темной корочкой, а также воспалением региональных лимфатических узлов и лимфангита. Наличие этих симптомов и степень их выраженности существенно варьирует в зависимости от типа риккетсиозной инфекции [114].

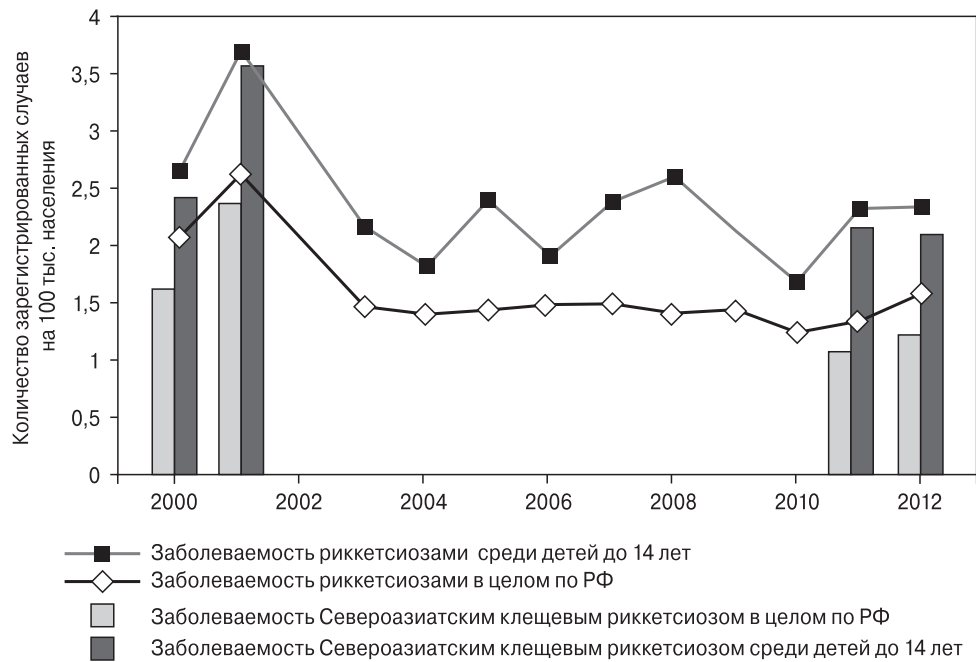
В настоящем обзоре мы обобщаем современные данные о клиническом течении риккетси-

озов человека, диагностируемых на территории России, обсуждаем методы и подходы, используемые для лабораторной диагностики этих инфекций, и анализируем их преимущества, недостатки и оптимальные сроки применения на разных стадиях болезни.

## Основные риккетсиозы и риккетсиозные патогены

На территории Российской Федерации доминирует присутствие клещевого риккетсиоза Северной Азии, или Североазиатского клещевого риккетсиоза, вызываемого *Rickettsia sibirica*. Это заболевание было почти одновременно описано в 1930-х гг. в Приморском крае, Хабаровской области и Красноярском крае [1, 11, 20]. Хотя в официальных документах и сводках эпидемиологической статистики оно фигурирует под названием «сибирский клещевой тиф» (А77.2), в настоящем обзоре будет использовано название «Североазиатский клещевой риккетсиоз» или «СКР», что отвечает более корректным и современным представлениям об этой болезни [16]. На основе последних наблюдений географический ареал этого заболевания занимает азиатскую часть бывшего СССР с преобладанием регистрируемых случаев в южных областях и краях Восточной и Западной Сибири и Дальнего Востока России [15, 16], и за пределами России в Северном и Восточном Казахстане, Киргизстане, Монголии и Китае [15, 16, 115]. Начиная с конца 70-х гг. и до 1997 г. наблюдалось стабильное увеличение заболеваемости Североазиатским клещевым риккетсиозом; напротив, после 2001 г. эпидемиологические данные регистрируют относительное снижение этого показателя, который варьирует от 1,08 до 2,8 случаев на 100 000 населения в среднем по стране (рис. 1). Показатели заболеваемости существенно различаются в разных регионах: наибольшие из них имеют место в Западной Сибири, при этом в Алтайском Крае и Республике Алтай регистрируются наивысшие показатели 24,3–70,5 и 54,9–90,9 случаев (на 100 000 населения) соответственно [22, 140]. Красноярский край занимает второе место по заболеваемости Североазиатским клещевым риккетсиозом в России. Мужчины болеют чаще, чем женщины; дети в возрасте до 14 лет составляют основную группу заболевших (табл. 1).

Заболевание чаще всего регистрируется с конца весны до начала лета (май-июнь), и его сезонные колебания совпадают с активностью клещей-переносчиков, которые одновременно являются природным резервуаром *R. sibirica*. Несколько видов иксодовых клещей являются переносчиками *R. sibirica* в разных частях географического ареала Североазиатского клещевого риккетсиоза, однако клещ *Dermacentor nutalli* наи-



**Рисунок 1. Динамика заболеваемости риккетсиозами и Североазиатским клещевым риккетсиозом по данным Роспотребнадзора**

более важен в эпидемиологическом контексте [21]. Естественная зараженность *D. nutalli* может достигнуть 64% [3], и этот клещ проявляет наибольшую чувствительность и стабильность к заражению *R. sibirica* в лабораторных условиях [17].

Дальневосточный клещевой риккетсиоз вызывается *R. heilongjiangensis* [94]. Это заболевание встречается в Хабаровском крае и Амурской области [94], за пределами России клинические случаи этого заболевания или присутствие *R. heilongjiangensis* в клещах описаны в Китае и Японии [27, 86]. В настоящее время считается, что клинические и эпидемиологические характеристики Дальневосточного клещевого риккетсиоза были впервые описаны в 1936–1937 гг., однако заболевание не получило должного признания как самостоятельная нозологическая единица и регистрировалось как Североазиатский клещевой риккетсиоз из-за отсутствия должных методов дифференциальной лабораторной диагностики. В отличие от Североазиатского клещевого риккетсиоза, Дальневосточный клещевой риккетсиоз диагностируется в июне и июле, у более пожилых пациентов и протекает сравнительно легко и без осложнений [93] (табл. 1). Клещи *Haemaphysalis concinna* и *H. japonica douglasii* являются доминирующими векторами, хотя роль других иксодовых клещей, включая *D. nuttalli* и других клещей рода *Dermacentor* не должна полностью исключаться [23, 93, 142].

Описание и первые исследования Астраханской пятнистой лихорадки относятся к концу 1980-х гг., когда была установлена риккетсиозная этиология экзантемной лихорадки, от кото-

рой страдало сельское население Астраханской области, начиная с 1972 г. [148]. Клинически, Астраханская пятнистая лихорадка похожа на Средиземноморскую или Марсельскую лихорадку (табл. 1), за исключением более редкого присутствия первичного аффекта на месте укуса клеща [149]. Заболевание регистрируется в течение летних месяцев; взрослое население и в основном мужчины составляют преобладающую группу пациентов. В 2013 г. было официально зарегистрировано 397 случаев Астраханской пятнистой лихорадки, включая 82 заболевания среди детей до 14 лет. Этиологический агент — *R. conorii*, подвид *caspia* — выделен из нескольких видов клещей рода *Rhipicephalus*, включая *Rh. sanguineus* и *Rh. pumilio* [46, 165]. Эти клещи паразитируют на собаках, кроликах, ежах и кошках. На основе единичных случаев детекции *R. conorii caspia* в клещах из Косово и Франции [128] и в клиническом образце из Чада [114, 115] предполагается широкое распространение Астраханской пятнистой лихорадки за пределами России.

Присутствие *R. conorii conorii* на территории России не отмечается в последних публикациях, и, соответственно, Средиземноморская лихорадка не регистрируется [16]. В историческом плане очаги этого заболевания были зарегистрированы вдоль побережий Черного и Каспийского морей [126]. Принимая во внимание подходящий климат, наличие и распространение клещей рода *Rhipicephalus* в южных регионах страны, заболевание, по-видимому, существует, но не диагностируется ввиду относительно небольшого количества случаев и вероятной не-

**ТАБЛИЦА 1. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОСНОВНЫХ КЛЕЩЕВЫХ РИККЕТСИОЗОВ, РАСПРОСТРАНЕННЫХ ИЛИ ПРЕДПОЛАГАЕМЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Признаки по категориям	Возбудитель риккетсиоза							
	<i>R. sibirica</i> [15]	<i>R. sibirica</i> подвид <i>mongolotimolae</i> [55]	<i>R. heilongjiangensis</i> [94]	<i>R. conopii</i> подвид <i>conopii</i> [165]	<i>R. conopii</i> подвид <i>caspia</i> [149]	<i>R. slovaca</i> [124]	<i>R. raoultii</i> [115]	<i>Candidatus Rickettsia tarasevichiae</i> [67]
Заболевание	Североазиатская клещевая лихорадка (Североазиатский клещевой риккетсиоз)	Риккетсиозный лимфангит	Дальневосточный клещевой риккетсиоз	Марсельская лихорадка	Астраханская пятнистая лихорадка	Риккетсиозный лимфоаденит	Риккетсиозный лимфоаденит	Клещевой риккетсиоз (без специального названия)
<b>Эпидемиологические характеристики</b>								
Основной клещ-переносчик	<i>Dermacentor</i> sp.	<i>Hyalomma</i> sp.	<i>Haemaphysalis concinna</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>Rhipicephalus</i> sp.	<i>Dermacentor</i> sp.	<i>Dermacentor</i> sp.	<i>Ixodes persulcatus</i> , <i>I. ricinus</i>
Зона эндемичности	Восточная и Западная Сибирь, Дальний Восток, Китай	Южная Франция, Африка и страны Азии <sup>1</sup>	Дальний Восток, Китай, Япония	Средиземноморский регион, Черноморское побережье, Индия	Астраханская и Волгоградская области, Косово, Африка	Европейские страны от Португалии до Украины, Кавказ <sup>2</sup>	Европейские страны от Португалии до Украины, Кавказ <sup>2</sup>	От Архангельской области до Дальнего Востока, Китай
Пик заболеваемости <sup>2</sup>	апрель–июнь	март–июнь	июнь–июль	июнь–сентябрь	октябрь–май	октябрь–май	февраль–март	май–август
Количество проанализированных случаев	73	9	13	85	321	58 (49) <sup>3</sup>	7	5
Процент мужчин		78	62	61	63	76 (67) <sup>3</sup>	100	40
Процент детей	82	0	0	3	5,9	21 (41) <sup>3</sup>	43	20
<b>Клинические характеристики</b>								
Головная боль, %	49	55	100	48	92	33		60
Температура, %	97	100	13	100	100	38 (54) <sup>3</sup>	80	40
Сыпь, %	98,6	78	92	93	100	10 (23) <sup>3</sup>	20	0
Увеличение лимфоузлов, %		55	77	1		100		40
Лимфангит, %	38–85,8?	44	15	0		0		0
Формирование корочки на месте укуса клеща (первичный аффект), %	66,6–99,8	89	92	94	22,8	100	100	60

## ОКОНЧАНИЕ ТАБЛИЦЫ 1

Признаки по категориям	Возбудитель риккетсиоза						Клинические характеристики	
	<i>R. sibirica</i> [15]	<i>R. sibirica</i> подвид <i>mongolotimonae</i> [55]	<i>R. heilongjiangensis</i> [94]	<i>R. conorii</i> подвид <i>conorii</i> [165]	<i>R. conorii</i> подвид <i>caspia</i> [149]	<i>R. slovaca</i> [124]		<i>R. raoultii</i> [115]
Множественные укусы клеща, %	0	22	0	< 1	0	0	0	0
Смертность, %	0,5 <sup>4</sup>	0	0	2,3	0	0	0	0

**Примечания.**

<sup>1</sup> Опубликованные данные по клиническим случаям обозначенной инфекции и их лабораторного подтверждения в России отсутствуют на момент написания и отсылки статьи в печать.

<sup>2</sup> Указано на основании цитированных материалов. Пик заболеваемости в разных регионах может существенно отличаться в связи с климатическими различиями.

<sup>3</sup> Цифры в скобках цитируются на основании данных [116].

<sup>4</sup> Летальность, наблюдавшаяся до начала периода использования антибиотиков для лечения Североазиатского клещевого риккетсиоза [10].

достаточной квалификации врачей. Аналогичная ситуация имеет место в других странах, где риккетсиозы не относятся к разряду наиболее опасных инфекций [92, 105, 155]. Средиземноморская лихорадка по-прежнему регистрируется в южных районах Украины [4].

Помимо трех клещевых риккетсиозов, описанных выше, предполагается наличие по крайней мере еще трех или четырех заболеваний, вызываемых *R. slovaca*, *R. raoultii*, *R. helvetica*, *R. aeschlimannii*, «*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*» и *R. sibirica mongolotimonae*. Присутствие и циркуляция *R. slovaca*, *R. raoultii*, *R. aeschlimannii*, *R. helvetica* и «*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*» подтверждены детекцией ДНК и сиквенированием ПЦР фрагментов этих риккетсий в клещах, собранных в разных районах страны [5–8, 12, 13, 19, 24, 50, 141–145]. Заболевания, вызываемые этими возбудителями, отличаются разнообразием клинических симптомов (табл. 1), поэтому они могут быть ошибочно приняты за более распространенный Североазиатский клещевой риккетсиоз разной степени тяжести. В регионах первоначального описания инфекции в Восточной и Западной Европе заболевания, вызываемые *R. slovaca* и *R. raoultii*, как правило диагностируются в осенне-зимние месяцы [63, 116] (табл. 1). Похожая ситуация может быть маловероятна в более холодных климатических зонах обитания клещей, зараженных *R. slovaca* и *R. raoultii*, на территории России, поэтому соответствующие заболевания могут иметь другой сезонный цикл. *R. helvetica* циркулирует в клещах *Ixodes ricinus* и *I. persulcatus* на обширной территории от Франции до Японии и Таиланда [115]. В России *R. helvetica* детектирована в Пермском крае, Челябинской области и на Камчатке [6, 12, 13, 143]. Шведские врачи приводят серию наблюдений, указывающих на роль *R. helvetica* в развитии ряда клинических симптомов, включая периферийный лицевой паралич и перимеиокардит [102, 103]. В других случаях этиологическая роль *R. helvetica* в качестве возбудителя легко протекающих риккетсиозов установлена на основании серологических тестов [53, 101]; заболевание обычно сопровождается головной и мышечной болью, но проявление сыпи и тем более первичного аффекта встречается очень редко. Распространение *R. sibirica mongolotimonae* связывают с циркуляцией клещей из рода *Hyalomma*, первый изолят был выделен из *H. asiaticum* [163]. Заболевание, вызываемое *R. sibirica mongolotimonae*, обладает несколькими специфическими характеристиками, включая выраженную сезонность с мая по июль, множественные первичные аффекты, воспаленные лимфоузлы и воспаление лимфатических сосудов (лимфангит) между местом присасывания клеща и воспаленным лимфоузлом [55]. Циркуляция этого возбудителя в клещах на территории России пока не установлена.

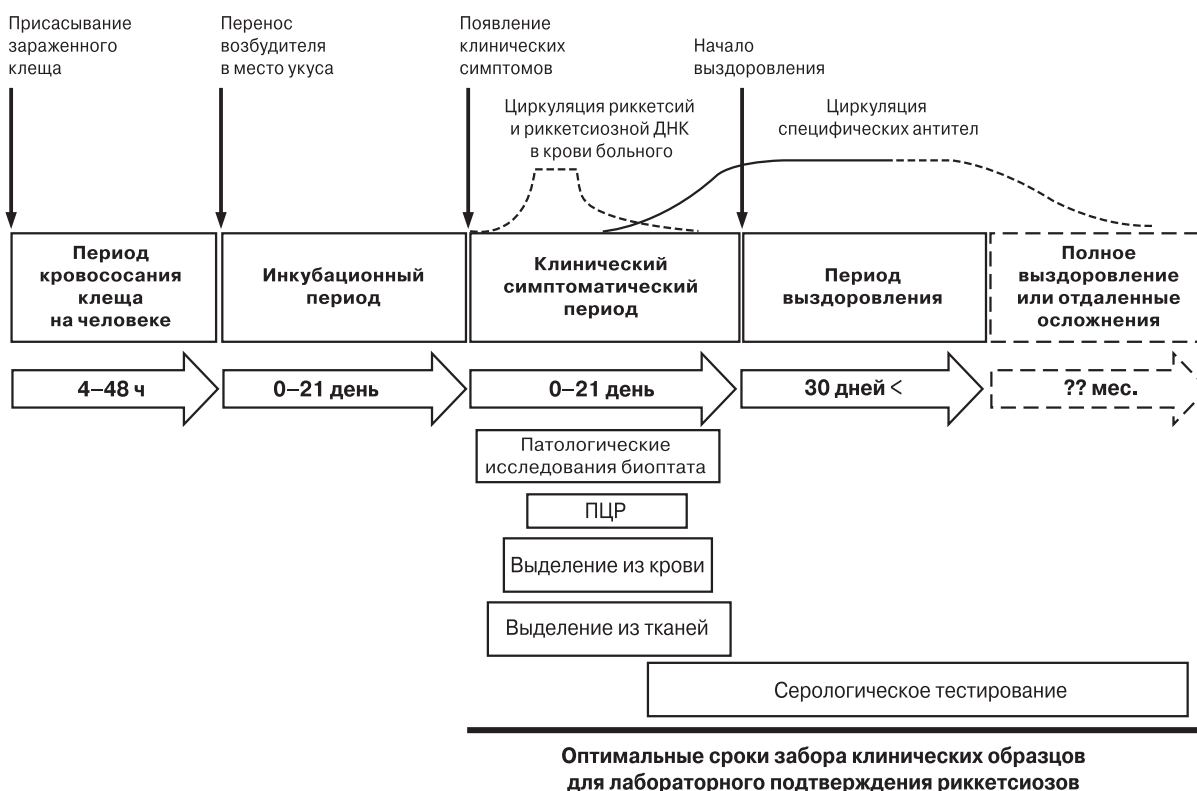
Клещи из рода *Hyalomma* также являются природным резервуаром и переносчиками *R. aeschlimannii*, уровень заражения клещей которыми варьирует от 1,8 до 64,7% [115, 142]. *R. aeschlimannii* детектирована в Ставропольском крае в 20% клещей *H. marginatum marginatum* и в 5,5% *Haemaphysalis punctata*, собранных в Алма-Атинской области, в Казахстане [142, 145]. Несмотря на значительное присутствие *R. aeschlimannii* в клещах, клинические заболевания, вызываемые этим возбудителем в указанных регионах, еще не идентифицированы. Только незначительное число клинических случаев *R. aeschlimannii*-инфекции описано в литературе [57, 120, 123].

Присутствие *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* выявлено в иксодовых клещах, собранных в различных регионах от Архангельской области до Камчатки и Приморского края [6, 13, 19, 49, 50, 141], однако инфекции, вызываемые этим патогеном, пока не диагностированы в России.

### Клинические проявления риккетсиозных инфекций

Риккетсиозы относятся к заболеваниям, которые довольно трудно диагностировать, особенно врачам, никогда не наблюдавшим таких пациентов [92, 105, 155]. Клинические симптомы часто варьируют в зависимости от этиологического агента и физических, физиологиче-

ских и генетических особенностей пациента [154, 155] (рис. 2). В большей части риккетсиоз начинается после двухнедельного инкубационного периода после нападения клеща и появления нескольких неспецифических симптомов, включая повышение температуры, головную боль, общее недомогание и иногда тошноту, сопровождающуюся рвотой [10, 15]. Наличие первичного аффекта на месте присасывания клеща является важным признаком, позволяющим предположить наличие риккетсиозной инфекции. Этот симптом часто развивается до повышения температуры, однако наличие первичного аффекта не должно рассматриваться однозначно, так как похожая кожная реакция может развиваться, например, при туляремии [41]. По внешнему виду первичный аффект при Североазиатском клещевом риккетсиозе представляет собой плотный инфильтрированный участок кожи коричневого или бурого цвета с некротическим участком или западающей язвочкой в центре, покрытой темно-коричневой корочкой [9, 10]. При продолжающихся симптомах, спустя несколько дней появляется сыпь, характер сыпи и ее расположение тоже зависит от вида риккетсий и может варьировать от полиморфной, состоящей из розеол и папул, до петехиальной [10]. Сыпь при клещевом риккетсиозе встречается в 98,2% [10, 15]. Воспаление региональных лимфоузлов считается еще одним важным симптомом риккетсиозов,



**Рисунок 2. Кинетика развития клинических симптомов при риккетсиозах и рекомендуемые оптимальные сроки лабораторной диагностики**

однако его проявление также сильно отличается при различных заболеваниях [154, 155]. Лимфангит является специфическим симптомом, чаще всего ассоциируемым, как отмечалось выше, с инфекцией, вызываемой *R. sibirica mongolotimoae* [55].

### Изменения стандартных лабораторных параметров в ходе заболевания

Изменения со стороны периферической системы крови у больных, страдающих от риккетсиозов, довольно разнообразные, но при правильной интерпретации, могут быть использованы для предварительного клинического диагноза риккетсиозов. Особенно в тяжелых случаях, связанных с массивным поражением эндотелиальных сосудов, в крови отмечается понижение уровня натрия, альбумина, и развиваются разной степени тяжести анемия и тромбоцитопения [42, 65]. Число лейкоцитов обычно близко к норме, что отличает риккетсиозы от других бактериальных инфекций, сопровождающихся лимфоцитозом [65]. Уровень печеночных ферментов, включая аланин- и аспартаттрансаминазы, как правило увеличен [66]. Кроме того, у значительного числа пациентов отмечается повышенное содержания С-реактивного белка в сыворотке [66].

### Серологические подходы к диагностике риккетсиозов

Серологические методы являются наиболее традиционными подходами к диагностике риккетсиозов. Среди них необходимо упомянуть несколько методов, включая реакцию связывания комплемента, реакцию агглютинации латекса, реакцию агглютинации и реакцию гемагглютинации. Все перечисленные методы используются в диагностической практике в течение длительного времени и характеризуются относительно высокой специфичностью [76, 98, 117]. В частности, серологическая диагностика Североазиатского клещевого риккетсиоза в России в большинстве своем осуществляется с применением реакции связывания комплемента [2], хотя ведущие учреждения прикладывают значительные усилия для разработки более современных методов диагностики [16]. К сожалению, несмотря на известные преимущества и широкое применение, классические серологические методы не в полной мере отвечают современным требованиям к диагностике риккетсиозов в силу значительных затрат на получение соответствующих антигенов, трудностей со стандартизацией метода и недостаточно высокой чувствительностью [2, 98, 117].

Метод непрямой иммунофлуоресценции (МИФ) является основным референсным методом для серодиагностики риккетсиозов [118]

(рис. 3, III обложка); в англоязычной литературе он чаще всего упоминается в качестве золотого стандарта [80]. Этот статус обусловлен высокой чувствительностью, быстротой получения результата, низкими затратами сыворотки и антигенов для проведения анализа и возможностью одновременного тестирования одного образца сыворотки с несколькими антигенами [80]. Определение конечного разведения или титра сыворотки, и установление титров неспецифической реактивности сывороток здоровых доноров может иногда представлять существенные методологические проблемы, но эти ситуации обычно разрешаются дополнительными исследованиями и пилотным тестированием репрезентативных образцов с целью установления специфических параметров для разных региональных антигенов или соответствующих наборов сывороток. В большинстве лабораторий в настоящее время специфический уровень детекции для IgG класса антител установлен 1:64 и для IgM антител — 1:32 или 1:64. Следует отметить, что разные уровни неспецифических результатов этого метода обычно устанавливаются для диагностических целей и для сероэпидемиологических исследований. Наличие качественных антигенов и специфических конъюгатов, а также соблюдение условий хранения сывороток является залогом достоверных и воспроизводимых результатов, получаемых при МИФ.

МИФ позволяет проводить определение как IgG, так и IgM антител, хотя как в любом серологическом методе, определение IgM антител может быть затруднено в связи с их более сильной неспецифической реактивностью (и низкой специфичностью), часто объясняемой наличием у риккетсий липополисахаридных эпитопов перекрестно реагирующих с легионеллами и протеом [122]. Помимо этого, IgG иногда могут блокировать связывание IgM, которые характеризуются меньшей аффинностью. Для более эффективного определения титра IgM рекомендуется предварительная обработка сыворотки и удаление IgG [45, 80].

Эффективность и чувствительность МИФ зависит в значительной степени от времени забора крови относительно начала клинических проявлений болезни (рис. 2). В большинстве случаев сыворотки, полученные в ранние сроки заболевания, оказываются отрицательными. Согласно многочисленным наблюдениям, МИФ выявляет антитела к риккетсиям в 94–100% сывороток, начиная с 14 дня заболевания [35, 56, 98]. Надежность и достоверность результатов увеличивается при параллельном тестировании парных сывороток, полученных с двухнедельным интервалом (5–10 дней и 20–30 дней после начала заболевания). Исходя из этих наблюдений, наличие положитель-

ной серологической реакции к риккетсиозным антигенам у пациентов с соответствующей клиникой и анамнезом не требуется для начала терапевтического лечения тетрациклином [32, 35]. Такой подход особенно важен при лечении пациентов с быстротекущими формами риккетсиозов, такими как пятнистая лихорадка Скалистых гор или Марсельская лихорадка. Наличие и продолжительность циркуляции антириккетсиозных антител в крови человека после выздоровления от риккетсиозной инфекции определяется несколькими факторами и зависит от характера перенесенного заболевания. В случае пятнистой лихорадки Скалистых Гор IgM антитела выявляются до 3–4 месяцев, а IgG могут определяться до 12 месяцев от начала заболевания [38]. С другой стороны, при риккетсиозах, вызываемых риккетсиями с меньшей вирулентностью, например при Африканской клещевой лихорадке (*R. africae*), диагностируемые титры антител не выявляются до 25–28 дня после начала заболевания [56]. Поэтому для подтверждения диагноза необходимо исследование сывороток на более поздних сроках, в том числе у туристов, вернувшихся из эндемичных регионов.

Для повышения качества результатов МИФ тестирования рекомендуется использовать антигены риккетсий, циркулирующие в регионе возможного заражения. В целом риккетсии обладают обширным набором перекрестно-реагирующих антигенных эпитопов, включая эпитопы ЛПС и эпитопы нескольких поверхностных белков, особенно OmpA и OmpB [161]. К сожалению, закономерности взаимодействия этих эпитопов с сыворотками пациентов, страдающих от разных риккетсиозов, полностью не установлены. Достоверно известно, что формирующиеся антитела отличаются по своей аффинности и специфичности в зависимости от сроков заболевания и состояния пациента. Поэтому при использовании гетерологичных антигенов, обнаруженные антитела могут быть результатом или недавнего острого заболевания, или конвалесцентными антителами, сформировавшимися в результате предыдущего контакта с теми же или другими видами риккетсий. В отдельных случаях, сыворотки больных проявляют реактивность с антигенами риккетсий и клещевой и сыпнотифозной группы [61, 118]. Дальнейшее тестирование с целью установки этиологического диагноза требует проведения перекрестной адсорбции сыворотки с антигенами подозреваемого этиологического агента и перекрестно реагирующих риккетсий и последующего тестирования адсорбированных сывороток в МИФ с теми же антигенами.

Иммуноферментные тесты были разработаны в разных вариантах для диагностики многих риккетсиозов [16, 38, 71]. Эти методы особенно

привлекательны для лабораторий с наличием автоматического оборудования и достаточного количества очищенных антигенов. Иммуноферментные тесты пригодны для проведения разного типа исследований по распространению риккетсиозных заболеваний с использованием нескольких антигенов или ретроспективного скрининга коллекций парных сывороток. В идеальном варианте использование рекомбинантных риккетсиальных белков должно облегчить проблему получения антигенов и заменить трудоемкие процессы культивирования и выделения риккетсий. К сожалению, клонирование и экспрессия основных антигенных белков риккетсий с доминирующим присутствием эпитопов, реагирующих со специфическими антителами в сыворотках до сих пор представляет существенную методологическую проблему [121]. Многие из этих эпитопов являются конформационными термолабильными эпитопами или подвергаются посттрансляционной модификации в нативном белке [34, 36, 45], что затрудняет получение рекомбинантных антигенов, полностью соответствующих нативным белкам.

## Лабораторная диагностика с использованием молекулярных методов

Детекция и характеристика специфических фрагментов риккетсиальной ДНК, амплифицированной в ПЦР, является быстрым методом идентификации риккетсий даже если они присутствуют в относительно небольших количествах в клинических или полевых образцах. При наличии нескольких десятков полностью сиквенированных геномов разных видов риккетсий, специалисты имеют практически неограниченные возможности для выбора уникальных сайтов для детекции разных видов риккетсий (табл. 2). Несколько сайтов и праймеров, наиболее часто используемых в диагностической практике, были выбраны относительно случайно, поэтому они не представляют собой наиболее специфические или наиболее чувствительные комбинации [33, 125, 151, 159]. Среди этих сайтов несколько участков генов 17 kDa белка, цитратсинтетазы и поверхностных белков OmpA и OmpB, которые были среди первых генов, сиквенированных для риккетсий, и, как оказалось, имеют достаточное количество уникальных и общих сайтов, позволяющих дифференцировать практически все виды риккетсий, за исключением *R. bellii* и *R. canadensis* [26, 43, 125, 131, 133]. Использование консервативных праймеров, разработанных для амплификации 16 рРНК гена зубактерий, позволило идентифицировать новых представителей рода риккетсий, циркулирующих вне классических экологических систем, типичных для патогенных



риккетсий, включая риккетсии, найденные в пиявках, божьих коровках и других насекомых [75, 77, 157, 158].

Праймеры, отличающиеся высокой специфичностью для амплификации риккетсиальной ДНК, обладают очевидными преимуществами для лабораторной диагностики, так как они практически полностью исключают возможность неспецифической детекции других бактерий [73]. Предварительное тестирование и оптимизация условий амплификации очень важно, так как степень генетической гетерогенности штаммов и изолятов, принадлежащих к одному и тому же виду или разным видам риккетсий, установлена только для очень малого числа патогенных и непатогенных риккетсий [49, 73].

Клинические образцы, наиболее подходящие для ПЦР-тестирования включают цельную кровь, сгустки крови, биоптат кожи и патологические образцы, полученные в процессе вскрытия [32, 35]. Изредка, сообщаются результаты положительной детекции риккетсий с использованием ПЦР в моче и сыворотке больных [84, 138], однако пригодность этого вида образцов для подтверждения диагноза изучена недостаточно. ПЦР детекция риккетсиальной ДНК в крови, плазме или сыворотке чаще всего наблюдается при тяжелых и быстротекущих случаях пятнистой лихорадки Скалистых Гор (ПЛСГ), как правило, с летальным исходом [84, 95]. Этот феномен объясняется низким числом риккетсий, циркулирующих в кровотоке больного в процессе риккетсиозного заболевания, период циркуляции также ограничен. Например, в крови больных, страдающих от ПЛСГ легкой и средней тяжести содержалось всего лишь от 100,7 до 101,2 ИД<sub>50</sub>/мл риккетсий, что было установлено путем заражения клеточной культуры кровью больного на пике заболевания и подсчета числа литических бляшек; 10<sup>3</sup> ИД<sub>50</sub>/мл риккетсий содержалось в плазме больного, погибшего от быстроразвившейся и нелеченной формы ПЛСГ [72].

ДНК, экстрагированная из только что полученных или замороженных и хранившихся при -80°C образцов биоптата с места первичного аффекта или участка кожи, пораженного сыпью, считается наиболее пригодным материалом для диагностической детекции риккетсий методом ПЦР [32, 35]. Диагноз Сибирского клещевого риккетсиоза был подтвержден в результате ПЦР детекции ДНК *R. sibirica* в 12 образцах биоптата кожи (корочки) с места первичного аффекта [2, 140]. ДНК *R. helvetica* была детектирована в крови больного с лихорадочным заболеванием, развившимся после присасывания клеща [12].

ДНК, подходящая для ПЦР-тестирования, может быть также экстрагирована из фиксированных патологических образцов или образцов

приготовленных, для гистологического анализа [134]. В этих случаях требуется предварительная обработка материала с целью удаления фиксаторов и стабилизаторов, присутствие которых отрицательно влияет на качество и количество полученной ДНК, и, соответственно, на успешное проведение ПЦР-тестирования [83]. Поскольку забор биоптата ассоциируется с хирургическим вмешательством, что может быть нежелательной процедурой, особенно у детей, тестирование материала, накопленного под корочкой в зоне инфильтрата первичного аффекта, является хорошей альтернативой и позволяет подтвердить диагноз с использованием ПЦР [96, 115, 156]. Материал забирается с помощью стерильного ватного тампона, который потом помещается в стерильную пробирку и элюируется стерильным раствором согласно протоколу экстракции ДНК [70, 96].

При тестировании образцов крови, ЭДТА или цитрат натрия являются лучшим выбором антикоагулянтов по сравнению с гепарином. Остаточные количества гепарина в дозах 0,0016–0,1 U на 50 µL реакции ингибирует ПЦР прямо пропорционально количеству гепарина [162]. С целью учета нежелательных ингибирующих компонентов, потенциально присутствующих в клинических образцах, рекомендуется повторное тестирование с другим геном, а также детекция нейтральных (конститутивных) хозяйских генов (например, β-актин) [51]. Использование нового поколения полимераз, характеризующихся меньшей чувствительностью к различным ингибиторам ПЦР, позволяет в определенной степени разрешить проблему эффективной амплификации ДНК из разнообразных образцов [62].

В настоящее время все больше внимания уделяется выбору праймеров, обеспечивающих максимальную специфичность, а также эффективность амплификации с учетом вторичной и третичной структуры участков ДНК и самих праймеров, использование в качестве мишени для ПЦР мультикопийных генов или уникальных последовательностей, идентифицированных на плазмидах отдельных видов риккетсий, а также анализ филогенетических различий между близкородственными риккетсиями [48, 51, 73].

В географических регионах с известным спектром риккетсиозных возбудителей применяется ПЦР с использованием разных типов ПЦР-зондов [69, 130]. Однако необходимо учитывать возможность циркуляции ранее неизвестных патогенов на той же территории. Для обеспечения эффективного и надежного выявления всех возможных возбудителей, рекомендуется проводить детекцию с использованием двух параллельных реакций и зондов, один набор для детекции консервативных фрагментов для определения принадлежности потенциального

ТАБЛИЦА 2. ПЦР ПРАЙМЕРЫ НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РИКЕТСИОЗНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Ген	Тип реакции	Специфичность	Название праймера	Назначение праймеров	Сиквентс праймера (5-3)	Ссылка
16S рРНК	Стандартная ПЦР	<i>α-Proteobacteria</i>	16S-WFD1T 16S-ECOLI-1073R	первичная реакция	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ACGAGCTGACGACAGCCATG	[157]
	TaqMan	род <i>Rickettsia</i>	Rsp-F1 Rsp-R	TaqMan праймеры для клещевой группы	CGCAACCCCTCATCTTATTTGC CCTCTGTAACAACACCATTTGAGCA	[59]
50S рибосомальный белок L16	TaqMan	род <i>Rickettsia</i>	Rsp-F2 Rsp-Probe	5' TaqMan праймер для группы сыпного тифа TaqMan зонд	CGCAACCCCTTATCTTATTTGC FAM-TAAGAAAACCTGCCGGTGATAAGCCGGAG-BHQ	[73]
	TaqMan	род <i>Rickettsia</i>	RanP8_F RanP8_R	TaqMan праймеры	AGCTTGCTTTTGGATCATTTGG TTCTTGGCCTTTTCATACATCTAG T	[73]
	Гнездовая ПЦР	<i>Rickettsia</i> , клещевая группа	RanP8_P R17-122 R17-500	TaqMan зонд первичная реакция	FI-CCTGCTTCTATTTGTCTTGCAGTAACACGGCCA-BHQ1 CAGAGTGCTATGAACAACAAGG CTTGCCATTGCCCATCAGGTTG	[151]
Ген 17 kDa белка	Гнездовая ПЦР	<i>Rickettsia</i> , клещевая группа	TZ15 TZ16	гнездовая реакция	TTCTCAATTCGGTAAGGGC ATATTGACCAAGTGTATTTCC	[89]
	TaqMan	<i>Rickettsia</i> , клещевая группа	RPID RP2	гнездовая реакция	CGGTACACTTCTTGGTGGCCGACGAGGT TTCACGGCAATATGACCTGTACTGTTC	[68]
	TaqMan	<i>Rickettsia</i> , клещевая группа	R17K135F R17K249R	TaqMan праймеры	ATGAATAAACAAGGKACNGGHACAC AAGTAATGCRCTACACCTACTC	[87]
	Стандартная ПЦР	род <i>Rickettsia</i>	R17Kbpprobe R17K-C	TaqMan зонд TaqMan зонд	FAM-CGCGACCCGAATTGAGAACCAAGTAATGCGTGGCG-BHQ FAM-TTGGTTCTCAATTCGGTAAGGGTAAAGG-BHQ	[125]
gltA	Стандартная ПЦР	род <i>Rickettsia</i>	RPCS.877p RPCS.1258n	первичная реакция	GGGGCCCTGCTCACGGCGG ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	[82]
	TaqMan	род <i>Rickettsia</i>	CS-5 CS-6	TaqMan праймеры	GAGAGAAAATTATATATCCAAATGTTGAT AGGGTCTTCGTGCATTTCTT	[125]
ompA	Гнездовая или полугнездовая ПЦР	<i>Rickettsia</i> , клещевая группа	gltA probe RR190-70	TaqMan зонд 5'-праймер для первичной и полугнездовой ПЦР	FAM-CATTGTGCCATCCAGCCTACGGT-BHQ1 ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	[131]
	Гнездовая или полугнездовая ПЦР	<i>Rickettsia</i> , клещевая группа	RR190-701 RR190-602	3'-праймер для первичной ПЦР 3'-праймер для полугнездовой ПЦР	GTTCGGTTAATGGCAGCATCT AGTGCAGCATTCGGTCCCCCT	[131]
	Гнездовая реакция	<i>Rickettsia</i> , клещевая группа	190-FN1 190-RN1	гнездовая реакция	AAGCAATAACAACAAGGTC TGACAGTTATATACCTC	[139]

ОКОНЧАНИЕ ТАБЛИЦЫ 2

Ген	Тип реакции	Специфичность	Название праймера	Назначение праймеров	Сиквент праймера (5-3)	Ссылка
<i>ompA</i>	SYBR Green ПЦР	<i>Rickettsia</i> , клещевая группа	RR190-547 RR190-701	SYBR Green ПЦР праймеры	CCCTGCCGATAATTATACAGGTTTA GTTCGGTTAATGGCAGCATCT	[49]
<i>ompB</i>	Стандартная ПЦР	<i>Rickettsia</i> , клещевая группа	120-M59 120-807	первичная реакция	CCGCAGGGTTGGTAACTGC CCTTTTAGATTACCGCCTAA	[132]
<i>sca4</i>	Стандартная ПЦР	<i>Rickettsia</i> , клещевая группа	D1f D928r	первичная реакция	ATGAGTAAAGACGGTAACTT AAGCTATTGCGTCATCTCCG	[137]
неидентифицированный белок	TaqMan	<i>R. rickettsii</i>	RR16_F RR16_R RR16_P	TaqMan праймеры TaqMan зонд	AAATCAACGGGAAGAGCAAAAAC CCCTCCACTACCTGCATCAT FI-TCCTCTCCAATCAGCGATTС-ВНQ1	[73]
<i>Rsl07128</i> интергенный регион	TaqMan	<i>R. slovaca</i>	RSLO-F RSLO-R	TaqMan праймеры TaqMan зонд	GCAACGGTTTTTGGTATCGT AATCGAATGCACACCACCTT TCCCGTCCCAGCCATTCGTC	[129]
<i>ompB</i>	TaqMan	<i>R. slovaca</i>	Rsl0351F Rsl0479R Rsl0416P	TaqMan праймеры TaqMan зонд	CAGGTCAAGGTATTACTAATGCAC CACCGAAGTCTATGCTTCCCTACAC 6-FAM-TGTAATAATGGTCTGCTATTGG-TAMRA	[69]
неидентифицированный белок (RC0743)	TaqMan	<i>R. conorii</i>	RCO-F RCO-R	TaqMan праймеры TaqMan зонд	TTGGTAGGCAAGTAGCTAAGCAAA GGAAGTATATGGGAATGCTTTGAA GCGGTATTTCCTGAAAATAAGCCGGCA	[129]
<i>ompB</i>	Molecular beacon	<i>R. raoultii</i>	Rraou2850F2 Rraou2956R2 Rrao2896P	праймеры зонд	GTGGTGGTGTTCCTAATACTCC ACCTAAGTTGTATTAGTCTGTAGTAAAC 6-FAM-CGCGATATTGGCACTGTACAGT TAAAGCATCGCG-TAMRA	[69]
<i>ompB</i>	TaqMan	<i>R. aeschlimannii</i>	Raes280F Raes383R Raes307P	TaqMan праймеры TaqMan зонд	CATCACTAATGCTGCTAATAACCG CAGCAGCTTGTGCATTAGTAATA 6-FAM-CTCCTTTTGACCTTAGG GTTGATGCCG-TAMARA	[69]
23S рРНК	TaqMan	<i>R. helvetica</i>	Rickhelv.147f Rickhelv.211r	TaqMan праймеры TaqMan зонд	TTTGAAGGAGACACGGAAACACA TCCGGTACTCAAATCCTCACGTA 6FAM-AACCGTAGCGTACACTTA-MGBNIFQ	[31]

патогена к роду *Rickettsia*, и другой — для детекции видоспецифических фрагментов с целью этиологической идентификации возбудителя [72, 73]. При отсутствии специфических зондов, идентификация осуществляется путем сиквенирования и анализа амплифицированных фрагментов ДНК. Такой подход может быть рекомендован для тестирования клинических образцов и для детекции риккетсий в полевых образцах. При отсутствии клинических образцов, ПЦР-тестирование клещей и других эктопаразитов, собранных с кожи или одежды больного, является хорошим индикатором потенциального заражения при нахождении возбудителя в этих образцах [32, 35].

### Иммуногистологические исследования

Инфекционный процесс и воспалительная реакция в месте присасывания клеща и сыпь являются ведущими дерматологическими симптомами острой риккетсиозной инфекции, вызываемой большинством риккетсий, в том числе риккетсиями, циркулирующими на территории России [9, 15, 115]. Соответственно, при появлении первичного аффекта и/или сыпи, и подозрений на риккетсиоз, рекомендуется провести забор биоптата из места, охваченного поражением, и приготовить образец для иммуногистологической детекции риккетсий в зафиксированных тканях [153–155]. Такой подход часто применяется при исследовании фатальных риккетсиозов, так как разработанная методика дает хорошие результаты при изучении любого вида тканей внутренних органов. В настоящее время эта методика не применяется для диагностики риккетсиозов в России, возможно из-за доброкачественного течения этих заболеваний по сравнению с Лихорадкой Скалистых Гор и Средиземноморской лихорадкой.

Для проведения процедуры собранные образцы фиксируют в 10% забуференном формалине и заключают в парафин. Гистологические срезы освобождают от парафина и затем детектируют риккетсии с использованием специфической поликлональной сыворотки или моноклональных антител. Для выявления связанных антител, проводится обработка биотинилированными антиглобулиновыми конъюгатами и щелочной фосфатазой, меченной стрептавидином; присутствие сформировавшихся комплексов обнаруживается после обработки преципитирующим субстратом щелочной фосфатазы. Как отмечалось выше, при отсутствии свежих образцов ДНК может быть экстрагирована из фиксированных патологических образцов или образцов, приготовленных для гистологического анализа, однако в этих случаях требуется предварительная обработка материала с целью удаления фиксаторов и стабилизаторов, присутствие которых отрицатель-

но влияет на качество и количество полученной ДНК и, соответственно, на последующее ПЦР-тестирование [134]. Поскольку процедуры фиксации, заключения в парафин и депарафинизации могут вызвать дефрагментацию ДНК (зачастую только короткие фрагменты амплифицируются из патологических образцов), то в идеальном варианте ПЦР-тестирование должно проводиться на необработанном материале [39].

Несмотря на этот незначительный недостаток, иммуногистологические исследования играют важную роль в диагностике риккетсиозов. Помимо прямой детекции антигенов или ДНК риккетсий, эта методология позволяет определить наличие специфических патологических симптомов, типичных для риккетсиозов, включая микрососудистые изменения, формирование микротромбов, миграцию лимфоцитов и инфильтрацию макрофагами пораженного участка ткани [88]. В ранние сроки инфекции, при отсутствии детектируемого уровня антител и отрицательной ПЦР патологические и гистологические исследования представляют практически единственный метод для подтверждения диагноза риккетсиозной инфекции.

### Выделение риккетсий из клинических образцов

Выделение риккетсий из клинических образцов является наиболее достоверным методом подтверждения риккетсиозной этиологии заболевания и в историческом плане было первым диагностическим методом, использованным для этих целей. Несмотря на довольно длительную историю и наличие разных методов выделения, включая заражение морских свинок и мышей, заражение куриных эмбрионов и различных типов и модификаций клеточных культур, выделение риккетсий из клинических образцов представляет довольно трудоемкий процесс [79]. Успех выделения возбудителя определяется многими факторами: типом биологического материала, сроками взятия образцов, условиями их хранения и транспортировки, применением антибиотиков и др.

В принципе, присутствие одной живой риккетсии может быть вполне достаточно для начала инфекционного процесса при заражении животных или куриных эмбрионов. Однако практическое выделение риккетсий — весьма трудоемкая процедура, поэтому многие авторы предлагали различные приемы повышения эффективности этих методов [15, 79, 136].

Выделение риккетсий, как правило, осуществляется в специализированных лабораториях. В частности, лаборатории, имеющие опыт работы с вирусными организмами и соответствующими клеточными культурами, могут успешно справиться с задачей выделе-

ния риккетсий. В связи с высокой потенциальной опасностью аэрогенного заражения риккетсиями в некоторых лабораториях имели место случаи профессионального заражения этими возбудителями [60, 104, 107, 160]. Более того, в России только лаборатории имеющие санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с возбудителями 2 группы патогенности могут осуществлять эти исследования [14]. В соответствии с СП 1.3.1318-03 ко 2 группе патогенности относятся следующие риккетсии: *R. prowazekii*, *R. typhi*, *R. rickettsii*, *O. tsutsugamushi* и *C. burnetii*. К 3 группе патогенности относятся: *R. sibirica*, *R. conorii*, *R. akari*, *R. australis*, *R. japonica* и другие близкородственные риккетсии. Однако, выделение риккетсий, относящихся к 3 группе патогенности также должно осуществляется лишь в специализированных лабораториях, так как исследуемый биологический материал потенциально может быть заражен возбудителями 2 группы патогенности, например вирусом клещевого энцефалита [18, 119].

Для изоляции ДНК риккетсий пригодны как клинические материалы, так и клещи, блохи и другие эктопаразиты [32, 35, 47, 79, 80, 110]. Исключение составляют образцы, загрязненные в процессе сбора или хранившиеся в условиях, неподходящих для сохранения метаболически активных риккетсий; но как правило эти факторы не влияют на выделение качественной ДНК и ПЦР-детектирование. В большинстве случаев, жизнеспособность риккетсий в клинических образцах сохраняется в течение первых 24–48 ч на льду при оптимальной влажности; клещей и других эктопаразитов лучше хранить при комнатной температуре, чтобы предотвратить рост поверхностных бактерий и грибов. Образцы биоптата кожи и эктопаразитов представляют наибольшую методологическую проблему в процессе изоляции риккетсий, поскольку свободноживущие быстрорастущие бактерии и грибки могут подавить размножение медленно растущих риккетсий. Для предотвращения возможной контаминации, рекомендуется проводить поверхностную обработку эктопаразитов 10% раствором хлорамина и затем 70% раствором этилового спирта, соответственно в течение 10 и 5 мин перед их использованием [46, 47]. Другие методы обработки включают последовательное промывание в растворах 2% Микро-Кем Плюс (Micro-Chem Plus), 10,5% гипохлорита натрия (NaOCl) и 3% перекиси водорода [109]. Обычно клещ разрезается на две половинки, одна используется для приготовления ДНК, а другая — для выделения риккетсий. Образцы кожи рекомендуется разделить на несколько фрагментов, используемых для патогистологических исследований, ПЦР и выделения [108, 110]. При использовании об-

разцов крови, с целью уменьшения количества эритроцитов в клеточной культуре рекомендуется проводить фракционирование и использовать для заражения лейкоцитарную фракцию.

При выделении риккетсий используют несколько клеточных культур, включая клетки VERO, полученные из почечных клеток мартышки, облученные клетки мышинных фибробластов (L929) и эмбриональные легочные клетки человека [79, 108, 110]. Использование первичных культур из клеток клещей и других насекомых получило широкое применение для выделения риккетсий, неадаптированных к росту в клетках, полученных из теплокровных организмов [52, 91, 136]. Наиболее успешной является процедура заражения клеток, культивируемых на покровном стекле, помещенном в культуральный флакон или планшет [79, 136]. В зависимости от количества инфицированного материала заражение можно проводить во флаконе для клеточных культур или в 6-, 24- или 96-луночных планшетах.

Материал, приготовленный для заражения, вносят в заранее приготовленные пробирки или плашки и центрифугируют для увеличения эффективности адсорбирования риккетсий к рецепторам клеток монослоя, супернатант удаляют и добавляют полноценную клеточную среду с необходимым набором факторов роста. Наличие современной информации об индивидуальных метаболических особенностях разных микроорганизмов позволяет создать специфические клеточные среды и выбрать условия культивирования, обеспечивающие рост риккетсий, для которых клеточные культуры были в прошлом довольно проблематичны, как например для *R. felis* [78]. Также появилась возможность культивирования облигатных бактерий, таких как *C. burnetii* в бесклеточной среде [106]. Для предотвращения бактериального и грибкового загрязнения рекомендуется добавлять 0,2% раствор пенициллина и стрептомицина и 1% раствор амфотерицина (фунгизон) или аналогичные препараты. Зараженные клетки затем инкубируют при оптимальной температуре от 28 до 34°C, начиная с 48–72 ч после заражения готовят мазки и/или выделяют ДНК из 1 мл клеточной среды, чтобы оценить рост риккетсий. При наличии признаков роста и накопления риккетсий проводят пассирование и накопление полученного изолята. Последующая характеристика основана на анализе нескольких фрагментов риккетсиальной хромосомы, включая фрагменты генов *OmpA*, *OmpB*, *Sca4* и *GltA*, рекомендованные для оценки межвидовых и внутривидовых различий риккетсий [54], а также межгенных регионов, позволяющих проводить дальнейшую и более тщательную идентификацию, особенно в случае близкородственных изолятов [48, 54].

## Заключительные рекомендации

Основываясь на особенностях клинической картины риккетсиозных заболеваний, биологии риккетсий и кинетики процессов взаимодействия риккетсий с клеткой хозяина, будущие подходы в лабораторной диагностике риккетсиозов потребуют дальнейшего развития и усовершенствования серологических и молекулярных методов. Использование новых технологий будет способствовать совершенствованию рутинных методов диагностики, повышению их чувствительности и специфичности.

Вполне вероятно, что МИФ и иммуноферментные методы будут продолжать доминировать в связи с ограниченным числом лабораторий, производящих риккетсиальные антигены. Поскольку рынок сбыта риккетсиальных диагностических препаратов относительно ограничен, лишь небольшое число биотехнологических предприятий способно инвестировать в дальнейшее развитие альтернативных методов для производства очищенных препаратов риккетсий. В настоящее время большинство МИФ-диагностикомов характеризуется групповой реактивностью и, как правило, несколько патогенных риккетсий с перекрестно реагирующими антигенами циркулируют на одной и той же территории, поэтому новое поколение тестов должно обеспечивать детекцию на видовом уровне. В связи с этим, возможность проведения рутинной перекрестной адсорбции с панелью региональных антигенов представляет уникальную возможность для более аккуратного и эффективного эпиднадзора риккетсиозов и своевременного распознавания новых заболеваний [81]. Поскольку производство большого набора индивидуальных риккетсиальных антигенов не представляется возможным или рентабельным начинанием, разработка мультиплексных диагностических тестов является оптимальной альтернативой для решения этой проблемы.

Эти методы могут быть разработаны на основе традиционных иммуноферментных методов, но должны обладать повышенной чувствительностью и потенциалом для дифференциальной идентификации различных возбудителей.

Совершенно очевидно, что молекулярные методы будут доминировать в качестве методов диагностики в острой стадии заболевания в виду их универсальности, транспортабельности и теоретически высокой чувствительности. Например, разработка новых методов детекции на основе изотермической амплификации нуклеиновых кислот вообще устраняет необходимость использования термочиклеров [97, 130]. Такие методы уже стали разрабатываться применительно к диагностике риккетсиозов [97, 111] и, возможно, станут первыми диагностическими тестами, которые можно применять непосредственно в клинических и стационарных условиях, не отходя от постели больного [147]. Широкое использование этих методов в клинической практике потребует более детальных испытаний и стандартизации используемых реагентов, обязательного получения идентичных, сопоставимых и воспроизводимых результатов при выполнении теста разными лаборантами. Также не исключено, что методы амплификации целого генома риккетсий будут использоваться в скором будущем для увеличения вероятности детекции единичных микроорганизмов в отдельном органе или ткани [74].

В целом, наличие усовершенствованных методов лабораторной диагностики позволит осуществлять более быструю и надежную идентификацию классических и новых риккетсиозов, а также клинических случаев с атипичными симптомами. Эти новые тенденции должны улучшить качество медицинского обслуживания населения, страдающего от этих заболеваний, и повысить эффективность эпидемического надзора за риккетсиозами по стране в целом и в ситуациях их случайного ввоза из-за границы.

## Список литературы

1. Антонов Н.И., Найшат А.Г. Сыпная клещевая лихорадка ДВК // Дальневосточный медицинский журнал. — 1936. — Вып. 5. — С. 77–86.
2. Арсеньева И.В., Гранитов В.М., Шпынов С.Н. Сибирский клещевой тиф в Алтайском Крае: клинко-лабораторная диагностика // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. — 2012. — № 20. — С. 28–33.
3. Балашов Ю.С., Дайтер А.Б. Кровососущие членистоногие и риккетсии. — Л.: Наука, 1973. — 249 с.
4. Гафарова М.Т., Вербенец Е.А. Эпидемиологические особенности и клинические проявления марсельской лихорадки в Севастополе // Инфекционный контроль. — 2013. — № 3–4. — С. 37.
5. Глушакова Л.И., Корабельникова И.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Микрюкова Т.П., Кононова Ю.В., Кононова С.Н., Тупота Н.Л., Карташов М.Ю., Чаусов Е.В., Локтев В.Б., Егорова Ю.И. Выявление возбудителей заболеваний в *Ixodes persulcatus* на территории Республики Коми // Сибирский медицинский журнал. — 2012. — № 4. — С. 88–91.
6. Иголкина Я.П., Фоменко Н.В., Ливанова Н.Н., Асанин В.Б., Гостева Л.А., Черноусова Н.Я., Пар, В.А. Выявление различных видов риккетсий у иксодовых клещей, в крови людей и мелких млекопитающих на юге Западной Сибири и на Урале // Бюллетень сибирской медицины. — 2006. — Прил. 1. — С. 121–125.
7. Козлова И.В., Дорошенко Е.К., Лисак О.В., Джиоев Ю.П., Верховзина М.М., Демина Т.В., Пар В.А., Ткачев С.Е., Фоменко Н.В., Сунцова О.В., Черноиванова О.О., Парамонова А.И., Ревизор А.О., Злобин В.И. Видовое и генетическое разнообразие возбудителей клещевых инфекций на территории Восточной Сибири // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. — 2012. — № 2. — С. 75–82.

8. Козлова И.В., Злобин В.И., Верховина М.М., Дигас С.Э., Хаснатинов М.А., Шулунов С.С., Аитов К.А., Беликов С.И., Лисак О.В., Дорошенко Е.К. Актуальные аспекты изучения и профилактики клещевого риккетсиоза в Прибайкалье // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. — 2007. — № 3, прил. 55. — С. 99–105.
9. Лобан К.М., Лобзин Ю.В., Лукин Е.П. Риккетсиозы человека (руководство для врачей). — М.: Элби, 2002. — 473 с.
10. Лысковцев М.М. Клещевой риккетсиоз. — М.: Медгиз, 1963. — 276 с.
11. Милль Е.И. Клещевая лихорадка в Приморье // Дальневосточный медицинский журнал. — 1936. — Вып. 3. — С. 54–56.
12. Нефедова В.В., Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В., Горелова Н.Б., Воробьева Н.Н. Микроорганизмы порядка Rickettsiales у таежного клеща (*Ixodes persulcatus* Sch.) в Предуралье // Вестник РАМН. — 2008. — № 7. — С. 47–50.
13. Пуховская Н.М., Рар В.А., Иванов Л.И., Высохина Н.П., Иголкина Я.П., Фоменко Н.В., Зарайченкова Н.В., Орешкина С.Г., Мальцева И.П., Чистов В.А., Чечикова В.А. ПЦР детекция возбудителей инфекций, передающихся клещами на Камчатке // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. — 2010. — № 4. — С. 36–39.
14. Российская Федерация, Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.3.1318-03. Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека 1–4 групп патогенности (опасности), генноинженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами. — М., 2003.
15. Рудаков Н.В., Оберт А.С. Клещевой риккетсиоз. — Омск, 2001. — 120 с.
16. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Ястребов В.К., Самойленко И.Е., Кумпан Л.В., Решетникова Т.А., Абрамова Н.В., Колмеев А.Н. Основные итоги разработки проблемы риккетсиозов, передающихся иксодовыми клещами, в России // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2012. — № 5 (66). — С. 29–33.
17. Самойленко И.Е., Рудаков Н.В., Якименко В.В. Результаты экспериментальных исследований взаимодействия *Rickettsia sibirica* с клещами // Природноочаговые инфекции человека; под ред. Н.В. Рудакова. — Омск: Омский научно-исследовательский институт природноочаговых инфекций, 1996. — С. 204–208.
18. Ушаков А.В., Степанова Т.Ф., Пекло Г.Н. Экологическая база для комбинации натуральных очагов лептоспироза, клещевого энцефалита и клещевого боррелиоза в экосистемах северной лесостепной подзоны в Тюменской области // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. — 2007. — № 2. — С. 12–17.
19. Чаусов Е.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В., Першикова Н.Л., Москвитина Н.С., Романенко В.Н., Иванова Н.В., Большакова Н.П., Москвитин С.С., Коробицын И.Г., Гашков С.И., Тютеньков О.Ю., Куранова В.Н., Кравченко Л.Б., Сучкова Н.Г., Агулова Л.П., Локтев В.Б. Генетическое разнообразие инфекционных агентов, переносимых иксодовыми клещами в г. Томске и его пригородах // Паразитология. — 2009. — № 43. — С. 374–388.
20. Шматиков М.Д., Велик М.А. Клещевая сыпная лихорадка // Клиническая медицина. — 1939. — Вып. 17. — С. 124–126.
21. Шпынов С.Н., Raola P., Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Танкибаев М.А., Тарасевич И.В., Raoult D., Ковалев Н.Г., Чубиро М.И., Гаврилов А.П. Распространение риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки на территории России и Казахстана и их экологические связи с клещами рода *Dermacentor* // Природноочаговые болезни человека. Республиканский сборник научных работ, посвященных 80-летию Омского НИИПИ. — Омск, 2001. — С. 69–75.
22. Шпынов С.Н., Арсеньева И.В., Гранитов В.М., Рудаков Н.В. Клещевой риккетсиоз в Алтайском крае: эпидемиологические аспекты, молекулярно-биологическая верификация // Сибирский медицинский журнал. — 2008. — № 7. — С. 43–46.
23. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Ястребов В.К., Леонова Г.Н., Хазанова Т.Г., Егорова Н.В., Борисова О.Н., Прейднер В.П., Безруков Г.В., Fournier P.E., Raoult D. Первое выявление *Rickettsia heilongjiangensis* в клещах *Haemophysalis concinna* на территории России // Здоровье населения и среда обитания. — 2003. — № 12. — С. 16–20.
24. Шулунов С.С., Хаснатинов М.А., Дачникова Г.А., Козлова И.В., Адельшин Р.В., Беликов С.И. Разнообразие риккетсий в иксодовых клещах на территории Прибайкалья // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. — 2007. — № 1 (53). — С. 83–85.

Ссылки 25–165 см. в References (с. 129–134). See References for numbers 25–165 at pp. 129–134.

## MODERN APPROACHES TO LABORATORY DIAGNOSIS OF RICKETTSIAL DISEASES

Eremeeva M.E.<sup>a</sup>, Shpynov S.N.<sup>b</sup>, Tokarevich N.K.<sup>c,d</sup>

<sup>a</sup> Georgia Southern University, Statesboro, GA, USA

<sup>b</sup> N.F. Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>d</sup> North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** We present a concise review of contemporary laboratory methods for diagnosis of rickettsioses with special emphasis on diseases known in Russian Federation. Classic and emerging rickettsioses are transmitted by a diverse and expanding group of arthropod vectors including ticks, fleas, lice and mites. While epidemiological and clinical clues can provide information important for initial suspicion of rickettsial infection, sensitive and specific laboratory methods are

necessary for providing probable or confirmed diagnosis of the rickettsial infection. Accurate and rapid confirmation of rickettsial infection is important for ensuring proper clinical care and prompt initiation of antibiotic therapy. Correct identification of the etiology of rickettsial diseases is also important for early identification of clustered cases, novel foci of infections, and for timely initiation of public health responses to these potentially fatal infections.

**Key words:** Spotted fever, zoonotic infection, clinical symptoms, diagnostic, North Asian tick typhus, serology, PCR.

#### Authors:

**Eremeeva M.E.** ✉, PhD, MD (Biology), Associate Professor, Director of the Public Health Core Laboratory, Georgia Southern University, Statesboro, GA, USA;

JPH COPH, Georgia Southern University, Statesboro, GA 30458, USA.

Phone: +1 912 478-05-04. Fax: +1 912 478-58-11.

E-mail: meremeeva@georgiasouthern.edu

**Shpynov S.N.**, PhD, MD (Medicine), Head of Laboratory of Ecology of Rickettsiae, N.F. Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

**Tokarevich N.K.**, PhD, MD (Medicine), Head of Laboratory of Zoonoses, St. Petersburg Pasteur Institute; Professor, Department of Epidemiology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation.

#### References

- Antonov N.I., Nayshtat A.G. Sypnaya kleshchevaya likhoradka DVK [Tick spotted fever DVK]. *Dal'nevostochnyy meditsinskiy zhurnal — Far Eastern Journal of Medicine*, 1936, iss. 5, pp. 77–86.
- Arsen'eva I.V., Granitov V.M., Shpynov S.N. Sibirskiy kleshchevoy tif v Altayskom Krae: kliniko-laboratornaya diagnostika [Siberian tick typhus in Altai Krai: clinico-laboratory diagnostics]. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii — Far East Journal of Infectious Pathology*, 2012, no. 20, pp. 28–33.
- Balashov Yu.S., Dayter A.B. Krovososushchie chlenistonogie i rikketsii [Bloodsucking arthropods and rickettsiae]. *Leningrad: Nauka*, 1973, 249 p.
- Gafarova M.T., Verbenets E.A. Epidemiologicheskie osobennosti i klinicheskie proyavleniya marsel'skoy likhoradki v Sevastopole [Epidemiological characteristics and clinical manifestations of Marseilles fever in Sevastopol]. *Infekcionnyy kontrol' — Infection Control*, 2013, no. 3–4, p. 37.
- Glushakova L.I., Korabel'nikova I.V., Ternovoy V.A., Protopopova E.V., Mikryukova T.P., Kononova Yu.V., Konovalova S.N., Tupota N.L., Kartashov M.Yu., Chausov E.V., Loktev V.B., Egorova Yu.I. Vyyavlenie vozбудiteley zabolevaniy v Ixodes persulcatus na territorii respubliki Komi [Loktev V.B., Egorova Yu.I. Detection of pathogenic agents in Ixodes persulcatus from Komi Republic]. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal — Siberian Journal of Medicine*, 2012, no. 4, pp. 88–91.
- Igolkina Ya.P., Fomenko N.V., Livanova N.N., Aseanin V.B., Gosteva L.A., Chernousova N.Ya., Rar, V.A. Vyyavlenie razlichnykh vidov rikketsiy u iksodovykh kleshchey, v krovi lyudey i melkikh mlekopitayushchikh na yuge Zapadnoy Sibiri i na Urale [Detection of different species of rickettsiae in ixodid ticks, human blood and small animals from the south of Western Siberia and Ural]. *Byulleten' sibirskoy meditsiny — Bulletin of Siberian Medicine*, 2006, suppl. 1, pp. 121–125.
- Kozlova I.V., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Dzhoiev Yu.P., Verkhovzina M.M., Demina T.V., Rar V.A., Tkachev S.E., Fomenko N.V., Suntsova O.V., Chernousova O.O., Paramonova A.I., Revizor A.O., Zlobin V.I. Vidovoe i geneticheskoe raznootobrazie vozбудiteley kleshchevykh infektsiy na territorii Vostochnoy Sibiri [Species and genetic variety of tick infections pathogens on the territory of the Eastern Siberia]. *Biulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra SO RAMN — Bulletin of East Siberian Scientific Centre of Siberian Branch of RAMS*, 2012, no. 2, pp. 75–82.
- Kozlova I.V., Zlobin V.I., Verkhovzina M.M., Digas S.E., Hasnatinov M.A., Shulunov S.S., Aitov K.A., Belikov S.I., Lisak O.V., Doroshchenko E.K. Aktual'nye aspekty izucheniya i profilaktiki kleshchevogo rikketsioza v Pribaykal'e [Topical aspects in studies and prophylactics of tick-borne rickettsiosis in Pribaikalye region]. *Biulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra SO RAMN — Bulletin of East Siberian Scientific Centre of Siberian Branch of RAMS*, 2007, no. 3, suppl. 55, pp. 99–105.
- Loban K.M., Lobzin Yu.V., Lukin E.P. Rikketsiozy cheloveka (rukovodstvo dlya vrachey) [Human Rickettsioses (guide for physicians)]. *Moscow: Elbi*, 2002, 473 p.
- Lyskovtsev M.M. Kleshchevoy rikketsioz [Tickborne rickettsiosis]. *Moscow: Medgiz*, 1963, 276 p.
- Mill' E.I. Kleshchevaya likhoradka v Primor'e [Tickborne fever in Maritime region]. *Dal'nevostochnyy meditsinskiy zhurnal — Far Eastern Medical Journal*, 1936, iss. 3, pp. 54–56.
- Nefedova V.V., Korenberg E.I., Kovalevskiy Yu.V., Gorelova N.B., Vorob'eva N.N. Mikroorganizmy poryadka Rickettsiales u taezhnogo kleshcha (Ixodes persulcatus Sch.) v Predural'e [Microorganisms of the order Rickettsiales in taiga tick (Ixodes persulcatus Sch.) from the Pre-Ural region]. *Vestnik RAMN — Vestnik of Russian Academy of Sciences*, 2008, no. 7, pp. 47–70.
- Pukhovskaya N.M., Rar V.A., Ivanov L.I., Vysokhina N.P., Igolkina Ya.P., Fomenko N.V., Zaraychenkova N.V., Oreshkina S.G., Mal'tseva I.P., Chistov V.A., Chechikova V.A. PTSR detektsiya vozбудiteley infektsiy, peredayushchikhsya kleshchami na Kamchatke [PCR detection of infectious agents transmitted by ticks in Kamchatka]. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni — Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 2010, no. 4, pp. 36–39.
- Rossiyskaya Federatsiya, Sanitarno-epidemiologicheskie pravila. SP 1.3.1318-03. Poryadok vydachi sanitarno-epidemicheskogo zaklyucheniya o vozmozhnosti provedeniya rabot s vozбудiteleyami infektsionnykh zabolevaniy cheloveka 1–4 grupp patogennosti (opasnosti), genoinzhenerno-modifitsirovannymi mikroorganizmami, yadami biologicheskogo proiskhozhdeniya i gel'mintami [Russia Federation, Sanitary-Epidemiological Regulations. SP 1.3.1318-03. The procedure for issuing sanitary-epidemiological conclusions about the possibility of working with agents of human infectious diseases of 1–4 pathogenicity groups (hazard), genetically modified micro-organisms, toxins of biological origin and helminthes]. *Moscow*, 2003.
- Rudakov N.V., Obert A.S. Kleshchevoy rikketsioz [Tickborne rickettsiosis]. *Omsk*, 2001, 120 p.



16. Rudakov N.V., Shpynov S.N., Yastrebov V.K., Samoilenko I.E., Kumpan L.V., Reshetnikova T.A., Abramova N.V., Kolomeets A.N. Osnovnye itogi razrabotki problemy rickettsiozov, peredayushchikhysya iksodovymi kleshchami, v Rossii [The present state of the problem of tick-borne rickettsioses in Russia]. *Epidemiologiya i vaksinooprofilaktika — Epidemiology and Prophylactic Vaccination*, 2012, vol. 66, no. 5, pp.29–33.
17. Samoilenko I.E., Rudakov N.V., Yakimenko V.V. Rezul'taty eksperimental'nykh issledovaniy vzaimodeystviya Rickettsia sibirica s kleshchami. Prirodnoochagovye infektsii cheloveka. Pod red. N.V. Rudakova [Results of experimental studies of Rickettsia sibirica interactions with ticks. Human infections with natural foci. Ed. by Rudakov N.V.]. *Omsk: Omsk Research Institute of Natural Foci Infections Publishing House*, 1996, pp. 204–208.
18. Ushakov A.V., Stepanova T.F., Peklo G.N. Ekologicheskaya baza dlya kombinatsii natural'nykh ochagov leptospiroza, kleshchevogo entsefalita i kleshchevogo borrelioz v ekosistemakh severnoy leso-stepnoy podzony v Tyumenskoy oblasti [Ecological basis for combining natural foci of leptospirosis, tick encephalitis and tick borreliosis in ecosystems of northern forest-steppe subzone in Tyumen region]. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni — Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 2007, no. 2, pp. 12–17.
19. Chausov E.V., Ternovoy V.A., Protopopova E.V., Konovalova S.N., Kononova Yu.V., Pershikova N.L., Moskvitina N.S., Romanenko V.N., Ivanova N.V., Bol'shakova N.P., Moskvitin S.S., Korobitsyn I.G., Gashkov S.I., Tyuten'kov O.Yu., Kuranova V.N., Kravchenko L.B., Suchkova N.G., Agulova L.P., Loktev V.B. Geneticheskoe raznoobrazie infektsionnykh agentov, perenosimyykh iksodovymi kleshchami v g. Tomske i ego prigorodakh [Genetic diversity of infectious agents transmitted by ixodid ticks in Tomsk and its suburbs]. *Parazitologiya — Parazitologia*, 2009, no. 43, pp. 374–388.
20. Shmatikov M.D., Velik M.A. Kleshchevaya synnaya likhoradka [Tick-borne spotted fever]. *Klinicheskaya meditsina — Clinical Medicine*, 1939, iss. 17, pp. 124–126.
21. Shpynov S.N., Parola P., Rudakov N.V., Samoilenko I.E., Tankibaev M.A., Tarasevich I.V., Raoult D., Kovalev N.G., Chubiro M.I., Gavrilov A.P. Rasprostraneniye rickettsiy gruppy kleshchevoy pyatnistoy likhoradki na territorii Rossii i Kazakhstana i ikh ekologicheskie svyazi s kleshchami roda Dermacentor [Distribution of the spotted fever group rickettsiae on the territory of Russia and Kazakhstan and their associations with ticks of the genus Dermacentor]. Prirodnoochagovye bolezni cheloveka. Respublikanskiy sbornik nauchnykh rabot, posvyashchennykh 80-letiyu Omskogo NIPI [Human diseases with natural foci. National Proceedings of scientific publications for 80th anniversary of Omsk Research Institute of natural Foci Infections]. *Omsk*, 2001, pp. 69–75.
22. Shpynov S.N., Arsen'eva I.V., Granitov V.M., Rudakov N.V. Kleshchevoy rickettsioz v Altayskom krae: epidemiologicheskie aspekty, molekulyarno-biologicheskaya verifikatsiya [Tick-borne rickettsiosis in the Altay region: epidemiological aspects, molecular-biological confirmation]. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal — Siberian Journal of Medicine*, 2008, no. 7, pp. 43–46.
23. Shpynov S.N., Rudakov N.V., Yastrebov V.K., Leonova G.N., Hazanova T.G., Egorova N.V., Borisova O.N., Preydnier V.P., Bezrukov G.V., Fournier P.E., Raoult D. Pervoe vyyavlenie Rickettsia heilongjiangensis v kleshchakh Haemophysalis concinna na territorii Rossii [First detection of Rickettsia heilongjiangensis in Haemophysalis concinna ticks from Russia]. *Zdorove naseleniya i sreda obitaniya — Population Health and Habitat*, 2003, no. 12, pp. 16–20.
24. Shulunov S.S., Hasnatinov M.A., Dachnikova G.A., Kozlova I.V., Adel'shin R.V., Belikov S.I. Raznoobrazie rickettsiy v iksodovykh kleshchakh na territorii Pribaykal'ya [Diversity of rickettsiae in ixodes ticks in Baikal area]. *Bulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra SO RAMN — Bulletin of East Siberian Scientific Centre of Siberian Branch of RAMS*, 2007, vol. 53, no. 1, pp. 83–85.
25. Adams J.R., Schmidtman E.T., Azad A.F. Infection of colonized cat fleas, Ctenocephalides felis (Bouche), with a rickettsia-like microorganism. *Am. J. Trop. Meg. Hyg.*, 1990, vol. 43, pp. 400–409.
26. Anderson B.E., Tzianabos T. Comparative sequence analysis of a genus-common rickettsial antigen gene. *J. Bacteriol.*, 1989, vol. 171, pp. 5199–5201.
27. Ando S., Kurosawa M., Sakata A., Fujita H., Sakai K., Sekine M., Katsumi M., Saitou W., Yano Y., Takada N., Takano A., Kawabata H., Hanaoka N., Watanabe H., Kurane I., Kishimoto T. Human Rickettsia heilongjiangensis infection, Japan. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010, vol. 16, pp. 1306–1308.
28. Azad A.F. Epidemiology of murine typhus. *Ann. Rev. Entomol.*, 1990, vol. 35, pp. 553–569.
29. Azad A.F., Radulovic S., Higgins J.A., Noden B.H., Troyer J.M. Flea-borne rickettsioses: ecologic considerations. *Emerg. Infect. Dis.*, 1997, vol. 3, no. 3, pp. 319–327.
30. Bechah Y., Capo C., Mege J.L., Raoult D. Epidemic typhus. *Lancet Infect. Dis.*, 2008, vol. 8, no. 7, pp. 417–426.
31. Boretti F.S., Perreten A., Meli M.L., Cattori V., Willi B., Wengi N., Hornok S., Honegger H., Hegglin D., Woelfel R., Reusch C.E., Lutz H., Hofmann-Lehmann R. Molecular investigations of Rickettsia helvetica infection in dogs, foxes, humans, and Ixodes ticks. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, vol. 75, no. 10, pp. 3230–3237.
32. Brouqui P., Bacellar F., Baranton G., Birtles R.J., Bjoersdorff A., Blanco J.R., Caruso G., Cinco M., Fournier P.E., Francavilla E., Jensenius M., Kazar J., Laferl H., Lakos A., Lotric Furlan S., Maurin M., Oteo J.A., Parola P., Perez-Eid C., Peter O., Postic D., Raoult D., Tellez A., Tselentis Y., Wilske B. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2004, vol. 10, no. 12, pp. 1108–1132.
33. Carl M., Tibbs C.W., Dobson M.E., Paparello S., Dasch G.A. Diagnosis of acute typhus infection using the polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.*, 1990, vol. 161, no. 4, pp. 791–793.
34. Chao C.C., Zhang Z., Wang H., Alkhalil A., Ching W.M. Serological reactivity and biochemical characterization of methylated and unmethylated forms of a recombinant protein fragment derived from outer membrane protein B of Rickettsia typhi. *Clin. Vac. Immunol.*, 2008, vol. 15, no. 4, pp. 684–690.
35. Chapman A.S., Bakken J.S., Folk S.M., Paddock C.D., Bloch K.C., Krusell A., Sexton D.J., Buckingham S.C., Marshall G.S., Storch G.A., Dasch G.A., McQuiston J.H., Swerdlow D.L., Dumler S.J., Nicholson W.L., Walker D.H., Eremeeva M.E., Ohl C.A. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis — United States: a practical guide for physicians and other healthcare and public health professionals. *MMWR Rec. Rep.*, 2006, vol. 55, RR-4, pp. 1–27.

36. Ching W.M., Wang H., Jan B., Dasch G.A. Identification and characterization of epitopes on the 120-kilodalton surface protein antigen of *Rickettsia prowazekii* with synthetic peptides. *Infect. Immun.*, 1996, vol. 64, no. 4, pp. 1413–1439.
37. Civen R., Ngo V. Murine typhus: an unrecognized suburban vectorborne disease. *Clin. Infect. Dis.*, 2008, vol. 46, no. 6, pp. 913–918.
38. Clements M.L., Dumler J.S., Fiset P., Wisseman C.L., Jr., Snyder M.J., Levine M.M. Serodiagnosis of Rocky Mountain spotted fever: comparison of IgM and IgG enzyme-linked immunosorbent assays and indirect fluorescent antibody test. *J. Infect. Dis.*, 1983, vol. 148, no. 5, pp. 876–880.
39. Dietrich D., Uhl B., Sailer V., Holmes E.E., Jung M., Meller S., Kristiansen G. Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition. *PLoS One.*, 2013, vol. 8, no. 10, pp. e77771.
40. Doudier B., Olano J., Parola P., Brouqui P. Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens. *Vet. Parasitol.*, 2010, vol. 167, no. 2–4, pp. 149–154.
41. Edouard S., Gonin K., Turc Y., Angelakis E., Socolovschi C., Raoult D. Eschar and neck lymphadenopathy caused by *Francisella tularensis* after a tick bite: a case report. *J. Med. Case. Rep.*, 2011, vol. 5, pp. 108.
42. Elghetany M.T., Walker D.H. Hemostatic changes in Rocky Mountain spotted fever and Mediterranean spotted fever. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1999, vol. 112, no. 2, pp. 159–168.
43. Eremeeva M., Yu X., Raoult D. Differentiation among spotted fever group rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, vol. 32, pp. 803–810.
44. Eremeeva M.E., Balayeva N.M., Raoult D. Serological response of patients suffering from primary and recrudescent typhus: comparison of complement fixation reaction, Weil-Felix test, microimmunofluorescence, and immunoblotting. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1994, vol. 1, no. 3, pp. 318–324.
45. Eremeeva M.E., Beati L., Makarova V.A., Fetisova N.F., Tarasevich I.V., Balayeva N.M., Raoult D. Astrakhan fever rickettsiae: antigenic and genotypic analysis of isolates obtained from human and *Rhipicephalus pumilio* ticks. *Am. J. Trop. Meg. Hyg.*, 1994, vol. 51, no. 5, pp. 697–706.
46. Eremeeva M.E., Bosserman E.A., Demma L.J., Zambrano M.L., Blau D.M., Dasch G.A. Isolation and identification of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks collected in Arizona. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 8, pp. 5569–5577.
47. Eremeeva M.E., Dasch G.A., Silverman D.J. Evaluation of a PCR assay for quantitation of *Rickettsia rickettsii* and closely related spotted fever group rickettsiae. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, vol. 41, no. 12, pp. 5466–5472.
48. Eremeeva M.E., Dasch G.A. Closing the gaps between genotype and phenotype in *Rickettsia rickettsii*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2009, vol. 1166, pp. 12–26.
49. Eremeeva M.E., Oliveira A., Moriarity J., Robinson J.B., Tokarevich N.K., Antyukova L.P., Pyanyh V.A., Emeljanova O.N., Ignatjeva V.N., Buzinov R., Pyankova V., Dasch G.A. Detection and identification of bacterial agents in *Ixodes persulcatus* Schulze ticks from the north western region of Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2007, vol. 7, no. 3, pp. 426–436.
50. Eremeeva M.E. Molecular epidemiology of rickettsial diseases in North America. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2012, vol. 3, no. 5–6, pp. 332–337.
51. Fenollar F., Raoult D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *APMIS*, 2004, vol. 112, no. 11–12, pp. 785–807.
52. Ferrari F.A., Goddard J., Moraru G.M., Smith W.E., Varela-Stokes A.S. Isolation of “*Candidatus Rickettsia andeanae*” (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in embryonic cells of naturally infected *Amblyomma maculatum* (Ixodida: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, 2013, vol. 50, no. 5, pp. 1118–1125.
53. Fournier P.E., Allombert C., Supputamongkol Y., Caruso G., Brouqui P., Raoult D. Aneruptive fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 2, pp. 816–818.
54. Fournier P.E., Dumler J.S., Greub G., Zhang J., Wu Y., Raoult D. Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, vol. 41, no. 12, pp. 5456–5465.
55. Fournier P.E., Gouriet F., Brouqui P., Lucht F., Raoult D. Lymphangitis-associated rickettsiosis, a new rickettsiosis caused by *Rickettsia sibirica mongolotimonae*: seven new cases and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.*, 2005, vol. 40, no. 10, pp. 1435–1444.
56. Fournier P.E., Jensenius M., Laferl H., Vene S., Raoult D. Kinetics of antibody responses in *Rickettsia africae* and *Rickettsia conorii* infections. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2002, vol. 9, no. 2, pp. 324–328.
57. Fournier P.E., Raoult D. Identification of rickettsial isolates at the species level using multi-spacer typing. *BMC Microbiol.*, 2007, vol. 7, pp. 72.
58. Fournier P.E., Raoult D. Suicide PCR on skin biopsy specimens for diagnosis of rickettsioses. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 8, pp. 3428–3434.
59. Giulieri S., Jaton K., Cometta A., Trelu L.T., Greub G. Development of a duplex real-time PCR for the detection of *Rickettsia* spp. and typhus group rickettsia in clinical samples. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2012, vol. 64, no. 1, pp. 92–97.
60. Halle S., Dasch G.A. Use of a sensitive microplate enzyme-linked immunosorbent assay in a retrospective serological analysis of a laboratory population at risk to infection with typhus group rickettsiae. *J. Clin. Microbiol.*, 1980, vol. 12, no. 3, pp. 343–350.
61. Hechemy K.E., Raoult D., Fox J., Han Y., Elliott L.B., Rawlings J. Cross-reaction of immune sera from patients with rickettsial diseases. *J. Med. Microbiol.*, 1989, vol. 29, no. 3, pp. 199–202.
62. Hedman J., Radstrom P. Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR. *Meth. Mol. Biol.*, 2013, vol. 943, pp. 17–48.
63. Ibarra V., Oteo J.A., Portillo A., Santibanez S., Blanco J.R., Metola L., Eiros J.M., Perez-Martinez L., Sanz M. *Rickettsia slovaca* infection: DEBONEL/TIBOLA. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2006, vol. 1078, pp. 206–214.
64. Ismail N., Bloch K.C., McBride J.W. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clin. Lab. Med.*, 2010, vol. 30, no. 1, pp. 261–292.
65. Jensenius M., Fournier P.E., Hellum K.B., Wesslen L., Caruso G., Prio T., Lohne K., Vene S., Raoult D., Myrvang B. Sequential changes in hematologic and biochemical parameters in African tick bite fever. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2003, vol. 9, no. 7, pp. 678–683.
66. Jensenius M., Ueland T., Fournier P.E., Brosstad F., Stylianou E., Vene S., Myrvang B., Raoult D., Aukrust P. Systemic inflammatory responses in African tick-bite fever. *J. Infect. Dis.*, 2003, vol. 187, no. 8, pp. 1332–1336.

67. Jia N., Zheng Y.C., Jiang J.F., Ma L., Cao W.C. Human infection with *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*. *N. Engl. J. Med.*, 2013, vol. 369, no. 12, pp. 1178–1180.
68. Jiang J., Chan T.C., Temenak J.J., Dasch G.A., Ching W.M., Richards A.L. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay specific for *Orientia tsutsugamushi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2004, vol. 70, no. 4, pp. 351–356.
69. Jiang J., You B.J., Liu E., Apte A., Yarina T.R., Myers T.E., Lee J.S., Francesconi S.C., O'Guinn M.L., Tsertsvadze N., Vepkhvadze M., Donduashvili M., Onashvili T., Ismayilov A., Agayev N., Aliyev M., Muttalibov N., Richards A.L. Development of three quantitative real-time PCR assays for the detection of *Rickettsia raoultii*, *Rickettsia slovaca*, and *Rickettsia aeschlimannii* and their validation with ticks from the country of Georgia and the Republic of Azerbaijan. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2012, vol. 3, no. 5–6, pp. 327–331.
70. Johnston S.H., Glaser C.A., Padgett K., Wadford D.A., Espinosa A., Espinosa N., Ereemeeva M.E., Tait K., Hobson B., Shtivelman S., Hsieh C., Messenger S.L. *Rickettsia* spp. 364D causing a cluster of eschar-associated illness, California. *Ped. Infect. Dis. J.*, 2013, vol. 32, no. 9, pp. 1036–1039.
71. Jones D., Anderson B., Olson J., Greene C. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of human immunoglobulin G to lipopolysaccharide of spotted fever group rickettsiae. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, vol. 31, no. 1, pp. 138–141.
72. Kaplowitz L.G., Lange J.V., Fischer J.J., Walker D.H. Correlation of rickettsial titers, circulating endotoxin, and clinical features in Rocky Mountain spotted fever. *Arch. Int. Med.*, 1983, vol. 143, no. 6, pp. 1149–1151.
73. Kato C.Y., Chung I.H., Robinson L.K., Austin A.L., Dasch G.A., Massung R.F. Assessment of real-time PCR assay for detection of *Rickettsia* spp. and *Rickettsia rickettsii* in banked clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, vol. 51, no. 1, pp. 314–317.
74. Kato C.Y., Robinson L.K., White F.H., Ereemeeva M.E., Dasch G.A. Inexpensive and high throughput whole genome amplification for improved characterization of *Rickettsia* DNAs (Abstract #112). *The 23rd Meeting of the American Society for Rickettsiology; Crowne Plaza Resort, Hilton Head, South Carolina, August 15–18, 2009*.
75. Kikuchi Y., Fukatsu T. *Rickettsia* infection in natural leech populations. *Microb. Ecol.*, 2005, vol. 49, no. 2, pp. 265–271.
76. Kovacova E., Kazar J. *Rickettsial* diseases and their serological diagnosis. *Clin. Lab.*, 2000, vol. 46 (5–6), pp. 239–245.
77. Kuchler S.M., Kehl S., Dettner K. Characterization and localization of *Rickettsia* sp. in water beetles of genus *Deronectes* (Coleoptera: Dytiscidae). *FEMS Microb. Ecol.*, 2009, vol. 68, no. 2, pp. 201–211.
78. La Scola B., Meconi S., Fenollar F., Rolain J.M., Roux V., Raoult D. Emended description of *Rickettsia felis* (Bouyer et al. 2001), a temperature-dependent cultured bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2002, vol. 52, pt 6, pp. 2035–2041.
79. La Scola B., Raoult D. Diagnosis of Mediterranean spotted fever by cultivation of *Rickettsia conorii* from blood and skin samples using the centrifugation-shell vial technique and by detection of *R. conorii* in circulating endothelial cells: a 6-year follow-up. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, vol. 34, no. 11, pp. 2722–2727.
80. La Scola B., Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, vol. 35, no. 11, pp. 2715–2727.
81. La Scola B., Rydkina L., Ndiokubwayo J.B., Vene S., Raoult D. Serological differentiation of murine typhus and epidemic typhus using cross-adsorption and Western blotting. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2000, vol. 7, no. 4, pp. 612–616.
82. Labruna M.B., Whitworth T., Horta M.C., Bouyer D.H., McBride J.W., Pinter A., Popov V., Gennari S.M., Walker D.H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 1, pp. 90–98.
83. Lehmann U., Kreipe H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods*, 2001, vol. 25, no. 4, pp. 409–418.
84. Leitner M., Yitzhaki S., Rzotkiewicz S., Keysary A. Polymerase chain reaction-based diagnosis of Mediterranean spotted fever in serum and tissue samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2002, vol. 67, no. 2, pp. 166–169.
85. Levin M.L., Killmaster L., Zemtsova G., Grant D., Mumcuoglu K.Y., Ereemeeva M.E., Dasch G.A. Incongruent effects of two isolates of *Rickettsia conorii* on the survival of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Exp. Appl. Acarol.*, 2009, vol. 49, no. 4, pp. 347–359.
86. Liang C.W., Zhao J.B., Li J., Chang L.T., Yu H.L., Zhang L.X., Zhang L.J., Yu X.J. Spotted fever group *Rickettsia* in Yunnan Province, China. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2012, vol. 12, no. 4, pp. 281–286.
87. Loftis A.D., Reeves W.K., Szumlas D.E., Abbassy M.M., Helmy I.M., Moriarity J.R., Dasch G.A. Surveillance of Egyptian fleas for agents of public health significance: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, and *Yersinia pestis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2006, vol. 75, no. 1, pp. 41–48.
88. Mansueto P., Vitale G., Cascio A., Seidita A., Pepe I., Carroccio A., Di Rosa S., Rini G.B., Cillari E., Walker D.H. New insight into immunity and immunopathology of *Rickettsial* diseases. *Clin. Develop. Immunol.*, 2012, vol. 2012, ID 967852.
89. Massung R.F., Davis L.E., Slater K., McKechnie D.B., Puerzer M. Epidemic typhus meningitis in the southwestern United States. *Clin. Infect. Dis.*, 2001, vol. 32, no. 6, pp. 979–982.
90. Matsumoto K., Ogawa M., Brouqui P., Raoult D., Parola P. Transmission of *Rickettsia massiliae* in the tick, *Rhipicephalus turanicus*. *Med. Vet. Entomol.*, 2005, vol. 19, no. 3, pp. 263–270.
91. Mattila J.T., Burkhardt N.Y., Hutcheson H.J., Munderloh U.G., Kurtti T.J. Isolation of cell lines and a rickettsial endosymbiont from the soft tick *Carios capensis* (Acari: Argasidae: Ornithodorinae). *J. Med. Entomol.*, 2007, vol. 44, no. 6, pp. 1091–1101.
92. Mediannikov O., Diatta G., Fenollar F., Sokhna C., Trape J.F., Raoult D. Tick-borne rickettsioses, neglected emerging diseases in rural Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2010, vol. 4, no. 9, p. e821.
93. Mediannikov O., Makarova V., Tarasevich I., Sidelnikov Y., Raoult D. Isolation of *Rickettsia heilongjiangensis* strains from humans and ticks and its multispacer typing. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2009, vol. 15, suppl. 2, pp. 288–289.
94. Mediannikov O.Y., Sidelnikov Y., Ivanov L., Mokretsova E., Fournier P.E., Tarasevich I., Raoult D. Acute tick-borne rickettsiosis caused by *Rickettsia heilongjiangensis* in Russian Far East. *Emerg. Infect. Dis.*, 2004, vol. 10, no. 5, pp. 810–817.
95. Mendes do Nascimento E.M., Colombo S., Nagasse-Sugahara T.K., Angerami R.N., Resende M.R., da Silva L.J., Katz G., Dos Santos F.C. Evaluation of PCR-based assay in human serum samples for diagnosis of fatal cases of spotted fever group rickettsiosis. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2009, vol. 15, suppl. 2, pp. 232–234.

96. Mouffok N., Socolovschi C., Benabdellah A., Renvoise A., Parola P., Raoult D. Diagnosis of rickettsioses from eschar swab samples, Algeria. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, vol. 17, no. 10, pp. 1968–1969.
97. Nakao R., Stromdahl E.Y., Magona J.W., Faburay B., Namangala B., Malele I., Inoue N., Geysen D., Kajino K., Jongejan F., Sugimoto C. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection of Ehrlichia ruminantium. *BMC Microbiol.*, 2010, vol. 10, pp. 296.
98. Newhouse V.F., Shepard C.C., Redus M.D., Tzianabos T., McDade J.E. A comparison of the complement fixation, indirect fluorescent antibody, and microagglutination tests for the serological diagnosis of rickettsial diseases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1979, vol. 28, no. 2, pp. 387–395.
99. Nicholson W.L., Allen K.E., McQuiston J.H., Breitschwerdt E.B., Little S.E. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends Parasitol.*, 2010, vol. 26, no. 4, pp. 205–212.
100. Niebylski M.L., Peacock M.G., Schwan T.G. Lethal effect of Rickettsia rickettsii on its tick vector (Dermacentor andersoni). *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, vol. 65, no. 2, pp. 773–778.
101. Nielsen H., Fournier P.E., Pedersen I.S., Krarup H., Ejlersen T., Raoult D. Serological and molecular evidence of Rickettsia helvetica in Denmark. *Scand J. Infect. Dis.*, 2004, vol. 36, no. 8, pp. 559–563.
102. Nilsson K., Lindquist O., Pahlson C. Association of Rickettsia helvetica with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet*, 1999, vol. 354, no. 9185, pp. 1169–1173.
103. Nilsson K., Wallmenius K., Hartwig S., Norlander T., Pahlson C. Bell's palsy and sudden deafness associated with Rickettsia spp. infection in Sweden. A retrospective and prospective serological survey including PCR findings. *Eur. J. Neurol.*, 2013, vol. 21, no. 2, pp. 206–214.
104. Norazah A., Mazlah A., Cheong Y.M., Kamel A.G. Laboratory acquired murine typhus — a case report. *Med. J. Malaysia*, 1995, vol. 50, no. 2, pp. 177–179.
105. O'Reilly M., Paddock C., Elchos B., Goddard J., Childs J., Currie M. Physician knowledge of the diagnosis and management of Rocky Mountain spotted fever: Mississippi, 2002. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2003, vol. 990, pp. 295–301.
106. Omsland A., Beare P.A., Hill J., Cockrell D.C., Howe D., Hansen B., Samuel J.E., Heinzen R.A. Isolation from animal tissue and genetic transformation of Coxiella burnetii are facilitated by an improved axenic growth medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, vol. 77, no. 11, pp. 3720–3725.
107. Oster C.N., Burke D.S., Kenyon R.H., Ascher M.S., Harber P., Pedersen C.E., Jr. Laboratory-acquired Rocky Mountain spotted fever. The hazard of aerosol transmission. *N. Engl. J. Med.*, 1977, vol. 297, no. 16, pp. 859–863.
108. Paddock C.D., Finley R.W., Wright C.S., Robinson H.N., Schrodt B.J., Lane C.C., Ekenna O., Blass M.A., Tamminga C.L., Ohl C.A., McLellan S.L., Goddard J., Holman R.C., Openshaw J.J., Sumner J.W., Zaki S.R., Eremeeva M.E. Rickettsia parkeri rickettsiosis and its clinical distinction from Rocky Mountain spotted fever. *Clin. Infect. Dis.*, 2008, vol. 47, no. 9, pp. 1188–1196.
109. Paddock C.D., Fournier P.E., Sumner J.W., Goddard J., Elshenawy Y., Metcalfe M.G., Loftis A.D., Varela-Stokes A. Isolation of Rickettsia parkeri and identification of a novel spotted fever group Rickettsia sp. from Gulf Coast ticks (Amblyomma maculatum) in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, vol. 76, no. 9, pp. 2689–2696.
110. Paddock C.D., Koss T., Eremeeva M.E., Dasch G.A., Zaki S.R., Sumner J.W. Isolation of Rickettsia akari from eschars of patients with rickettsialpox. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2006, vol. 75, no. 4, pp. 732–738.
111. Pan L., Zhang L., Wang G., Liu Q. Rapid, simple, and sensitive detection of the ompB gene of spotted fever group rickettsiae by loop-mediated isothermal amplification. *BMC Infect. Dis.*, 2012, vol. 12, p. 254.
112. Paris D.H., Shelite T.R., Day N.P., Walker D.H. Unresolved problems related to scrub typhus: a seriously neglected life-threatening disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2013, vol. 89, no. 2, pp. 301–307.
113. Parola P. Rickettsia felis: from a rare disease in the USA to a common cause of fever in sub-Saharan Africa. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2011, vol. 17, no. 7, pp. 996–1000.
114. Parola P., Paddock C.D., Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2005, vol. 18, no. 4, pp. 719–756.
115. Parola P., Paddock C.D., Socolovschi C., Labruna M.B., Mediannikov O., Kernif T., Abdad M.Y., Stenos J., Bitam I., Fournier P.E., Raoult D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, vol. 26, no. 4, pp. 657–702.
116. Parola P., Roveery C., Rolain J.M., Brouqui P., Davoust B., Raoult D. Rickettsia slovaca and R. raoultii in tick-borne Rickettsioses. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009, vol. 15, no. 7, pp. 1105–1108.
117. Philip R.N., Casper E.A., MacCormack J.N., Sexton D., Thomas L.A., Anacker R.L., Burgdorfer W., Vick S. A comparison of serologic methods for diagnosis of Rocky Mountain spotted fever. *Am. J. Epidemiol.*, 1977, vol. 105, no. 1, pp. 56–67.
118. Philip R.N., Casper E.A., Ormsbee R.A., Peacock M.G., Burgdorfer W. Microimmunofluorescence test for the serological study of rocky mountain spotted fever and typhus. *J. Clin. Microbiol.*, 1976, vol. 3, no. 1, pp. 51–61.
119. Popov V.L., Korenberg E.I., Nefedova V.V., Han V.C., Wen J.W., Kovalevskii Y.V., Gorelova N.B., Walker D.H. Ultrastructural evidence of the ehrlichial developmental cycle in naturally infected Ixodes persulcatus ticks in the course of coinfection with Rickettsia, Borrelia, and a flavivirus. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2007, vol. 7, no. 4, pp. 699–716.
120. Pretorius A.M., Birtles R.J. Rickettsia aeschlimannii: a new pathogenic spotted fever group rickettsia, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.*, 2002, vol. 8, no. 8, p. 874.
121. Qi Y., Xiong X., Wang X., Duan C., Jia Y., Jiao J., Gong W., Wen B. Proteome analysis and serological characterization of surface-exposed proteins of Rickettsia heilongjiangensis. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 7, p. e70440.
122. Raoult D., Dasch G.A. Immunoblot cross-reactions among Rickettsia, Proteus spp. and Legionella spp. in patients with Mediterranean spotted fever. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1995, vol. 11, no. 1, pp. 13–18.
123. Raoult D., Fournier P.E., Abboud P., Caron F. First documented human Rickettsia aeschlimannii infection. *Emerg. Infect. Dis.*, 2002, vol. 8, no. 7, pp. 748–749.
124. Raoult D., Lakos A., Fenollar F., Beytout J., Brouqui P., Fournier P.E. Spotless rickettsiosis caused by Rickettsia slovaca and associated with Dermacentor ticks. *Clin. Infect. Dis.*, 2002, vol. 34, no. 10, pp. 1331–1336.

125. Regnery R.L., Spruill C.L., Plikaytis B.D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J. Bacteriol.*, 1991, vol. 173, no. 5, pp. 1576–1589.
126. Rehacek J., Tarasevich I. Acari-borne Rickettsiae & Rickettsioses in Eurasia. *Bratislava: Veda, Publishing House of the Slovak Academy of Sciences*, 1988.
127. Reif K.E., Macaluso K.R. Ecology of *Rickettsia felis*: a review. *J. Med. Entomol.*, 2009, vol. 46, no. 4, pp. 723–736.
128. Renvoise A., Delaunay P., Blanchouin E., Cannavo I., Cua E., Socolovschi C., Parola P., Raoult D. Urban family cluster of spotted fever rickettsiosis linked to *Rhipicephalus sanguineus* infected with *Rickettsia conorii* subsp. *caspiensis* and *Rickettsia massiliae*. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2012, vol. 3, pp. 389–392.
129. Renvoise A., Rolain J.-M., Socolovschi C., Raoult D. Widespread use of real-time PCR for rickettsial diagnosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2012, vol. 64, pp. 126–129.
130. Richards A.L. Worldwide detection and identification of new and old rickettsiae and rickettsial diseases. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2012, vol. 64, no. 1, pp. 107–110.
131. Roux V., Fournier P.E., Raoult D. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, vol. 34, no. 9, pp. 2058–2065.
132. Roux V., Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2000, vol. 50, pt 4, pp. 1449–1455.
133. Roux V., Rydkina E., Ereemeeva M., Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, vol. 47, no. 2, pp. 252–261.
134. Rozental T., Ereemeeva M.E., Paddock C.D., Zaki S.R., Dasch G.A., Lemos E.R. Fatal case of Brazilian spotted fever confirmed by immunohistochemical staining and sequencing methods on fixed tissues. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2006, vol. 1078, pp. 257–259.
135. Samoylenko I., Shpynov S., Raoult D., Rudakov N., Fournier P.E. Evaluation of Dermacentor species naturally infected with *Rickettsia raoultii*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2009, vol. 15, suppl. 2, pp. 305–306.
136. Samoylenko I.E., Kumpan L.V., Shpynov S.N., Obert A.S., Butakov O.V., Rudakov N.V. Methods of isolation and cultivation of new *Rickettsiae* from the Nosoarea of the North Asian tick typhus in Siberia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2006, vol. 1078, pp. 613–616.
137. Sekeyova Z., Roux V., Raoult D. Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of ‘gene D’, which encodes an intracytoplasmic protein. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2001, vol. 51, pt 4, pp. 1353–1360.
138. Sexton D.J., Kanj S.S., Wilson K., Corey G.R., Hegarty B.C., Levy M.G., Breitschwerdt E.B. The use of a polymerase chain reaction as a diagnostic test for Rocky Mountain spotted fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1994, vol. 50, no. 1, pp. 59–63.
139. Shapiro M.R., Fritz C.L., Tait K., Paddock C.D., Nicholson W.L., Abramowicz K.F., Karpathy S.E., Dasch G.A., Sumner J.W., Adem P.V., Scott J.J., Padgett K.A., Zaki S.R., Ereemeeva M.E. *Rickettsia* 364D: a newly recognized cause of eschar-associated illness in California. *Clin. Infect. Dis.*, 2010, vol. 50, no. 4, pp. 541–548.
140. Shpynov S., Fournier P.E., Rudakov N., Arsen'eva I., Granitov M., Tarasevich I., Raoult D. Tick-borne rickettsiosis in the Altay region of Russia. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2009, vol. 15, suppl. 2, pp. 313–314.
141. Shpynov S., Fournier P.E., Rudakov N., Raoult D. “*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*” in *Ixodes persulcatus* ticks collected in Russia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2003, vol. 990, pp. 162–172.
142. Shpynov S., Fournier P.E., Rudakov N., Tankibaev M., Tarasevich I., Raoult D. Detection of a rickettsia closely related to *Rickettsia aeschlimannii*, “*Rickettsia heilongjiangensis*,” *Rickettsia* sp. strain RpA4, and *Ehrlichia muris* in ticks collected in Russia and Kazakhstan. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 5, pp. 2221–2223.
143. Shpynov S., Fournier P.E., Rudakov N., Tarasevich I., Raoult D. Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2006, vol. 1078, pp. 378–383.
144. Shpynov S., Parola P., Rudakov N., Samoilenko I., Tankibaev M., Tarasevich I., Raoult D. Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in *Dermacentor* ticks from Russia and central Kazakhstan. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2001, vol. 20, no. 12, pp. 903–905.
145. Shpynov S., Rudakov N., Tohkov Y., Matushchenko A., Tarasevich I., Raoult D., Fournier P.E. Detection of *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma marginatum* ticks in western Russia. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2009, vol. 15, suppl. 2, pp. 315–316.
146. Socolovschi C., Mediannikov O., Raoult D., Parola P. The relationship between spotted fever group *Rickettsiae* and ixodid ticks. *Vet. Res.*, 2009, vol. 40, no. 4, p. 34.
147. Sokhna C., Mediannikov O., Fenollar F., Bassene H., Diatta G., Tall A., Trape J.F., Drancourt M., Raoult D. Point-of-care laboratory of pathogen diagnosis in rural Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2013, vol. 7, no. 1, p. e1999.
148. Tarasevich I.V., Makarova V.A., Fetisova N.F., Stepanov A.V., Miskarova E.D., Balayeva N., Raoult D. Astrakhan fever, a spotted fever rickettsiosis. *Lancet*, 1991, vol. 337, no. 8734, pp. 172–173.
149. Tarasevich I.V., Makarova V.A., Fetisova N.F., Stepanov A.V., Miskarova E.D., Raoult D. Studies of a “new” rickettsiosis “Astrakhan” spotted fever. *Eur. J. Epidemiol.*, 1991, vol. 7, no. 3, pp. 294–298.
150. Traub R., Wisseman C.L., Farhang-Azad A. The ecology of murine typhus — a critical review. *Trop. Dis. Bull.*, 1978, vol. 75, pp. 237–317.
151. Tzianabos T., Anderson B.E., McDade J.E. Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. *J. Clin. Microbiol.*, 1989, vol. 27, no. 12, pp. 2866–2868.
152. Van Schaik E.J., Samuel J.E. Phylogenetic diversity, virulence and comparative genomics. *Adv. Experiment. Med. Biol.*, 2012, vol. 984, pp. 13–38.
153. Walker D.H., Cain B.G. A method for specific diagnosis of Rocky Mountain spotted fever on fixed, paraffin-embedded tissue by immunofluorescence. *J. Infect. Dis.*, 1978, vol. 137, no. 2, pp. 206–209.
154. Walker D.H., Ismail N. Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. *Nature Rev. Microbiol.*, 2008, vol. 6, no. 5, pp. 375–386.
155. Walker D.H., Paddock C.D., Dumler J.S. Emerging and re-emerging tick-transmitted rickettsial and ehrlichial infections. *Med. Clin. North Am.*, 2008, vol. 92, no. 6, pp. 1345–1361.

156. Wang J.M., Hudson B.J., Watts M.R., Karagiannis T., Fisher N.J., Anderson C., Roffey P. Diagnosis of Queensland tick typhus and African tick bite fever by PCR of lesion swabs. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009, vol. 15, no. 6, pp. 963–965.
157. Weisburg W.G., Dobson M.E., Samuel J.E., Dasch G.A., Mallavia L.P., Baca O., Mandelcol L., Sechrest J.E., Weiss E., Woese C.R. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *J. Bacteriol.*, 1989, vol. 171, no. 8, pp. 4202–4206.
158. Werren J.H., Hurst G.D., Zhang W., Breeuwer J.A., Stouthamer R., Majerus M.E. Rickettsial relative associated with male killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*). *J. Bacteriol.*, 1994, vol. 176, no. 2, pp. 388–394.
159. Wilson K.H., Blichington R.B., Greene R.C. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, vol. 28, no. 9, pp. 1942–1946.
160. Woo J.H., Cho J.Y., Kim Y.S., Choi D.H., Lee N.M., Choe K.W., Chang W.H. A case of laboratory-acquired murine typhus. *Korean J. Intern. Med.*, 1990, vol. 5, no. 2, pp. 118–122.
161. Xu W., Raoult D. Taxonomic relationships among spotted fever group rickettsiae as revealed by antigenic analysis with monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, vol. 36, no. 4, pp. 887–896.
162. Yokota M., Tatsumi N., Nathalang O., Yamada T., Tsuda I. Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. *J. Clin. Lab. Anal.*, 1999, vol. 13, no. 3, pp. 133–140.
163. Yu X., Jin Y., Fan M., Xu G., Liu Q., Raoult D. Genotypic and antigenic identification of two new strains of spotted fever group rickettsiae isolated from China. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, vol. 31, no. 1, pp. 83–88.
164. Zemsova G., Killmaster L.F., Mumcuoglu K.Y., Levin M.L. Co-feeding as a route for transmission of *Rickettsia conorii* israelensis between *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Exp. Appl. Acarol.*, 2010, vol. 52, no. 4, pp. 383–392.
165. Zhu Y., Fournier P.E., Eremeeva M., Raoult D. Proposal to create subspecies of *Rickettsia conorii* based on multi-locus sequence typing and an emended description of *Rickettsia conorii*. *BMC Microbiol.*, 2005, vol. 5, pp. 11.

Received 07.03.2014

Revision received 07.03.2014

Accepted 07.05.2014