Алгоритмы выявления риккетсий и лабораторной диагностики риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки в России

Н.В. Рудаков[1, 2] (rickettsia@mail.ru), И.Е. Самойленко[1], Л.В. Кумпан[1, 2]

[1] ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора
[2] ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава России

Резюме

Представлен анализ современных тенденций выявления риккетсий и лабораторной диагностики риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки. В связи с резким сокращением номенклатуры выпускаемых препаратов и увеличением спектра выявленных на территории России видов риккетсий необходимы новые подходы к лабораторной верификации диагнозов. Для выявления антител к риккетсиям группы КПЛ могут быть рекомендованы РНИФ и ИФА с антигенами риккетсий соответствующих видов. Для выявления и идентификации риккетсий группы КПЛ наиболее приемлемы ПЦР-рестрикционный анализ и ПЦР-секвенирование, для изучения патогенных видов риккетсий оптимальны биологические методы исследования.

Ключевые слова: *риккетсии и риккетсиозы, группа клещевой пятнистой лихорадки, лабораторная диагностика*

Algorithms of Rickettsiae's Detection and Laboratory Diagnosis of Rickettsioses of Spotted Fever Group in Russia

N.V. Rudakov[1, 2] (rickettsia@mail.ru), I.E. Samoylenko[1], L.V. Kumpan[1, 2]

[1] Federal Budgetary Institution of Science «Omsk Research Institute of Natural Foci Infections» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance

[2] State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Training «Omsk State Medical Academy» of Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Abstract

An analysis of modern trends of Rickettsiae's detection and laboratory diagnostics for spotted fever group rickettsioses is present. Due to the sharp decline in the range of manufactured products and increase the spectrum of rickettsial species identified in Russia, new approaches required to laboratory verification of diagnoses. IFA and ELISA with antigens of relevant species of Rickettsia can be recommended to detect antibodies to the SFG rickettsiae. PCR-restriction analysis and sequencing of PCR products most appropriate for the detection and identification of SFG Rickettsia, biological methods are necessary for studying of pathogenic species of Rickettsia.

Key words: *rickettsiae and rickettsioses, laboratory diagnostics, spotted fever group*

В соответствии с приказом Росстата от 20 декабря 2012 года № 645 с 2013 года в формах № 1 и № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» регистрируются две риккетсиозные группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ): сибирский клещевой тиф (СКТ) и астраханская пятнистая лихорадка (АПЛ). Возбудители СКТ и АПЛ – *Rickettsia sibirica* subsp. *sibirica* и *Rickettsia conorii* subsp. *caspiensis* соответственно. Из трех подвидов *R. sibirica* в России доказано наличие *R. sibirica* subsp. *sibirica* и *R. sibirica* subsp. BJ-90.

Верифицированные случаи клещевых риккетсиозов (КР) в Сибири и на Дальнем Востоке России связаны с *R. sibirica* subsp. *sibirica* [1] и *R. heilonjiangensis* [2, 3]. Получены данные о вероятной патогенности *R. sibirica* subsp. BJ-90 [4 – 6]. Кроме них в иксодовых клещах в различных регионах России выявлены еще четыре вида патогенных для человека риккетсий группы КПЛ: *R. aeschlimannii, R. helvetica, R. slovaca, R. raoultii*. Как показано нами ранее [7], по патогенности риккетсии можно разделить на классические патогены (из них в России выявлены *R. sibirica* subsp. *sibirica, R. conorii* и *R. heilonjiangensis*), новые *патогены* (*R. aeschlimannii, R. helvetica, R. slovaca, R. raoultii, R. sibirica* subsp. BJ-90*) и риккетсии с недостаточно изученной патогенностью (*относящаяся к группе предшественников Candidatus *R. tarasevichiae*).

Вызываемые классическими патогенами риккетсиозы группы КПЛ обладают выраженной схожестью клинических проявлений (первичный аффект на месте присасывания клеща, региональный лимфангоит и лимфаденит, лихорадка, розеолезно-папулезная сыпь). При этом показано выявление на одних и тех же эндемичных по КР территориях нескольких риккетсий, относящихся к классическим патогенам, прежде всего *R. sibirica* subsp. *sibirica* и *R. heilonjiangensis* [8]. Новые патогены вызывают стертую клиническую картину риккетсиозов группы КПЛ (*R. aeschlimannii*), синдром TIBOLA (от англ. tick borne lymphoadenopathy – «лимфоаденопатия после присасывания клеща»), этиологически связанный преимущественно с *R. slovaca*, в меньшей степени – с *R. raoultii*, или отмечаются как «реакция

на укус клеща» и не учитываются в официальной регистрации [4, 7].

В значительной степени это связано с проблемами их лабораторной диагностики, прежде всего с отсутствием видоспецифической верификации серологическими методами и недостаточной эффективностью выявления риккетсиального агента молекулярно-биологическими методами [9].

Применительно к ситуации повсеместного распространения сочетанных очагов инфекций, передаваемых иксодовыми клещами, нами разработан двухэтапный алгоритм лабораторной диагностики указанных инфекций, включающий экспресс-исследование (ПЦР, ИФА на антиген) переносчиков, снятых с пациента, или крови пострадавшего (если клеща не сохранили), а в случае необходимости (при клинических проявлениях) – серологическое и молекулярно-биологическое исследование биологических материалов от больных [10].

Цель работы – анализ существующей лабораторной диагностики риккетсиозов группы КПЛ в России.

В соответствии с отечественными рекомендациями по диагностике [11, 12] используются преимущественно серологические методы (РА, РСК, РНГА, РНИФ, ИФА), однако к настоящему времени не выпускается ни один коммерческий диагностикум для указанных методов. Наличие группоспецифического полисахаридного комплекса в составе препарата растворимого антигена для серологической реакции комплемента (РСК) приводит к отсутствию четкой видовой дифференциации внутри групп сыпного тифа и КПЛ, хотя титры антител обычно бывают выше к гомологичному антигену. Более четкая видовая дифференциация внутри групп осуществляется с помощью корпускулярных антигенов в реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ).

В соответствии с Европейскими рекомендациями [13] для серологической диагностики рекомендуется РНИФ, которую считают «золотым стандартом» серодиагностики риккетсиозов. Метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью, позволяет выявлять IgM и IgG как вместе, так и раздельно – в зависимости от применяемых конъюгатов. При риккетсиозах группы КПЛ диагностически значимые титры IgM выявляют в конце первой недели, IgG – в конце второй недели заболевания. Для постановки РНИФ используют «слайд-антигены», получаемые на культурах клеток из эталонных штаммов соответствующих видов риккетсий в специализированных риккетсиологических лабораториях (в России – Омский НИИ природно-очаговых инфекций и ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи).

Кроме того, в последние годы для серологической диагностики риккетсиозов группы КПЛ в Омском НИИ природно-очаговых инфекций предложен иммуноферментный анализ (ИФА) на основе цельнорастворимого антигена [14]. Его использование позволяет почти вдвое, в сравнении с РСК, повысить эффективность верификации диагноза СКТ за счет чувствительности. Применение ИФА с конъюгатами к разным изотипам иммуноглобулинов (IgG и IgM) позволяет дифференцировать антитела по классам иммуноглобулинов [15].

Для исследования переносчиков, в том числе снятых с человека, ранее применяли экспресс-методы – метод флюоресцирующих антител (МФА), РНГА с иммуноглобулиновым диагностикумом и ИФА для выявления риккетсий группы КПЛ, однако диагностические препараты для переносчиков не выпускают. Сейчас для этой цели используют метод ПЦР, преимущественно с праймерами к фрагментам генов поверхностного белка *omp*A и цитратсинтазы риккетсий для выявления фрагментов ДНК *Rickettsia* spp. ПЦР не позволяет оценить риск заражения при исследовании снятого переносчика и эпидемиологическую опасность очаговой территории при исследовании иксодовых клещей из природных стаций, поскольку не обладает видоспецифичностью. ПЦР не нашла широкого применения в практике также в связи с методическими проблемами взятия и исследования клинического материала от больных (более низкая эффективность исследования проб крови (из-за малой концентрации ДНК по сравнению с биоптатами с места присасывания клеща).

ДНК риккетсий можно выявлять в ПЦР с последующей идентификацией путем определения нуклеотидных последовательностей ампликона, что возможно лишь в ограниченном числе лабораторий. С позиций выявления патогенных риккетсий и определения эпидемической опасности территорий (отнесения их к зонам высокого, среднего и низкого риска инфицирования) неадекватно применение ПЦР-секвенирования для исследования иксодовых клещей при относительно небольших выборках. Такие методы позволяют выявлять преимущественно массовые виды риккетсий – *R. raoultii* в клещах рода *Dermacentor, R. tarasevichae* в клещах рода *Ixodes,* не имеющих существенного эпидемиологического значения. Это создает ложное представление об отсутствии, в том числе на эндемичных по СКТ территориях, *R. sibirica* – основного вида патогенных риккетсий группы КПЛ в азиатской части России. По нашим наблюдениям, в очаге СКТ в Татарском районе Новосибирской области, например, при использовании биопроб на морских свинках-самцах из клещей рода *Dermacentor* выделен штамм *R. sibirica, а* при ПЦР-секвенировании установлена высокая частота наличия у клещей ДНК *R. raoultii* [16].

Нами разработана методика ПЦР-рестрикционного анализа, которая может быть использована для дифференциации основных видов риккетсий, выявляемых в природных очагах КР. Применение рестрикционного анализа с использованием эндонуклеаз (RsaI и PstI) позволило четко дифференцировать две группы риккетсий: *R. sibirica* и *R. sibirica* subsp. BJ-*90* от геновариантов *R. raoultii* [10].

Для изучения патогенных видов риккетсий наиболее информативны культуральные методы. Выделение возбудителей риккетсиозов от больных гораздо эффективнее в острый лихорадочный период, до начала антибиотикотерапии. Основные риккетсиологические методы включают интраперитонеальное заражение чувствительных животных (морские свинки, хомячки, хлопковые и белые крысы, белые мыши), развивающихся куриных эмбрионов (в желточный мешок по Коксу), перевиваемых культур клеток (Vero, Hep-2, L929), клеток членистоногих [7].

Методы выделения и последующей идентификации риккетсий группы КПЛ требуют специальной подготовки, соблюдения режимных требований (возбудители III группы патогенности). Их культивирование можно осуществлять в специализированных риккетсиологических лабораториях или лабораториях особо опасных инфекций, что ограничивает возможности использования методов выделения риккетсий в диагностических целях.

В некоторых публикациях указывается на использование «видоспецифических праймеров» и «двухраундовой ПЦР» для видовой идентификации риккетсий, что не доказано принятыми в микробиологии методами, то есть на эталонных штаммах известных видов; в ряде случаев говорится лишь о подтверждении результатов секвенированием проб ДНК из клещей [17 – 19]. Бездоказательно «… предполагается, что *R. sibirica* ответственна за 1100 – 1600 ежегодных случаев заболевания риккетсиозами в Сибирском федеральном округе и *R. heilongjiangensis* является возбудителем риккетсиозов на Дальнем Востоке (около 200 – 300 случаев ежегодно) и в основном передается клещами рода *Haemaphysalis* ...» [19], что противоречит уже установленным фактам об одновременном распространении нескольких патогенных риккетсий (прежде всего *R. sibirica и R. heilongjiangensis*) на обширных очаговых территориях Сибири и Дальнего Востока России [1 – 3, 7, 8]. Необходимо добавить, что имеются лишь немногочисленные данные о выявлении ДНК патогенных риккетсий молекулярно-биологическими методами у больных: *R. sibirica и R. heilongjiangensis* в Алтайском крае [1, 3], *R. heilongjiangensis* в Хабаровском крае [2], *R. helvetica* в Пермском крае [20], а все выделенные штаммы риккетсий *от людей* на эндемичных по КР территориям относятся к виду *R. sibirica* [1, 7, 8].

Идентификация риккетсий с помощью так называемых видоспецифических праймеров и других видоспецифических ПЦР [17 – 19] осложняется тем, что известные виды риккетсий группы КПЛ генетически гетерогенны, на территории России выявлены геноварианты и подвиды: *R. sibirica* (*R. sibirica* subsp. *sibirica, R. sibirica* subsp. BJ-90), *R. conorii* (*R. conorii* subsp. *Conorii, R. conorii* subsp. *caspiensis*) и *R. raoultii* (генотипы RpA4, DnS14, DnS28 и др.) [1, 7, 8]. Данные о применении видоспецифических праймеров и других видоспецифических ПЦР для выявления риккетсий, относящихся к различным подвидам и генотипам риккетсий группы КПЛ, отсутствуют. С учетом отсутствия доказательной базы использование видоспецифических праймеров и других видоспецифических ПЦР для лабораторной диагностики риккетсиозов группы КПЛ в России не обосновано. Применительно к *Candidatus R. tarasevichae* данных для полноценного анализа недостаточно, а диагностические подходы требуют отдельного анализа и выходят за рамки нашего сообщения.

По нашим данным, для выявления и изоляции патогенных риккетсий наиболее приемлемо применение биопроб на морских свинках и куриных эмбрионах, для культивирования новых патогенов группы КПЛ – культуры клеток, а для скрининга массовых видов риккетсий (*R. raoultii*, *Candidatus R. tarasevichae*) – ПЦР-секвенирование. Применение для исследования очагов КР ПЦР с видоспецифическими праймерами, по нашему мнению, не обосновано в связи с отсутствием необходимой доказательной базы и высокой генетической гетерогенностью риккетсий в природных очагах.

Таким образом, вышеизложенное служит, на наш взгляд, обоснованием для использования в лабораторном выявлении и идентификации риккетсий группы КПЛ ПЦР-рестрикционный анализ и ПЦР-секвенирование, для выделения патогенных риккетсий – биопробы на морских свинках. Для выявления антител к риккетсиям группы КПЛ в диагностических целях в настоящее время могут быть рекомендованы РНИФ и ИФА с антигенами риккетсий соответствующих видов.

Наличие общих переносчиков различных патогенов, зачастую в единой паразитарной системе, обусловливает широкое распространение сочетанных природных очагов инфекций, передаваемых иксодовыми клещами (в различных сочетаниях), что следует принимать во внимание при мониторинге очагов, эпидемиологическом надзоре, диагностике и профилактике этих инфекций.

Литература

1. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Гранитов В.М., Арсеньева И.В., Тарасевич И.В., Fournier P.-E. и др. Выявление альфа1-протеобактерий в иксодовых клещах и образцах от больных в России. Омский научный вестник. 2006; 3 (37): 32 – 37.
2. Mediannikov O.Yu., Sidel'nikovYu., Ivanov L., Mokretsova E., Fournier P.-E., Tarasevich I. Acute tick-borne rickettsiosis caused by Rickettsia heilongjiangensis in Russian Far East. Emerg. Infect. Dis. 2004; 10 (5): 810 – 817.
3. Гранитов В.М., Арсеньева И.В., Бесхлебова О.В., Дедков В.Г., Карань Л.С., Васильева О.А., Шпынов С.Н. Первый клинический случай клещевого риккетсиоза, вызванного Rickettsia heilongjiangensis, на территории Сибири. Инфекционные болезни. 2014; 12 (3): 91 – 94.
4. Пеньевская Н.А., Рудаков Н.В., Абрамова Н.В., Рудакова С.А., Коломенский А.П. Клинико-эпидемиологический анализ результатов выявления антител к различным видам риккетсий у больных с подозрением на клещевую нейроинфекцию в северных районах Омской области. Национальные

приоритеты России. Специальный выпуск «Актуальные проблемы природной очаговости болезней»: Матер. Всерос. конф. с междунар. участием, посвященной 70-летию теории академика Е.Н. Павловского о природной очаговости болезней. Омск; 2009; 2: 192 – 197.
5. Jia N., Jiang J.F., Huo Q.B., Jiang B.G., Cao W.C. *Rickettsia sibirica* subspecies BJ-90 as a cause of human disease. N. Engl. J. Med. 2014; 369 (12): 1176 – 1178.
6. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Решетникова Т.А., Пеньевская Н.А., Абрамова Н.В., Кумпан Л.В. Новые данные о патогенности *Rickettsia sibirica* subsp. BJ-90. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2014; 5: 10 – 13.
7. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Самойленко И.Е., Ястребов В.К., Оберт А.С., Курепина Н.Ю. Риккетсии и риккетсиозы группы клещевой пятнистой лихорадки в Сибири: Омск: Издательский центр «Омский научный вестник»; 2012.
8. Shpynov S.N., Fournier P.-E., Rudakov N.V., Samoylenko I.E., Reshetnikova T.A., Yastrebov V.K. et al. Molecular identification of a collection of spotted fever group rickettsiae obtained from patients and ticks from Russia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006; 74 (3): 440 – 443.
9. Еремеева М.Е., Шпынов С.Н., Токаревич Н.К. Современные подходы к лабораторной диагностике риккетсиозов. Инфекция и иммунитет. 2014; 4 (2): 113 – 34.
10. Рудакова С.А., Коломеец А.Н., Самойленко И.Е., Кузьминов А.М., Рудаков Н.В. Экспресс-индикация трансмиссивных патогенов как основа дифференцированного подхода к профилактике инфекций, передающихся иксодовыми клещами. Бюллетень СО РАМН. 2007; 4: 116 – 119.
11. Методические рекомендации. Эпидемиологический надзор за клещевым риккетсиозом. Иммунодиагностика заболевания и методы выявления возбудителя, утв. Минздравом СССР 22.10.91.
12. Методические указания МУ 3.1.1755-03 «Организация эпидемиологического надзора за клещевым риккетсиозом». Москва: Федеральный центр госсанэпиднадзора России; 2004.
13. Brouqui P., Bacellar F., Baranton G., Birtles R.J., Bjodorff A., Blanco J.R. et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10: 1108 – 1132.
14. Абрамова Н.В., Рудаков Н.В., Пеньевская Н.А., Седых Н.Н., Кумпан Л.В., Самойленко И.Е. и др. Апробация иммуноферментного анализа для серологической диагностики инфекций, вызываемых риккетсиями группы клещевой пятнистой лихорадки. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2010; 1 (50): 17 – 22.
15. Рудаков Н.В., Абрамова Н.В., Пеньевская Н.А., Самойленко И.Е., Шпынов С.Н., Решетникова Т.А. Способ лабораторной диагностики клещевого риккетсиоза с использованием иммуноферментного анализа для определения антител к антигену *Rickettsia sibirica.* Патент РФ № 2477860 от 20.03.2013 г.
16. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Тарасов В.А., Parola P., Raoult D. Генотипирование риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки в клещах рода *Dermacentor* на территориях Омской и Новосибирской областей. Актуальные проблемы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения: Материалы 2-й Регион. научно-практ. конф., посвящ. 80-летию ОГМА. Омск; 2001: 290 – 294.
17. Иголкина Я.П., Фоменко Н.В., Ливанова Н.Н., Астанин В.Б., Гостеева Л.А., Черноусова Н.Я., Рар 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; 5 (1): 121 – 125.
18. Пуховская Н.М., Рар В.А., Иванов Л.И., Высочина Н.П., Иголкина Я.П., Фоменко Н.В. и др. Выявление методом ПЦР возбудителей природно-очаговых инфекций, переносимых клещами, на полуострове Камчатка. Мед. паразитол. и паразит. болезни. 2010; 4: 36 – 39.
19. Григорьева Я.Е., Карань Л.С., Рудакова С.А., Федорова М.В., Журенкова О.Б., Скрынник С.М. и др. Разработка набора реагентов для дифференциальной детекции патогенных риккетсий РРВ-ПЦР. Молекулярная диагностика. 2014; 1: 518, 519.
20. Нефедова В.В., Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В., Горелова И.Б., Воробьева И.Н. Микроорганизмы порядка *Rickettsiales* у таежного клеща (*Ixodes persulcatus* Sch.) в Предуралье. Вестник РАМН. 2008; 7: 47 – 50.

References

1. Shpynov S.N., Rudakov N.V., Granitov V.M., Arsenyeva I.V., Tarasevich I.V., Fournier P.-E. et al. Identification of alpha 1-proteobacteriae in Ixodes ticks and samples from patients in Russia. Omsk Scientific Bulletin. 2006; 3 (37): 32 – 37 (in Russian).
2. Mediannikov O.Yu., Sidelnikov Yu., Ivanov L., Mokretsova E., Fournier P.-E., Tarasevich I. Acute tick-borne rickettsiosis caused by *Rickettsia heilongjiangensis* in Russian Far East. Emerg. Infect. Dis. 2004; 10 (5): 810 – 817.
3. Granitov V.M., Arsenyeva I.V., Beskhlebova O.V., Dedkov V.G., Karan' L.S., Vasilyeva O.A., Shpynov S.N. The first clinical case of tick-borne rickettsiosis caused by Rickettsia heilongjiangensis, in Siberia. Infectious diseases. 2014; 12 (3): 91 – 94 (in Russian).
4. Pen'evskaja N.A., Rudakov N.V., Abramova N.V., Rudakova S.A., Kolomenskij A.P. Clinico-epidemiological analysis of the detection of antibodies to various types of rickettsiae in patients with suspected tick-borne neuroinfection in the northern districts of the Omsk region. Russian national priorities. Special Issue on «Actual problems of the natural foci of diseases»: Mater. All-Rusian conf. with international participation marking the 70th anniversary of theory of natural foci of diseases by academician E.N. Pavlovsky. 2009; 2: 192 – 197 (in Russian).
5. Jia J.F., Huo Q.B., Jiang B.G., Cao W.C. *Rickettsia sibirica* subspecies BJ-90 as a cause of human disease. N. Engl. J. Med. 2014; 369 (12): 1176 – 1178.
6. Rudakov N.V., Shpynov S.N., Resetnikova T.A., Pen'evskaya N.A., Abramova N.V., Kumpan L.V. New data on the pathogenicity of *Rickettsia sibirica* subsp. BJ-90. Epidemiology and infectious diseases. 2014; 5: 10 – 13 (in Russian).
7. Rudakov N.V., Shpynov S.N., Samoylenko I.E., Yastrebov V.K., Obert A.S., Kurepina N.Yu. Rickettsia and spotted fever group rickettsiosis in Siberia. Omsk: Publishing Center Omsk Scientific Bulletin; 2012 (in Russian).
8. Shpynov S.N., Fournier P.-E., Rudakov N.V., Samoylenko I.E., Reshetnikova T.A., Yastrebov V.K. et al. Molecular identification of a collection of spotted fever group rickettsiae obtained from patients and ticks from Russia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006; 74 (3): 440 – 443.
9. Eremeeva M.E., Shpynov S.N., Tokarevich N.K. Modern approaches to laboratory diagnosis of rickettsial diseases. Infection and Immunity. 2014; 4 (2): 113 – 134 (in Russian).
10. Rudakova S.A., Kolomeetz A.N., Samoylenko I.E., Kuz'minov A.M., Rudakov N.V. Express indication of transmissible pathogens as the basis of the differentiated approach to the prevention of infections transmitted by *Ixodes* ticks. Bjulleten' SO RAMN. 2007; 4: 116 – 119 (in Russian).
11. Methodical recommendations. Epidemiological surveillance of tick-borne rickettsiosis, immunodiagnosis of the disease and methods of detection of pathogen. Approved by the Ministry of Health of the USSR 10/22/91 (in Russian).
12. Guidelines 3.1.1755-03. Organization of epidemiological surveillance of tick-borne rickettsiosis. Moscow: Russian Federal Centre for Sanitary Inspection, 2004 (in Russian).
13. Brouqui P., Bacellar F., Baranton G., Birtles R.J., Bjorsdorff A., Blanco J.R. et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10: 1108 – 1132.
14. Abramova N.V., Rudakov N.V., Pen'evskaja N.A., Sedyh N.N., Kumpan L.V., Samoylenko I.E. et al. The testing of immunoassay for serological diagnosis of infections caused by spotted fever group rickettsiae. Epidemiology and vaccinal prevention. 2010; 1(50): 17 – 22 (in Russian).
15. Rudakov N.V., Abramova N.V., Pen'evskaja N.A., Samoylenko I.E., Shpynov S.N., Reshetnikova T.A. The method of laboratory diagnosis of tick-borne rickettsiosis using an enzyme immunoassay for the detection of antibodies to the antigen of *Rickettsia sibirica*. Patent RF № 2477860; 2013 (in Russian).
16. Shpynov S.N., Rudakov N.V., Tarasov V.A., Parola P., Raoult D. Genotyping of spotted fever group's rickettsiae in ticks of the genus *Dermacentor* in Omsk and Novosibirsk regions. Actual problems of sanitary-epidemiological welfare of the population: Materials of 2 Region. conference dedicated to the 80th anniversary of OSMA. Omsk; 2001: 290 – 294 (in Russian).
17. Igolkina J.P., Fomenko N.V., Livanov N.N., Astanin V.B., Gosteeva L.A., Chernousova N.Ya., Rar V.A. Identify the different species of Rickettsia in ticks, in the blood of people and small mammals in the south of Western Siberia and the Urals. Bulletin of Siberian medicine. 2006; 5 (1): 121 – 125 (in Russian).
18. Pukhovskaya N.M., Rar V.A., Ivanov L.I., Visochina N.P., Igolkina Ya.P., Fomenko N.V. et al. Identification of tick-borne pathogens of natural focal infections by PCR on the Kamchatka Peninsula. Med. parazitol. and the parasit. diseases. 2010; 4: 36 – 39 (in Russian).
19. Grigorieva Ya.E., Karan' L.S., Rudakova S.A., Fedorova M.V., Zhurenkova O.B., Skrynnik S.M. et al. Develop of set reagents for differential detection of pathogenic rickettsiae by RTD-PCR. Molecular diagnostics. 2014; 1: 518, 519 (in Russian).
20. Nefedova V.V., Korenberg E.I., Kovalevsky Yu.V., Gorelova I.B., Vorobyova I.N. Microorganisms of order *Rickettsiales* in the taiga tick (*Ixodes persulcatus* Sch.) in the Urals. Bulletin of Russian Academy of Medical Sciences. 2008; 7: 47 – 50 (in Russian).