

Клинические проявления иксодового клещевого боррелиоза, вызванного *Borrelia miyamotoi*, в контексте иммунного ответа на возбудитель

А.Е. ПЛАТОНОВ¹, М.Г. ТОПОРКОВА², Н.М. КОЛЯСНИКОВА^{1,3}, О.А. СТУКОЛОВА¹, А.С. ДОЛГОВА¹, А.В. БРОДОВИКОВА², Н.А. МАХНЕВА², Л.С. КАРАНЬ¹, J. KOETSVELD⁴, Г.А. ШИПУЛИН¹, В.В. МАЛЕЕВ¹

¹Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; ²ООО МО «Новая больница», Екатеринбург, Россия; ³Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия; ⁴Academic Medical Centre, University of Amsterdam, the Netherlands

Резюме

Цель исследования. Изучение клинических проявлений иксодового клещевого боррелиоза, вызванного *Borrelia miyamotoi* (ИКБ-БМ), в контексте взаимодействия иммунной системы с возбудителем.

Материалы и методы. В исследование включили 117 больных ИКБ-БМ, в качестве группы сравнения — 71 больного с эритемной формой ИКБ (лаймская болезнь — ЛБ), находившихся на лечении в «Новой больнице», г. Екатеринбург. На основании историй болезни для каждого пациента в базу данных занесено более 100 клинических, лабораторных и эпидемиологических показателей. У отдельных больных, госпитализированных в 2015—2016 гг., уровень антител (АТ) IgM и IgG к специфическим антигенам *B. miyamotoi* — ферменту GlpQ и четырем варибельным главным поверхностным белкам (VMPs), обозначаемым Vlp15/16, Vlp18, Vsp1, Vlp5, измерен с помощью специально разработанного белкового иммуночипа, а концентрация боррелий в крови — с помощью количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Больных ИКБ-БМ отличало от больных ЛБ в первую очередь ($p < 0,001$) отсутствие мигрирующей эритемы (у 95%), наличие лихорадки (у 93%), жалобы на слабость (96%), головную боль (82%), озноб (41%), тошноту (28%), лимфопения (56%) и тромбоцитопения (46%), превышающие референтные значения уровни аланинаминотрансферазы (54%) и С-реактивного белка (98%), протеинурия (у 61%). На основании комплекса этих показателей более тяжелое течение ИКБ-БМ отмечено приблизительно у 70% пациентов. При поступлении только 13% пациентов имели АТ к GlpQ и 38% — к VMPs; при выписке АТ к GlpQ и VMPs обнаруживались у 88% больных. Статистически значимой связи антительного иммунного ответа с отдельными клинико-лабораторными проявлениями заболевания не выявлено, однако у больных с более тяжелым течением ИКБ-БМ продуцируется меньше IgM АТ к VMPs и GlpQ к моменту выписки.

Заключение. Инфекция ИКБ-БМ — генерализованное заболевание средней тяжести, сопровождающееся выработкой специфических АТ практически у всех больных.

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, *Borrelia miyamotoi*, GlpQ, варибельные главные поверхностные белки, иммуночип, АТ.

Clinical presentation of Ixodes tick-borne borreliosis caused by *Borrelia miyamotoi* in the context of an immune response to the pathogen

А.Е. PLATONOV¹, М.Г. TOPORKOVA², N.M. KOLYASNIKOVA^{1,3}, O.A. STUKOLOVA¹, A.S. DOLGOVA¹, A.V. BRODOVIKOVA², N.A. MAKHNEVA², L.S. KARAN¹, J. KOETSVELD⁴, G.A. SHIPULIN¹, V.V. MALEEV¹

¹Central Research Institute of Epidemiology, Russian Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russia; ²Medical Association “New Hospital”, Yekaterinburg, Russia; ³M.P. Chumakov Federal Research Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; ⁴Academic Medical Centre, University of Amsterdam, the Netherlands

Ixodes tick-borne borreliosis caused by *Borrelia miyamotoi* (ITBB-BM) is a previously unknown infectious disease discovered in Russia.

Aim. The present study continues the investigation of the clinical features of ITBB-BM in the context of an immune system-pathogen interaction.

Subjects and methods. The study enrolled 117 patients with ITBB-BM and a comparison group of 71 patients with Lyme disease (LD) that is ITBB with erythema migrans. All the patients were treated at the New Hospital, Yekaterinburg. More than 100 clinical, epidemiological and laboratory parameters were obtained from each patient's medical history and included in the general database. A subset of patients hospitalized in 2015 and 2016 underwent additional laboratory examinations. Namely, the levels of *B. miyamotoi*-specific IgM and IgG antibodies were measured by the protein microarray containing GlpQ protein and four variable major proteins (VMPs): Vlp15/16, Vlp18, Vsp1, and Vlp5. The blood concentration of *Borrelia* was estimated by quantitative real-time PCR.

Results. In contrast to LD, first of all ($p < 0,001$) the following clinical features were typical for ITBB-BM: the absence of erythema migrans (in 95% of patients), fever (93%), fatigue (96%), headache (82%), chill (41%), nausea (28%), lymphopenia (56%), thrombocytopenia (46%), the abnormal levels of alanine aminotransferase (54%) and C-reactive protein (98%), proteinuria (61%). Given the set of these indicators, the course of ITBB-BM was more severe in approximately 70% of patients. At admission, only 13% and 38% of patients had antibodies to GlpQ and VMPs, respectively; at discharge, antibodies to GlpQ and VMPs were

detected in 88% of patients. There was no statistically significant association of the antibody response with individual clinical manifestations and laboratory parameters of the disease. However, patients with more severe ITBB-BM produced less IgM antibodies to VMPs and GlpQ at the time of discharge.

Conclusion. ITBB-BM is a moderate systemic disease accompanied by the production of specific antibodies in virtually all patients.

Keywords: *Ixodes tick-borne borreliosis, Borrelia miyamotoi, GlpQ, variable major surface proteins, protein microarray, antibodies.*

АлАТ — аланинаминотрансфераза

АТ — антитела

ИКБ — иксодовый клещевой боррелиоз

ИКБ-БМ — ИКБ, вызываемый *Borrelia miyamotoi*

КВЛ — клещевые возвратные лихорадки

ККС — коэффициент корреляции Спирмена

КПТ — комплексный показатель тяжести

КЭ — клещевой энцефалит

ЛБ — лаймская болезнь

МИ — межквартирный интервал

МЭ — мигрирующая эритема

ПЦР — полимеразная цепная реакция

СКФ — скорость клубочковой фильтрации

СОС — стандартизованный оптический сигнал

СРБ — С-реактивный белок

ЧСС — частота сердечных сокращений

GlpQ — glycerophosphodiester phosphodiesterase

VMPs — variable major proteins

Иксодовый клещевой боррелиоз, вызванный *Borrelia miyamotoi* (ИКБ-БМ), — ранее неизвестное инфекционное заболевание, открытое в России [1, 2]. Клинические особенности этого заболевания на примере 46 больных из Свердловской области в 2009 г. и 71 больного из Удмуртской Республики в 2010–2012 гг. рассмотрены ранее [2–4]. По данным этих исследований, ИКБ-БМ в отличие от «классического» иксодового боррелиоза — лаймской болезни (ЛБ), вызываемой *B. burgdorferi sensu lato*, представляет собой генерализованную инфекцию с преобладанием лихорадочного синдрома и возможностью развития умеренно выраженных и преходящих нарушений функций печени, почек, сердца и других органов [3–6]. Течение заболевания рассматривалось лечащими врачами как среднетяжелое или реже легкое. Впервые выявленная инфекция привлекает внимание в силу ряда обстоятельств. Во-первых, возбудитель *B. miyamotoi* обнаруживается повсеместно в иксодовых клещах, распространенных в зонах умеренного климата Евразии и Северной Америки [7, 8]. Во-вторых, вид *B. miyamotoi* генетически принадлежит к группе боррелий — возбудителей клещевых возвратных лихорадок (КВЛ). Эти лихорадки протекают тяжело, в

Африке в отсутствие адекватной терапии летальность при КВЛ может достигать нескольких десятков процентов [9–11]. В-третьих, показано, что у пациентов со сниженным иммунитетом инфекция *B. miyamotoi* может сопровождаться таким угрожающим жизни осложнением, как менингоэнцефалит [12, 13]. Несмотря на то что выявление больных ИКБ-БМ включено в рабочие планы ряда профильных европейских и американских лабораторий, до настоящего времени оно не вполне успешно из-за трудности выявления ИКБ-БМ на фоне многочисленных лихорадочных заболеваний с неспецифическими симптомами и неразвитости средств лабораторной диагностики этой инфекции. Однако, по мнению американских специалистов, распространенность ИКБ-БМ в США как минимум сопоставима с распространенностью других клещевых инфекций, таких как анаплазмоз и бабезиоз [8, 14, 15].

Цель настоящей работы — сбор и анализ нового массива данных по клинической картине ИКБ-БМ в России, подтверждение или опровержение представления об ИКБ-БМ как об инфекции среднетяжелого течения без летальных случаев, уточнение списка наиболее типичных клинических проявлений ИКБ-БМ. Развитие лабораторной базы, в частности разработка в ЦНИИ эпидемиологии методов измерения бактериальной нагрузки в крови при ИКБ-БМ и оценки спектра и интенсивности анти-телного ответа на основные специфические антигены *B. miyamotoi*, позволило рассмотреть клиническую картину этой инфекции в контексте взаимодействия возбудителя с иммунной системой организма человека.

Материалы и методы

Исследованные группы пациентов. Исследование проведено на базе ООО МО «Новая больница» Екатеринбург в эпидемиологический сезон (июнь–июль) 2010, 2011, 2015 и 2016 гг. Критерием включения в исследование служило подозрение на клещевую инфекцию. Применяли как стандартные диагностические методы (определение антител — АТ — IgM и IgG к боррелиям и вирусу клещевого энцефалита — КЭ), так и оригинальные методики

Сведения об авторах:

Топоркова Марина Георгиевна — к.м.н., зав. I неврологическим отделением ООО МО «Новая больница», Екатеринбург

Колясникова Надежда Михайловна — к.м.н., н.с. лаб. эпидемиологии природно-очаговых инфекций ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Стуколова Ольга Алексеевна — н.с. группы генной инженерии и биотехнологии ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Долгова Анна Сергеевна — к.б.н., н.с. группы генной инженерии и биотехнологии ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Бродовикова Анна Владимировна — врач-невролог ООО МО «Новая больница», Екатеринбург

Махнева Наталья Анатольевна — врач ООО МО «Новая больница», Екатеринбург

Карань Людмила Станиславовна — рук. научной группы разработки новых методов диагностики природно-очаговых заболеваний ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Koetsveld Joris — аспирант Академического медицинского центра Амстердамского университета

Штулин Герман Александрович — к.м.н., рук. отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Малеев Виктор Васильевич — д.м.н., проф., акад. РАН, зам. дир. ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Контактная информация:

Платонов Александр Евгеньевич — д.б.н., проф., зав. лаб. эпидемиологии природно-очаговых инфекций ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; 111123 Москва, Новогиреевская ул., 3А; e-mail: platonov@pcr.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7450-0081>

специфических полимеразных цепных реакций (ПЦР), выявляющих ДНК *B. miyamotoi* или *B. burgdorferi s.l.*, описанные в деталях ранее [1, 2]. ИКБ-БМ диагностировали на основании выявления ДНК *B. miyamotoi* в крови больного в отсутствие лабораторных признаков иных инфекций. Всего выявлено 117 случаев ИКБ-БМ; 10 случаев предположительной микст-инфекции *B. miyamotoi* и вируса КЭ в данной работе не рассматриваются. При этом 53 случая ИКБ-БМ в 2015–2016 гг. дополнительно подтверждены путем выявления специфических АТ (см. ниже). Диагноз ЛБ устанавливали на основании типичной мигрирующей эритемы (МЭ) размером более 5 см, что допускается отечественными и международными стандартами диагностики [16, 17]. В группу сравнения (больные с ЛБ, моноинфекцией *B. burgdorferi s.l.*) случайным образом отобран 71 пациент. При этом у 15 из них диагноз ЛБ подтвержден методом ПЦР, а у 52 выявлены АТ к боррелиям с помощью зарегистрированной коммерческой тест-системы («Euroimmun», Германия).

Сравниваемые группы сопоставимы по полу и возрасту. Доля мужчин среди больных ИКБ-БМ (59%) статистически незначимо выше, чем у больных ЛБ (45%; $p=0,072$; критерий Фишера). Средний возраст (медиана) у пациентов с ЛБ (60 лет) выше, чем у больных ИКБ-БМ (57 лет; $p=0,051$; критерий Манна–Уитни). В целом возраст пациентов находился в диапазоне от 15 до 88 лет.

Методы выявления специфических АТ к *B. miyamotoi*. У видов группы *B. burgdorferi s.l.* и *B. miyamotoi* есть несколько общих мембранных белков-антигенов, в результате чего зарегистрированные тест-системы не способны дифференцировать иммунный ответ на эти инфекции. Однако фермент G1pQ не синтезируется *B. burgdorferi s.l.*, но встречается у *B. miyamotoi*. Недавно показано, что *B. miyamotoi* способна экспрессировать также ряд высокоиммуногенных варибельных поверхностных белков (variable major proteins—VMPs), в частности белки V1p15/16, V1p18, Vsp1 и Vp5 [18]. Разработанный в ЦНИИ эпидемиологии

планарный белковый биочип включает белки-антигены как *B. burgdorferi s.l.* (*B. afzelii* — p100, VlsE, p39, p41, p58, BBK32, OspC, p17; *B. garinii* — p100, VlsE, p41, BBK32, OspC, p17), так и *B. miyamotoi* (G1pQ, V1p15/16, V1p18, Vsp1, Vp5), для которых получены генно-инженерные конструкции, кодирующие антигенную область, фрагмент белка или полную последовательность белка. Антигены экспрессированы в *Escherichia coli* и очищены методами аффинной и ионообменной хроматографии. Иммуночипы изготавливали на слайдах с альдегидным покрытием 3D-Aldehyde Glass Slides («PolyAn», Германия) с помощью плоттера для бесконтактной пьезопечати S3 («Scienion AG», Германия). Учет результатов анализа после нанесения на иммуночип сыворотки крови больных и вторичных АТ к иммуноглобулинам человека проводили с помощью многоканального флуоресцентного сканера MarS («Ditabis», Германия), а подсчет, стандартизацию и интерпретацию результатов — с использованием специально разработанного программного обеспечения StarSky. Уровень специфических АТ IgM и IgG характеризовали полуквантитетным способом по величине стандартизованного оптического сигнала (СОС). На основании исследования сывороток здоровых доноров и больных с иными заболеваниями СОС больше 5 условных единиц (усл. ед.) считали превышающей пороговый уровень, который свидетельствует о наличии исследуемых АТ в образце [19].

Количественная ПЦР. Бактериальную нагрузку в крови больных ИКБ-БМ измеряли в копиях в 1 мл с помощью количественных ПЦР в реальном времени, амплифицирующих 16S РНК или ДНК гена *16S* РНК, с использованием калибровочных кривых с раститройкой соответствующих мишеней от 10^7 до 10^3 копий на 1 мл [1, 2].

Статистические методы. Эпидемиологические и клинико-лабораторные данные сохраняли в базе данных, имеющей более 100 полей на каждую запись (пациента). Все статистические расчеты и оценки проведены с помощью лицензионной программы IBM SPSS Statistics 19 [20]. Для оценки значимости различий распределений количественных и качественных переменных в группах использовали стандартные непараметрические методы [21]. Результаты представлены в виде медианы и межквартильных интервалов (в скобках).

Таблица 1. Частота выявления клинических симптомов у обследованных больных ИКБ

Заболевание	ИКБ, вызванный <i>B. miyamotoi</i>	ИКБ, ранняя эритемная форма	<i>p</i>
Число больных	117	71	
Признаки, %			
мигрирующая эритема	5	99	10^{-14}
температура тела > 38 °С	93	23	10^{-14}
слабость	96	80	0,001
головная боль	82	37	10^{-9}
озноб	41	16	0,0004
миалгия, артралгия	34	27	0,3
головокружение	21	0	0,02
обложенный язык	34	5	0,01
тошнота	28	9	0,001
рвота	15	1	0,002
ригидность мышц затылка	3	0	0,3
Суммарное число симптомов заболевания*	4 (3–5)	2 (2–4)	10^{-5}
Суммарное число симптомов заболевания больше 4	37	17	0,005

Примечание. Данные представлены в виде медианы (межквартильный интервал), * — в расчете на одного больного, из 22 регистрируемых симптомов, наличие МЭ не учитывается.

Результаты

Из анамнеза 116 из 117 больных ИКБ-БМ и 68 больных ЛБ из 71 достоверно известно, что заболевание возникло после присасывания иксодового клеща. Удалили клеща в день присасывания (65%) 75 больных ИКБ-БМ и 36 (52%) больных ЛБ ($p=0,007$). Инкубационный период был несколько длиннее для ИКБ-БМ, чем для ЛБ: 14 (11–17) дней у ИКБ-БМ и 12 (8–19 дней) у ЛБ ($p=0,02$). Начало ИКБ-БМ было острым и больные госпитализировались в среднем на следующий день (от 1 до 2 дня) после появления клинических симптомов, больные ЛБ — на 4-й день (от 2 до 13 дней; $p=10^{-14}$). Лечение в стационаре ИКБ-БМ более длительное, чем лечение ЛБ: 13 (11–15) и 10 (10–11) дней соответственно ($p=10^{-14}$). Для ИКБ-БМ типичны клинические проявления лихорадочного синдрома, редко встречающиеся у больных ЛБ (табл. 1); у 37% больных ИКБ-БМ определяются более 4 соответствующих симптомов заболевания. МЭ при ИКБ-БМ практически отсутствует, поэтому ранее это заболевание клинически классифицировалось как ИКБ в безэритемной форме. Наличие в 5% случаев МЭ при ИКБ-БМ, вероятно, свидетельствует о микст-инфекции *B. miyamotoi* и *B. burgdorferi s.l.* Напротив, лишь у одного больного ИКБ в безэритемной форме в крови обнаружена ДНК *B. burgdorferi s.l.*, что стало основанием поставить диагноз ЛБ в генерализованной форме.

Таблица 2. Данные лабораторного обследования больных в разгаре ИКБ

Показатель	ИКБ, вызванный <i>B. miyamotoi</i>	ИКБ, ранняя эритемная форма	<i>p</i>
Число больных	117	71	
Температура тела, °С	39,2 (38,9—39,7)	37,3 (36,6—38,0)	10 ⁻²⁶
Температура тела >38 °С, %	93*	23	10 ⁻¹⁴
ЧСС, уд/мин	84 (74—92)	72 (68—78)	10 ⁻⁸
Тахикардия (ЧСС >90 уд/мин), %	27	6	0,0003
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	4,3 (3,4—5,6)	6,7 (5,1—8,1)	10 ⁻¹²
Лейкоциты <4·10 ⁹ /л, %	44	6	10 ⁻⁸
Нейтрофилы, 10 ⁹ /л	2,7 (1,8—4,5)	4,1 (2,9—5,4)	0,0001
Нейтрофилы <2·10 ⁹ /л, %	28	7	0,0003
Палочкоядерные нейтрофилы, %	4 (2—6)	2 (1—3)	10 ⁻⁷
Палочкоядерные нейтрофилы >5%, %	35	10	0,0001
Лимфоциты, %	23 (13—34)	30 (23—42)	0,0002
Лимфоциты <16%, %	33	7	0,0001
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	0,9 (0,6—1,4)	1,8 (1,6—2,5)	10 ⁻¹⁷
Лимфоциты <1·10 ⁹ /л, %	56	4	10 ⁻¹³
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	153 (127—192)	239 (206—299)	10 ⁻¹⁵
Тромбоциты <150·10 ⁹ /л, %	46	6	10 ⁻⁹
Креатинин крови, мкмоль/л	82 (60—93)	64 (53—74)	0,0003
Креатинин >90 мкмоль/л, %	32	0	0,01
СКФ, СКД-ЕРІ по креатинину, мл/мин/1,73 м ²	83 (74—100)	98 (81—114)	0,04
СКФ (СКД-ЕРІ) <90 мл/мин/1,73 м ² , небольшое снижение по сравнению с референтными значениями, %	62	36	0,04
Уровень АлАт в крови, МЕ/л	44 (24—68)	23 (18—37)	0,00005
АлАт >41 МЕ/л, %	54	23	0,0001
СРБ, мг/л	60 (25—106)	15 (4—34)	0,0003
СРБ >35 мг/л, %	70	14	0,0002
Протеинурия, г/л мочи	0,20 (0—0,48)	0	10 ⁻⁹
Протеинурия >0,12 г/л, %	61	17	10 ⁻⁸
КПТ боррелиоза**	5,5 (4—7)	1 (0—2)	10 ⁻²⁷
КПТ ≥5, %	71	1	10 ⁻¹⁴

Примечание. * — указана доля больных, у которых значение показателя было выше (или ниже) приведенной границы; ** — определение и правила подсчета КПТ приведены в тексте. Прочие общеклинические и биохимические показатели крови и мочи не выходили за пределы физиологической нормы или статистически значимо не различались в обследуемой группе и группе сравнения, и в таблице не приводятся. СКФ — скорость клубочковой фильтрации; АлАт — аланинаминотрансфераза; СРБ — С-реактивный белок; КПТ — комплексный показатель тяжести.

Основные количественные лабораторные показатели, отличающие ИКБ-БМ от ЛБ, приведены в табл. 2. В сравнительном аспекте можно выделить несколько типов симптомов. Во-первых, непосредственные проявления лихорадки и генерализованной воспалительной реакции — высокая температура тела, повышенная ЧСС, высокий уровень СРБ, появление палочкоядерных нейтрофилов в периферической крови, отчасти протеинурия. Во-вторых, лейкопения (за счет лимфопении и отсутствие нейтрофильного плеоцитоза) и собственно лимфопения, гранулоцитопения и тромбоцитопения, что, вероятно, указывает на активацию и «потребление» данных клеток крови при инфекции *B. miyamotoi*. В-третьих, начальные признаки нарушения функций почек — повышение концентрации креатинина и, как более точный показатель, снижение СКФ (СКД-ЕРІ) по креатинину, рассчитываемой с корректировкой на пол и возраст больных. В-четвертых, повышение почти у 50% больных ИКБ-БМ концентрации печеночных ферментов в крови, в первую очередь АлАт. Следует отметить, что нарушения по этим группам показателей, по-видимому, независимы и не

коррелируют друг с другом или с выраженностью клинических проявлений заболевания. За исключением очевидных связей (доля и количество клеток и т.п.) статистически значимые, хотя и слабые корреляции отмечены только для температуры тела и уровня СРБ (коэффициент корреляции Спирмена — ККС=0,32), СРБ и уровня белка в моче (ККС=0,47), количества тромбоцитов и лимфоцитов (ККС=0,24; $p<0,05$).

Поскольку патологические проявления не дублируют, но дополняют друг друга, их совместное воздействие можно отразить на некоторой шкале комплексного показателя тяжести (КПТ) боррелиоза. Для построения шкалы использованы следующие 13 показателей: температура тела, ЧСС, количество лейкоцитов, количество нейтрофилов, доля палочкоядерных нейтрофилов, количество лимфоцитов, количество тромбоцитов, уровень креатинина в крови, СКФ, уровень АлАт, концентрация СРБ, протеинурия (см. табл. 2) и «суммарное число симптомов заболевания» (см. табл. 1). Если значения показателя у конкретного больного выходили за референтные, указанные в табл. 1, 2, в патологическую область, то его вклад в КПТ оценивали в 1. (ис-

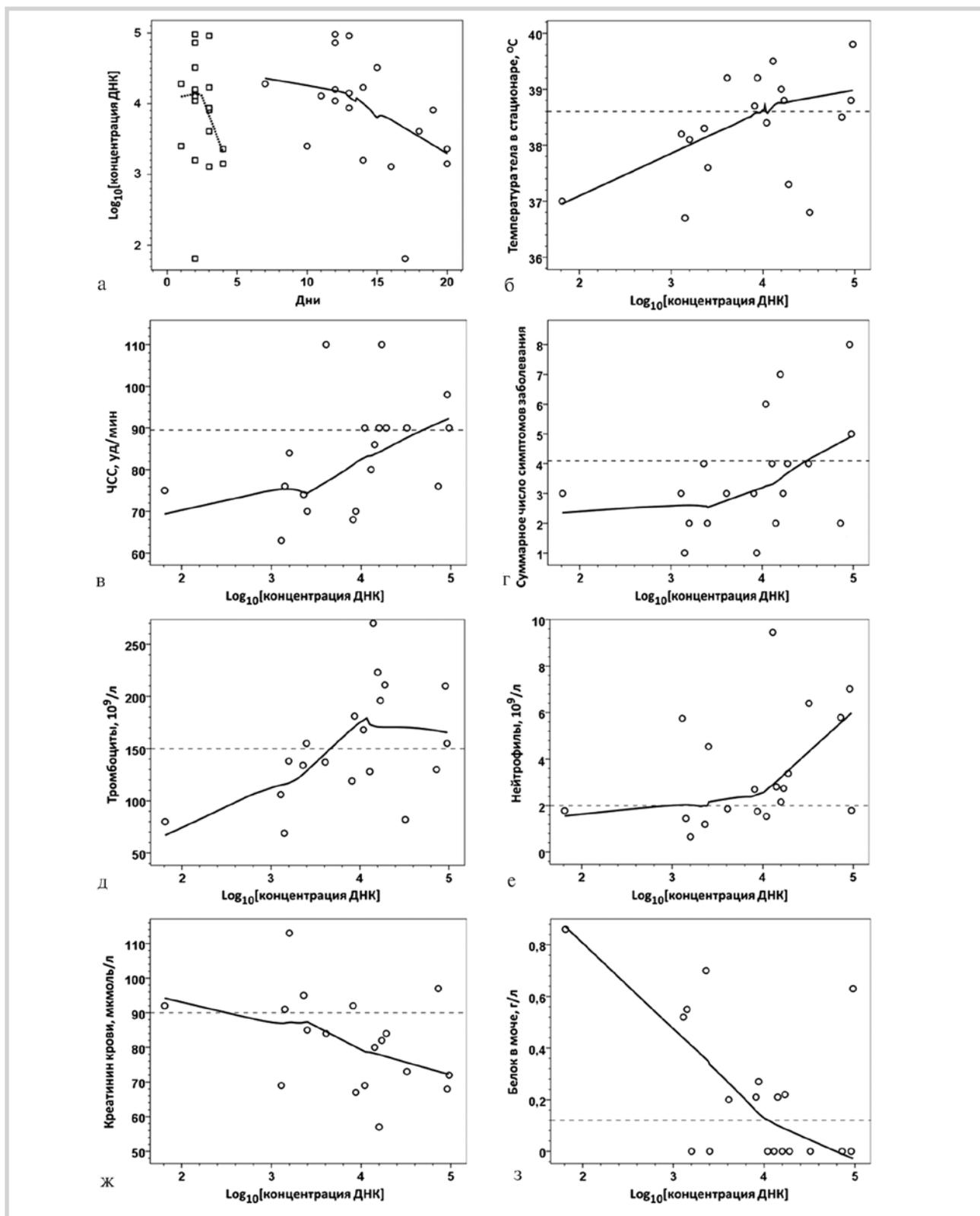


Рис. 1. Связь бактериальной нагрузки в крови с эпидемиологическими и лабораторными показателями при ИКБ-БМ. Концентрация ДНК *B. miyamotoi* в крови в разгаре ИКБ-БМ выражена в копиях генома на 1 мл и представлена на графиках по логарифмической шкале, как Log_{10} [концентрация ДНК]. а — совмещены два графика — зависимость Log_{10} [концентрация ДНК] от инкубационного периода заболевания (кружки) и интервала между появлением симптомов до госпитализации (квадраты); отдельные точки соответствуют значениям, зарегистрированным для каждого из 19 изученных больных; сплошные линии представляют собой аппроксимацию зависимости между переменными по осям X и Y, выполненную методом наименьших квадратов с локальным взвешиванием по функции ядра Епанечникова. Горизонтальные штриховые линии (б—з) соответствуют границе между «нормальными» (референтными) и «патологическими» значениями показателей, отложенных по оси Y.

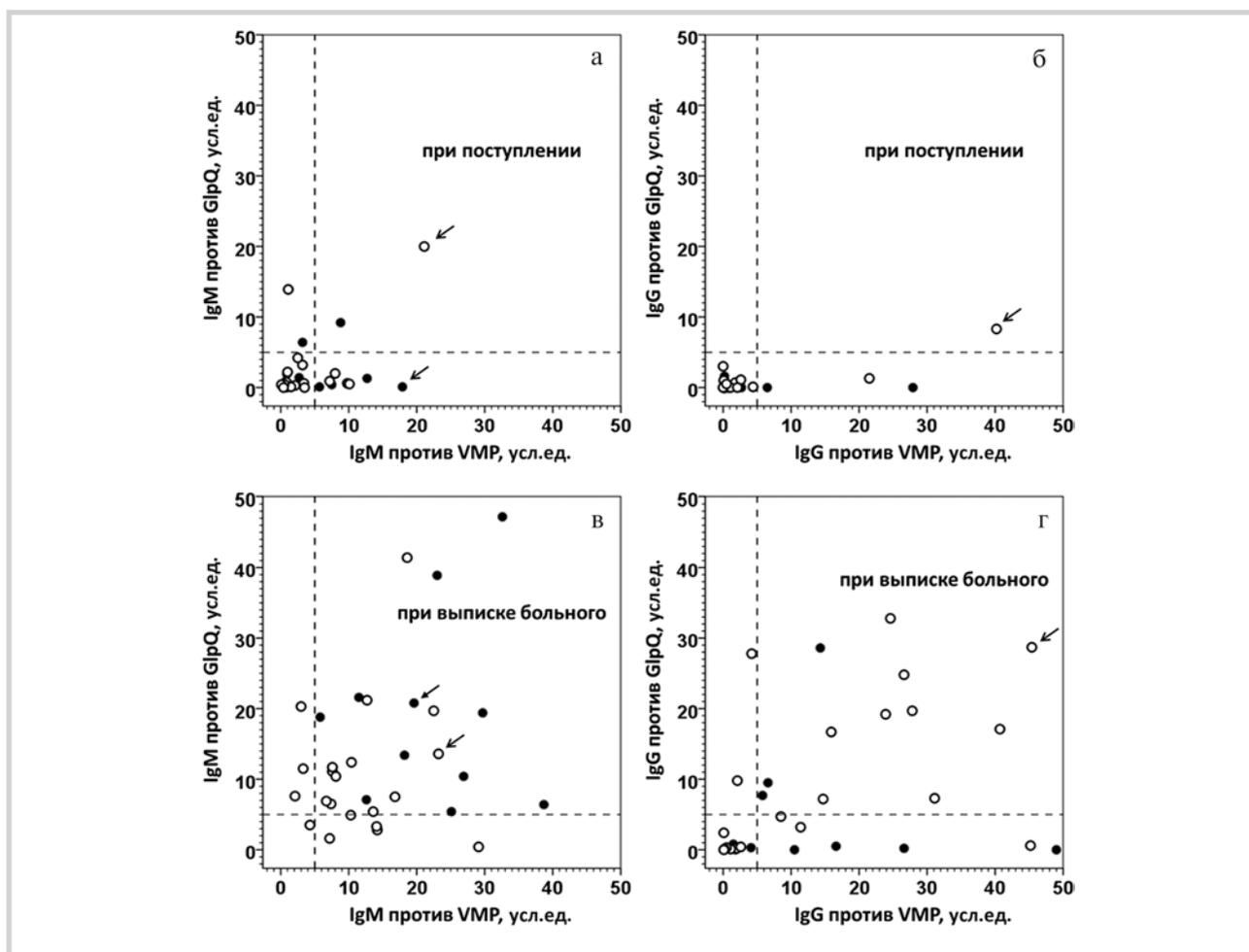


Рис. 2. Концентрация специфических IgM и IgG АТ против GlpQ и VMPs в крови больных ИКБ-БМ при госпитализации (а, б) и выписке из стационара (в, г).

Концентрация АТ IgM и IgG против GlpQ и VMPs измерена с помощью иммуночипа и выражена в условных единицах по величине СОС. Горизонтальные и вертикальные штриховые линии соответствуют порогам между значениями СОС, указывающими на достоверное наличие АТ, и значениями СОС в отсутствие или при низком уровне АТ. Отдельные точки соответствуют значениям, зарегистрированным для каждого из 32 изученных больных: 21 больного с более тяжелым течением ИКБ-БМ (белые кружки) и 11 больных с менее тяжелым течением (черные кружки). На рис. а, г и особенно б многие точки лежат в области, соответствующей отсутствию АТ (левый нижний квадрант) и отчасти перекрывают друг друга. Стрелками указаны данные больных, поступивших на 29-й и 44-й дни после присасывания клеща, вероятно, во время рецидива ИКБ-БМ.

ключение составляла температура тела, считавшаяся высокой, вклад — 1 при значениях выше 39,2 °С).

Средний КППТ при ИКБ-БМ ($5,7 \pm 1,9$) в 5 раз превышал КППТ при ЛБ ($1,1 \pm 1,1$). Боррелиозом с повышенной тяжестью течения далее будет считаться заболевание с КППТ 5 или выше: к нему отнесено 71% случаев ИКБ-БМ и 1 из 71 случая ЛБ (см. табл. 2).

Концентрация ДНК и РНК *B. miyamotoi* измерена по гену *16S* РНК в крови 19 больных ИКБ-БМ при поступлении в стационар и в динамике в течение 5 дней. Как показатель уровня бактериемии далее будет использоваться только концентрация ДНК/РНК при поступлении, поскольку в ходе лечения она резко падает и на 3–4-й день в стационаре определяется только у 2 больных, а на 5-й день не выявляется. Среднюю величину и диапазон концентраций правильнее анализировать и представлять в логарифмических единицах, поскольку распределение концентраций сильно скошенное (не гауссовское), а распре-

деление Log_{10} [концентрации] — «нормальное», колоколообразное. Медиана Log_{10} [ДНК] при поступлении равна 4,0 (3,4–4,3), т.е. концентрация ДНК равна 10 000 копий/мл; медиана Log_{10} [РНК] при поступлении равна 4,3 (3,3–4,8). Размах уровня РНК *B. miyamotoi* в крови от 0 до 420 000 копий/мл. Количество РНК коррелирует с количеством ДНК (ККС=0,83), но в среднем в 2,5 раза превышает количество ДНК. Это указывает на то, что перед взятием образца в момент поступления больного происходило размножение боррелий, хотя и не слишком активное.

Концентрация ДНК (и РНК) *B. miyamotoi* в крови обратно коррелирует с инкубационным периодом (ККС=–0,55) и длительностью промежутка времени между началом заболевания и госпитализацией (ККС=–0,40), т.е. спирохетемия максимальна, когда заболевание развивается сравнительно быстро (рис. 1, а). Концентрация ДНК *B. miyamotoi* коррелирует с температурой тела в стационаре (ККС=0,34), ЧСС при поступлении (ККС=0,60) и сум-

марным числом клинических симптомов заболевания (ККС=0,48), т.е. с непосредственными проявлениями лихорадочного синдрома (см. рис. 1, б—г). Неожиданным оказалось, что при высокой концентрации ДНК *B. miyamotoi* слабее выражены тромбоцитопения (ККС=0,51) и нейтропения (ККС=0,51), ниже уровень креатинина в крови (ККС=-0,38) и белка в моче (ККС=-0,43) (см. рис. 1, д—з). Вероятно, эти наблюдения объясняются тем, что на пике спирохетемии данные нарушения еще не успевают проявиться, а в процессе взаимодействия иммунной системы с патогеном не только падает концентрация боррелий в крови, но и снижается количество эфферторов-клеток крови, а также развивается органная патология. В силу разнонаправленности связей уровня спирохетемии с патологическими проявлениями ИКБ-БМ корреляций концентрации ДНК или РНК *B. miyamotoi* с КПТ не обнаружено.

Концентрация специфических IgM и IgG измерялась дважды: при поступлении больного ИКБ-БМ (в среднем на 2-й день заболевания) и при выписке (в среднем на 14-й день заболевания). Хотя с помощью иммуночипа оценен иммунный ответ на широкий спектр антигенов (см. раздел «Материалы и методы»), из которых наибольший интерес вызывают АТ к основным вариабельным поверхностным белкам (VMPs) различных семейств (Vlp15/16, Vlp18, Vsp1 и Vlp5), в данной публикации для простоты ответ на VMPs будет характеризоваться наибольшим ответом на 1 из 4 VMPs. Кроме того, будет рассмотрен ответ на GlpQ, специфический фермент боррелий — возбудителей КВЛ.

При поступлении только 4 из 32 обследованных больных ИКБ-БМ имели АТ IgM к GlpQ и всего 1 больной — IgG (и IgM) АТ (рис. 2). Примечательно, что этот больной госпитализирован через 29 дней после присасывания клеща, а за 18 дней до этого в анамнезе у него имелось серьезное недомогание, вероятно, спровоцированное первым эпизодом ИКБ-БМ, но диагностированное как соматическое заболевание. Иммунный ответ на поверхностные антигены VMPs развивается раньше, при поступлении уровень АТ IgM и IgG к VMP превышает пороговый у 10 и 4 больных соответственно. При выписке 26 и 28 больных имели АТ IgM соответственно к GlpQ и VMPs. Только у 1 больного из 32 отсутствовали АТ IgM как к GlpQ, так и к VMPs. АТ IgG к VMPs и GlpQ вырабатываются у 19 и 14 больных соответственно (см. рис. 2); у 11 (34%) больных еще не обнаруживались специфические АТ. (По нашим данным, максимальный уровень АТ IgG к *B. miyamotoi* достигается через 30—90 дней после заболевания ИКБ-БМ.)

При выписке уровень специфических АТ варьировал в широких пределах: от 5 усл. ед. (пороговое значение) до 50 усл. ед. по величине СОС. Статистически значимых корреляций уровня АТ с индивидуальными особенностями острой фазы заболевания, в том числе с показателями, перечисленными в табл. 1, 2, и концентрацией ДНК и РНК *B. miyamotoi* при поступлении, не выявлено. При этом у 21 (66%) из 32 пациентов наблюдалось повышенная тяжесть течения ИКБ-БМ. В этой подгруппе больных (см. рис. 2, в, г, белые кружки) уровень IgM к VMPs и GlpQ ниже, чем в подгруппе 11 лиц с менее тяжелым течением ($p=0,005$ и $p=0,05$ по критерию Манна—Уитни соответственно). Уровни специфических IgG при выписке в этих подгруппах не различаются.

Обсуждение

Результаты этого и параллельных исследований [3—6, 22] подтверждают широкое распространение инфекции *B. miyamotoi* в России и укрепляют представление об ИКБ-БМ как о заболевании среднетяжелого течения без летальных исходов и инвалидизирующих последствий. Становится возможным с патогенетических позиций проследить стадийность развития инфекции. Заражение происходит быстро, как правило, в 1-й день присасывания клеща, как выявляется и в опытах на животных [23] и объясняется изначальным присутствием возбудителя в слюнных железах клеща-переносчика. В течение инкубационного периода происходит медленный, вероятно экспоненциальный, рост популяции боррелий. Если предположить, что характеристики роста приблизительно такие же, как в условиях *in vitro* [24] (удвоение каждые 28 ч), то за 14 сут 1 боррелия должна дать около 4000 потомков, что ниже среднего уровня спирохетемии при поступлении (11 000 копий/мл, или 33 млн на 3 л плазмы крови). Согласовать это расхождение можно двумя способами: либо предположив, что *in vivo* время удвоения популяции короче — около 14 ч, либо начальная инфицирующая доза не одна, а около 10 000 боррелий. Весьма вероятно, истина посередине: инфицирующая доза лежит в пределах от 10 до 1000 боррелий, а время их удвоения — от 16 до 24 ч.

Острое начало заболевания, характеризующееся максимальной выраженностью лихорадочного синдрома, соответствует пику спирохетемии. У некоторых больных оно приходится на догоспитальную стадию, у некоторых при своевременной госпитализации наблюдается в стационаре. Остается неясным, что является причиной лихорадки, поскольку липополисахарида (эндотоксина), основного пирогена многих бактерий, боррелии не производят [9—11]. Однако при добавлении клинических штаммов *B. miyamotoi* в кровь человека *in vitro* нам удалось зарегистрировать продукцию провоспалительных цитокинов, в частности интерлейкина-6, сравнимую с эффектом добавления эндотоксина (неопубликованные данные). На этом этапе, предположительно, только начинается выработка специфических АТ, в первую очередь IgM к VMPs, поскольку большинство больных подходит к пику лихорадки в отсутствие АТ в крови. Далее спирохетемия и общие воспалительные реакции провоцируют микроциркуляторные нарушения [5], сопровождающиеся резким снижением уровня «свободных» тромбоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в крови. Эта вторая стадия заболевания характеризуется возможностью нарушения функций ряда органов [2—6], при этом не обнаруживается связанности типа и выраженности нарушений между собой, например корреляции уровня АлАТ и протеинурии. Возможно, отличия в тяжести течения ИКБ-БМ и типе органических нарушений определяются по принципу «слабого звена» в организме конкретного больного. У некоторых пациентов разгар ИКБ-БМ сопровождался осложнением предшествующих соматических заболеваний, в частности хронической почечной недостаточности или дисциркуляторной энцефалопатии. На третьей стадии клиническая симптоматика угасает, происходит выработка специфических АТ, боррелии в крови не выявляются. При условии адекватной антибиотикотерапии рецидивов ИКБ-БМ не возникает; без антибиотикотерапии

возможны, как и при КВЛ, новые приступы лихорадки через 1—2 нед [25]. Предполагается, что в основе рецидивов лежит механизм «иммунного избегания»: часть спирохет, выживая во время иммунной атаки, выключает синтез одного поверхностного антигена VMP и включает синтез иного антигенного варианта VMP, к которому АТ еще отсутствуют. Рецидив возникает в результате размножения в крови нового поколения *B. miyamotoi*. Подобное явление обнаружено в опытах на животных и *in vitro* [18]. Наконец, на стадии реконвалесценции практически у всех больных вырабатываются АТ не только IgM, но и IgG к VMP и GlpQ [19, 26]; максимальный уровень специфических IgG регистрируется через 30—90 дней после острого периода ИКБ-БМ. Однако иммунитет не является полноценным и пожизненным. Протективные АТ эффективны, в первую очередь против штамма *B. miyamotoi*,

вызвавшего заболевание, но не против всех антигенных вариантов этих боррелий, циркулирующих в природе. Уровень специфических АТ существенно снижается через 1—2 года после заболевания, через 5—7 лет АТ у большинства больных не выявляются. Поэтому все население России, проживающее в ареале распространения клещей *Ixodes persulcatus*, остается в группе риска заболевания ИКБ-БМ.

Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №15-15-00072). Авторы признательны медицинскому персоналу ООО МО «Новая больница» г. Екатеринбург за помощь в проведении исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Карань Л.С., Колясникова Н.М., Махнева Н.А. Топоркова М.Г., Надеждина М.В., Есаулкова А.Ю., Романенко В.В., Арумова Е.А., Платонов А.Е., Малеев В.В. Применение ПЦР в режиме реального времени для диагностики различных клещевых инфекций. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2010; 3: 72-77. [Karan' LS, Kolyasnikova NM, Toporkova MG, Makhneva MA, Nadezhdina MV, Esaulkova AI, Romanenko VV, Arumova EA, Platonov AE, Maleev VV. Usage of real time polymerase chain reaction for diagnostics of different tick-borne infections. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2010; 3: 72-77. (In Russ.)].
2. Platonov AE, Karan LS, Kolyasnikova NM, Makhneva NA, Toporkova MG, Maleev VV, Krause PJ, Fish D. Humans infected with the relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17 (10): 1816-1822. <https://doi.org/10.3201/eid1710.101474>
3. Сарксян Д.С., Платонов А.Е., Карань Л.С., Малинин И.Е., Халитова Л.И., Шахов В.И., Дударев М.В., Малинин О.В., Малеев В.В. Клинические особенности «нового» клещевого боррелиоза, вызываемого *Borrelia miyamotoi*. *Терапевтический архив*. 2012; 84(11): 34-41. [Sarksyan DS, Platonov AE, Karan LS, Malinin IE, Khalitova LI, Shakhov VI, Dudarev MV, Malinin OV, Maleev VV. Clinical presentation of "new" tick-borne borreliosis caused by *Borrelia miyamotoi*. *Ter Arkh*. 2012; 84(11): 34-41. (In Russ.)].
4. Платонов А.Е., Сарксян Д.С., Малеев В.В. Применение метода «дерева решений» для построения алгоритма дифференциальной диагностики природно-очаговых инфекций. *Терапевтический архив*. 2013; 11: 21—26. [Platonov AE, Sarksyan DS, Maleev VV. The application of decision trees for constructing an algorithm for the differential diagnosis of zoonotic infections. *Ter Arkh*. 2013; 85(11): 21—26. (In Russ.)].
5. Платонов А.Е., Сарксян Д.С., Карань Л.С., Шипулин Г.А., Гордыгина Е.В., Малинин О.В., Малеев В.В. Состояние системы свертывания крови и микроциркуляторные нарушения при иксодовом клещевом боррелиозе, вызванном *Borrelia miyamotoi*. *Терапевтический архив*. 2015; 87 (11): 26-32. [Platonov AE, Sarksyan DS, Karan LS, Shipulin GA, Gordygina EV, Malinin OV, Maleev VV. The blood coagulation system and microcirculatory disorders in ixodid tick-borne borreliosis caused by *Borrelia miyamotoi*. *Ter Arkh*. 2015; 87(11): 26-32. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17116/terarkh2015871126-32>
6. Багаутдинова Л.И., Платонов А.Е., Сарксян Д.С., Стуколова О.В., Шипулин Г.А., Малеев В.В., Дударев М.В. вызвавшего заболевание, но не против всех антигенных вариантов этих боррелий, циркулирующих в природе. Уровень специфических АТ существенно снижается через 1—2 года после заболевания, через 5—7 лет АТ у большинства больных не выявляются. Поэтому все население России, проживающее в ареале распространения клещей *Ixodes persulcatus*, остается в группе риска заболевания ИКБ-БМ.
7. Катамнез больных иксодовыми клещевыми боррелиозами, вызванными *Borrelia miyamotoi* или *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Терапевтический архив*. 2016; 88 (11): 43-54. [Bagautdinova LI, Platonov AE, Sarksyan DS, Stukolova OV, Shipulin GA, Maleev VV, Dudarev MV. Follow-up of patients with Ixodes tick-borne borrelioses caused by *Borrelia miyamotoi* or *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Ter Arkh*. 2016; 88(11):43-54. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17116/terarkh2016881143-54>
8. Krause PJ, Fish D, Narasimhan S, Barbour AG. *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21(7): 631-639. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.006>
9. Wagemakers A, Staarink PJ, Sprong H, Hovius JW. *Borrelia miyamotoi*: a widespread tick-borne relapsing fever spirochete. *Trends Parasitol*. 2015; 31(6): 260-269. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.03.008>
10. Cutler SJ. Relapsing fever borreliae: a global review. *Clin Lab Med*. 2015; 35(4):847-865. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.07.001>
11. Larsson C, Andersson M, Bergstrom S. Current issues in relapsing fever. *Curr Opin Infect Dis*. 2009; 22(5):443-449. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32832f2b2b>
12. Платонов А.Е., Малеев В.В., Карань Л.С. Боррелиозные возвратные лихорадки: забытые и новые. *Терапевтический архив*. 2010; 82(11): 74-80. [Platonov AE, Maleev VV, Karan' LS. Relapsing borrelioses fevers: forgotten and new ones. *Ter Arkh*. 2010; 82(11): 74-80. (In Russ.)].
13. Hovius JW, de Wever B, Sohne M, Brouwer MC, Coumou J, Wagemakers A, Oei A, Knol H, Narasimhan S, Hodiament CJ, Jahfari S, Pals ST, Horlings HM, Fikrig E, Sprong H, van Oers MH. A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. *Lancet* 2013; 382 (9892): 658. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61644-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61644-X)
14. Gugliotta JL, Goethert HK, Berardi VP, Telford SR 3rd. Meningoencephalitis from *Borrelia miyamotoi* in an immunocompromised patient. *N Engl J Med* 2013; 368(3): 240-245. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209039>
15. Krause PJ, Narasimhan S, Wormser GP, Barbour AG, Platonov AE, Brancato J, Lepore T, Dardick K, Mamula M, Rollend L, Steeves TK, Diuk-Wasser M, Usmani-Brown S, Williamson P, Sarksyan DS, Fikrig E, Fish D. *Borrelia miyamotoi sensu lato* seroreactivity and seroprevalence in the northeastern United States. *Emerg Infect Dis* 2014; 20(7): 1183-1190. <https://doi.org/10.3201/eid2007.131587>

15. Molloy PJ, Telford SR III, Chowdri HR, Lepore TJ, Gugliotta JL, Weeks KE, Hewins ME, Goethert HK, Berardi VP. *Borrelia miyamotoi* disease in the Northeastern United States: a case series. *Ann Intern Med.* 2015; 163(2): 91-98. <https://doi.org/10.7326/M15-0333>
16. Moore A, Nelson C, Molins C, Mead P, Schriefer M. Current guidelines, common clinical pitfalls, and future directions for laboratory diagnosis of Lyme disease, United States. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22(7): 1169-1177. <https://doi.org/10.3201/eid2207.151694>
17. Stanek G, Fingerle V, Hunfeld KP, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A, Kristoferitsch W, O'Connell S, Ornstein K, Strle F, Gray J. Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(1): 69-79. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03175.x>
18. Wagemakers A, Koetsveld J, Narasimhan S, Wickel M, Deponthe K, Bleijlevens B, Jahfari S, Sprong H, Karan LS, Sarksyan DS, van der Poll T, Bockenstedt LK, Bins AD, Platonov AE, Fikrig E, Hovius JW. Variable Major Proteins as targets for specific antibodies against *Borrelia miyamotoi*. *J Immunol.* 2016; 196(10): 4185-4195. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.10.048>
19. Стуколова О.А., Колясникова Н.М., Сарксян Д.С., Топоркова М.Г., Коетсвелд Ж., Карань Л.С., Черкашина А.С., Маркелов М.Л., Долгова А.С., Новийс Ж.В., Шипулин Г.А., Платонов А.Е. Разработка и использование планарного белкового биочипа для серологической диагностики клещевого боррелиоза, вызванного *Borrelia miyamotoi*. В кн.: *Молекулярная диагностика 2017*. Под ред. Покровского В.И. Тамбов: ООО фирма 'Юлис'; 2017: Том 2, 151-152. [Stukolova OA, Kolyasnikova NM, Sarksyan DS, Toporkova MG, Koetsveld J, Karan LS, Cherkashina AS, Markelov ML, Dolgova AS, Hovius JW, Shipulin GA, Platonov AE. Development and use of a planar protein biochip for the serological diagnostics of tick-borne borreliosis caused by *Borrelia miyamotoi*. In: *Molecular diagnostics 2017*. Pokrovsky V.I., ed. Tambov: Yulis, 2017: Vol.2, 151-152.]
20. Наследов А. *SPSS 19: профессиональный статистический анализ данных*. СПб: Мир книг; 2011. Ссылка активна на 17.07.2017. [Nasledov A. *SPSS 19: professional statistical analysis of data*. St. Petersburg: Mir knig; 2011. (In Russ.). Accessed July 17, 2017.] <http://statpsy.ru/books/spss-19/>
21. Платонов А.Е. *Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы*. М: Издательство ПАМН; 2000. Ссылка активна на 17.07.2017. [Platonov A.E. *Statistical analysis in medicine and biology: problems, terminology, logic, computer methods*. Moscow: Izdatel'stvo RAMN; 2000. (In Russ.). Accessed July 17, 2017.] https://eknigi.org/nauka_i_ucheba/60205-statisticheskij-analiz-v-medicine-i-biologii.html
22. Титков А.В., Платонов А.Е., Сарксян Д.С., Махнева Н.А., Платонова О.В., Колясникова Н.М., Карань Л.С., Барталев С.А. Климатические и экологические условия в местах заражения человека боррелиями *Borrelia miyamotoi*. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2013;6:30-33. [Titkov AV, Platonov AE, Sarksyan DS, Makhneva NA, Platonova OV, Kolyasnikova NM, Karan LS, Bartalev SA. Climatic and ecological conditions at the locations of human infection with *Borrelia miyamotoi*. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2013;6:30-33.]
23. Breuner NE, Dolan MC, Replogle AJ, Sexton C, Hojgaard A, Boegler KA, et al. Transmission of *Borrelia miyamotoi sensu lato* relapsing fever group spirochetes in relation to duration of attachment by *Ixodes scapularis* nymphs. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017;8(5):677-681. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.03.008>
24. Koetsveld J, Kolyasnikova NM, Wagemakers A, Toporkova MG, Sarksyan DS, Oei A, Platonov AE, Hovius JW. Development and optimization of an in vitro cultivation protocol allows for isolation of *Borrelia miyamotoi* from patients with hard tick-borne relapsing fever. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(7):480-484. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.01.009>
25. Сарксян Д.С., Малеев В.В., Платонов А.Е., Платонова О.В., Карань Л.С. Рецидивирующее (возвратное) течение заболевания, вызванного *Borrelia miyamotoi*. *Терапевтический архив*. 2015;87(11):18-25. [Sarksyan DS, Maleev VV, Platonov AE, Platonova OV, Karan' LS. Recurrent disease caused by *Borrelia miyamotoi*. *Ter Arkh.* 2015; 87(11): 18-25. (In Russ.).] <https://doi.org/10.17116/terarkh2015871118-25>
26. Jahfari S, Sarksyan DS, Kolyasnikova NM, Hovius JW, Sprong H, Platonov AE. Evaluation of a serological test for the diagnosis of *Borrelia miyamotoi* disease in Europe. *J Microbiol Methods.* 2017;136:11-16. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.02.013>

Поступила 26.06.17