

Результаты применения метода полимеразной цепной реакции для лабораторного подтверждения иксодовых клещевых боррелиозов

В.Ю. Тетерин¹ (voltair_777@yahoo.com), Э.И. Копенберг² (ekorenberg@stream.ru),
В.В. Нефедова² (valentinnef@mtu-net.ru), Н.Н. Воробьева¹ (infect-perm@mail.ru),
В.И. Фризен³ (infect-perm@mail.ru)

¹ ГОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера» Росздора

² НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва

³ ГУЗ «Краевая клиническая инфекционная больница», г. Пермь

Резюме

Проведена диагностика иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ) с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) у 251 пациента, находившегося на лечении в краевой инфекционной больнице г. Перми в весенне-летний период 2007 года с острыми лихорадочными заболеваниями после присасывания клещей. Исследованы 634 пробы крови методом «nested» ПЦР с родоспецифичными праймерами *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Bb23SN1 – Bb23SC1 и IGSb1 – IGSa2), фланкирующими участок 5S – 23S rPHK-спейсера, в динамике заболевания. Определены оптимальные сроки (8 – 14-й день от начала заболевания) детекции ДНК боррелий в крови пациентов. Установление диагноза ИКБ с помощью ПЦР у 57,5% пациентов с эритемной и безэритемной формами позволяет использовать этот метод в качестве дополнительного в лабораторной диагностике заболевания.

Ключевые слова: иксодовые клещевые боррелиозы, полимеразная цепная реакция, диагностика

The Results of Using of Polymerase Chain Reaction Method for the Laboratory Confirmation of Ixodid Tick-Borne Borrelioses

V.Yu. Teterin¹ (voltair_777@yahoo.com),
E.I. Korenberg² (ekorenberg@stream.ru),
V.V. Nefedova² (valentinnef@mtu-net.ru),
N.N. Vorob'ova¹ (infect-perm@mail.ru),
V.I. Frizen³ (infect-perm@mail.ru)

¹ E.A. Wagner The State Medical Academy of Perm

² N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Academy of Medical Sciences, Moscow

³ Perm Regional Hospital of Infectious Diseases

Abstract

With the help of polymerase chain reaction (PCR) in 251 patients with acute feverish illness after a tick bite, treated at the Perm Regional Hospital of Infectious Diseases in the spring-summer period of 2007 the diagnostics of Ixodid tick-borne borreliosis (ITBB), was performed.

By «nested» PCR with genus-specific primers *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Bb23SN1 – Bb23SC1 and IGSb1 – IGSa2), flanking the 5S – 23S rRNA intergenic spacer region, 634 blood samples were studied in the dynamics of the disease. The optimal period (8 – 14 days from the onset of the disease) for the detection of borrelia DNA in the blood of the patients was determined. Establishing the diagnosis of ITBB by PCR in 57.5% of the patients with erythematous and nonerythematous forms allows to use this method as additional in the laboratory diagnosis of the disease.

Key words: Ixodid tick-borne borreliosis, polymerase chain reaction, diagnosis

Введение

В лесной зоне Прикамья, преимущественно в южно-таежных и хвойно-широколиственных лесах, широко распространены очаги иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ). Заражение обусловлено *Borrelia garinii* и *Borrelia afzelii* [2, 23].

Значительное увеличение числа выявляемых случаев ИКБ в Пермском крае, подтверждающее экспертный прогноз в отношении истинных показателей заболеваемости в этом регионе, во многом связа-

но с совершенствованием методов лабораторной диагностики [4, 5]. Их условно можно подразделить на не прямые – серологические тесты (ИФА (иммуноферментный анализ), РНИФ (реакция непрямой иммунофлюоресценции), иммунный блоттинг) и прямые – направленные на детекцию возбудителя, его антигенов или ДНК (культуральный метод, прямая микроскопия и ПЦР).

В США и Европе при экспресс-диагностике ИКБ для ИФА сывороток крови пациентов широко при-

меняют рекомбинантные антигены (синтетические пептиды). Зачастую после ИФА используют иммуноблоттинг. Эти методы обладают высокой специфичностью и чувствительностью [39]. Однако, несмотря на все достоинства серологических исследований, ни одна из известных реакций не позволяет эффективно выявлять антитела на всех этапах иммуногенеза. Позднее появление специфических иммуноглобулинов М и G, а также разная выраженность антительного ответа у больных обуславливают трудность ранней диагностики инфекции [6 – 8]. Микроскопические тесты часто не дают возможности обнаружить боррелии из-за их низкой концентрации в исследуемом материале. Культуральный метод, который считается «золотым стандартом» диагностики, в некоторых случаях применяется для подтверждения ИКБ, но не может рассматриваться как способ экспресс-диагностики: показатель частоты изоляции невысок, а рост боррелий в посевах требует длительного времени [6 – 8, 15, 39, 41].

В этой связи значимыми преимуществами для подтверждения ИКБ обладает один из наиболее широко используемых тестов молекулярной диагностики – полимеразная цепная реакция. Она позволяет не только осуществлять детекцию ДНК боррелий в острый период заболевания, но и идентифицировать возбудителей до геновидов [17], а также осуществлять диагностику микст-инфекций [36].

Несмотря на то что аналитическая чувствительность ПЦР достигает 10 копий в исследуемом образце [25], имеются существенные ограничения этого метода, связанные с недостаточным, иногда кратковременным, накоплением возбудителя или его ДНК в различных биологических жидкостях и тканях. Поэтому диагностическая чувствительность ПЦР значительно варьирует в зависимости от выбранного клинического материала. При исследовании образцов биопсии кожи, взятых в месте локализации эритемы, она достигает 80 – 88%, а при хроническом атрофическом акродерматите – 92 – 100% [16, 27], что согласуется с результатами изоляции боррелий [15]. Высокие положительные показатели были получены при исследовании ПЦР-методом синовиальной жидкости пациентов с Лайм-артритом [28, 31]. Диагностическая чувствительность ПЦР при исследовании спинномозговой жидкости варьирует в очень широких пределах: от 12 до 100%; в среднем она составляет 23% [15, 18]. При исследовании ликвора пациентов с нейроборрелиозом положительные результаты ПЦР были получены в 50% случаев, когда срок взятия образцов не превышал двух недель от начала заболевания, а в более поздние сроки этот показатель снижается до 13% [24].

Большой интерес в качестве биоматериала для ПЦР представляет кровь – она обеспечивает возможность быстрой диагностики, что особенно важно при безэритемной форме ИКБ, с выявлением диссеминации возбудителя и случаев повторных заражений.

С момента первого обнаружения ДНК боррелий методом ПЦР в крови пациентов с мигрирующей

эритемой проведено большое количество подобных исследований [21]. Однако до настоящего времени нет единого мнения об эффективности использования цельной крови, плазмы или сыворотки для этой цели. Показатели выявления генетического материала боррелий в таких образцах чрезвычайно варьируют (от 4 до 100%) [15, 20, 25, 34], но, как правило, они невысоки [15, 19]. Средний показатель чувствительности метода по результатам шести исследований, проведенных в 2005 году в Европе и США, составил 14% [15]. Такой незначительный процент выявления ДНК нередко связывают с непродолжительной и неинтенсивной спирохетемией при гематогенной диссеминации возбудителя [38], что подтверждается показателями частоты изоляции боррелий из крови [10, 26, 32]. Однако после проведенной оптимизации культурального метода удалось обнаружить возбудитель в крови в значительно большем проценте случаев [40]. Это дает основание полагать, что эффективность ПЦР может быть также повышена при совершенствовании ее методики, например при правильном выборе ДНК-мишеней и соответствующих им праймеров [15]. Несмотря на использование огромного количества разнообразных мишеней, только несколько сохранили свою значимость в настоящее время. Среди них – область межгенного спейсера РНК *rrf* (5S) – *rrl* (23S) [30, 39]. Применение праймеров сразу к нескольким ДНК-мишеням в определенной степени повышает чувствительность реакции [16, 31], хотя иногда даже набор праймеров не всегда обеспечивает ее достаточную эффективность. Кроме того, наличие в крови ингибиторов этой реакции – существенный недостаток, который может снизить количество положительных результатов [14, 15, 35]. В то же время как в нашей стране, так и за рубежом пока не стандартизованы разные этапы проведения ПЦР (выделение ДНК из различных биологических жидкостей и тканей, режим амплификации и др.) [35]. Один из факторов, способных значительно повысить результативность этой реакции для диагностики ИКБ, – определение в динамике инфекционного процесса временного промежутка, оптимального для взятия крови и постановки ПЦР. Такой временной интервал пока не установлен, хотя нередко высокие положительные показатели, полученные в ПЦР, регистрировали в ранние сроки от начала заболевания [9, 22]. Этот вопрос ввиду своей значимости требует более детального изучения.

Цель работы – определение оптимальных сроков детекции ДНК боррелий в крови пациентов методом ПЦР при лабораторной диагностике ИКБ.

Материалы и методы

В весенне-летний период 2007 года в Пермскую краевую клиническую инфекционную больницу (ККИБ) поступил 251 пациент с острыми лихорадочными заболеваниями (ОЛЗ), развившимися после присасывания клеща. Среди них было

128 женщин и 123 мужчины в возрасте от 15 до 84 лет. Большинство (78,9%) госпитализированы в первые семь дней от начала заболевания.

Серологическое обследование пациентов проводили методом ИФА на базе диагностической лаборатории ККИБ в динамике заболевания: при поступлении в стационар и через 10 – 14 дней. Для выявления иммуноглобулинов М и G к *Borrelia burgdorferi sensu lato* и к вирусу клещевого энцефалита (КЭ) использовали тест-системы производства ООО «Омникс» (Санкт-Петербург) и ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Серодиагностику гранулоцитарного анаплазмоза и моноцитарного эрлихиоза человека (ГАЧ и МЭЧ) проводили в тех случаях, когда имелись клинические и лабораторные данные, характерные для этих заболеваний [1, 3]. С этой целью использовали тест-системы ООО «Омникс» для выявления IgM и IgG к *Ehrlichia chaffeensis* и *Anaplasma phagocytophilum*. В дальнейшем серологическое обследование осуществляли раз в квартал в течение года при диспансеризации реконвалесцентов или при их обращении с жалобами на состояние здоровья.

На основании клинико-серологических данных у 127 (50,6%) пациентов диагностированы ИКБ в виде моно- и микст-инфекции. У 106 (83,5%) из них выявлена локализованная стадия заболевания с мигрирующей эритемой, у 21 (16,5%) – диссеминированная стадия с развитием как эритемной, так и безэритемной форм и поражениями опорно-двигательного аппарата, печени, сердечно-сосудистой и нервной систем. Среди микст-инфекций диагностированы сочетания ИКБ с КЭ, ГАЧ и геморрагической лихорадкой с почечным синдромом.

Для обследования методом ПЦР в первые 50 – 60 дней от начала заболевания у всех пациентов

трижды были взяты пробы цельной крови из локтевой вены (по 1 мл в пробирки Eppendorf, содержащие 0,1 мл антикоагулянта EDTA). От каждого больного получено как минимум по две пробы (первую брали при поступлении пациента в стационар – до начала антибиотикотерапии, вторую – через 10 – 14 дней после первой). У 132 пациентов была взята третья проба через 30 и более дней после второй (несколько проб были взяты раньше). В общей сложности получены 634 пробы крови (табл. 1), из них 346 проб – от 127 пациентов с диагнозом ИКБ, установленным клинико-серологическим методом (табл. 2).

ПЦР проводили в лаборатории переносчиков инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН. Для получения геномной ДНК из цельной крови использовали коммерческий набор «Проба-НК» (ЗАО «ДНК-Технология», Москва). ПЦР проводили в четырехканальном термоциклере «Терцик» этой же фирмы. При необходимости пробы хранили при температуре -20°C .

Для амплификации в «nested» ПЦР использованы родоспецифичные праймеры *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Bb23SN1 – Bb23SC1 и IGSb1 – IGSa2), фланкирующие участок 5S – 23S rPHK-спейсера [30].

С целью контроля и правильной интерпретации результатов использована ДНК *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (типовой штамм B31). Амплифицированная ДНК исследована методом горизонтального электрофореза в 1 – 2%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия и трис-боратного буфера при напряжении 165 В; для анализа агарозных гелей использована видеосистема DNA Analyzer с программами Gel-Imager и Gel-Analysis версии 1.0.

Таблица 1.

Число проб крови, полученных от пациентов в разные сроки от начала заболевания и исследованных методом ПЦР (в скобках – % от общего числа проб, полученных в данные сроки)

Характеристика проб	Сроки от начала заболевания (в днях) и число полученных проб				Всего
	1 – 7	8 – 14	15 – 21	22 и более	
Первая	194 (100)	40 (22,5)	13 (13,7)	4 (2,4)	251
Вторая		138 (77,5)	81 (85,3)	32 (19,2)	251
Третья			1 (1)	131 (78,4)	132
Всего (% от общего числа проб)	194 (30,6)	178 (28)	95 (15)	167 (26,4)	634

Таблица 2.

Результаты исследования в ПЦР проб крови от 127 пациентов с диагнозом «ИКБ»

Сроки от начала заболевания (в днях)	Исследовано проб и процент ($P \pm 2m_p$) от их общего числа	Из них число и процент ($P \pm 2m_p$) проб с ДНК боррелий
1 – 7	92 (26,6 \pm 4,7)	6 (6,5 \pm 5,1)
8 – 14	81 (23,4 \pm 4,5)	53 (65,4 \pm 10,5)
15 – 21	55 (15,9 \pm 3,9)	15 (27,3 \pm 12,0)
22 и больше	118 (34,1 \pm 5,1)	4 (3,4 \pm 3,3)
Всего проб	346 (100%)	78 (22,5%)

Результаты и обсуждение

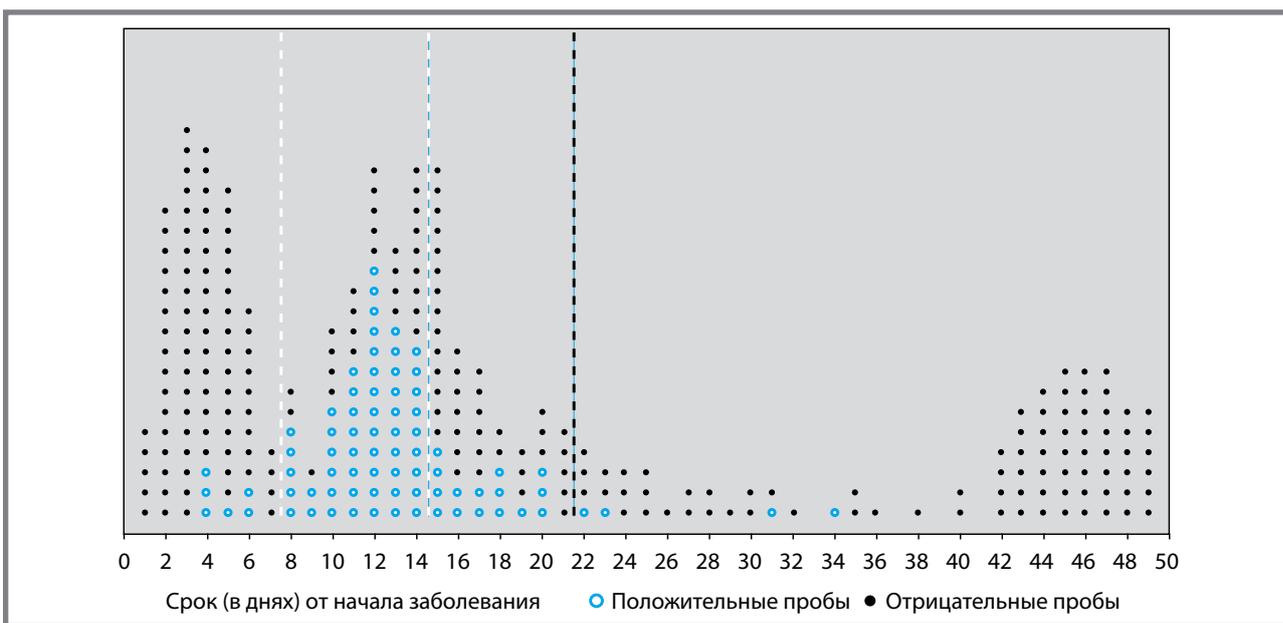
В краткой, тезисной форме результаты наших исследований были изложены ранее [12]. В общей сложности ДНК возбудителей ИКБ обнаружена в 90 (14,2%) пробах крови от 85 (34%) пациентов, причем у 12 из них по клинично-серологическим данным ИКБ не был диагностирован (см. табл. 2, 3).

Из 106 пациентов с локализованной стадией ИКБ у 60 (56,6%) человек была детектирована ДНК боррелий; из 21 пациента с диссеминированной стадией – у 13 (61,9%). Всего из 127 пациентов с диагнозом «ИКБ» *B. burgdorferi sensu lato* обнаружена методом ПЦР у 73 (57,5%). Наиболее часто ДНК боррелий присутствовала в пробах, взятых на второй неделе от начала заболевания. Рисунок 1 отражает результаты исследования в ПЦР проб крови пациентов с диагнозом «ИКБ» в разные сроки от начала заболевания. На рисунке 2 представлены в динамике результаты тестирования в ПЦР проб крови конкретных пациентов с диагнозом «ИКБ». Каждый из них обследован трижды в разные сроки от начала заболевания.

114 пациентов с диагнозом «ИКБ» (из 127) были минимум двукратно обследованы серологически в указанные выше сроки и 13 пациентов – однократно. В общей сложности иммуноглобулины классов М или G к *B. burgdorferi sensu lato* обнаружены у 44 больных (36,4 ± 8,5%), причем коэффициент серопозитивности составлял от 1,0 до 9,9. У 27-ми сероположительных пациентов (61,4 ± 14,7% от числа сероположительных) в крови также обнаружена ДНК боррелий. Вместе с тем из 83-х серонегативных больных ПЦР дала положительные результаты у 46 (55,4 ± 10,9%). Кроме того, ДНК *B. burgdorferi sensu lato* выявлена у 12 (12,4 ± 6,7%) из 124 пациентов, у которых после проведенного клинично-серологического обследования диагноз «ИКБ» был исключен и выставлен иной (неверный) диагноз, что позволило его уточнить.

Возможность обнаружения боррелий в крови больных эритемной формой ИКБ была неоднократно продемонстрирована их изоляцией, в том числе и от пациентов из Пермского края [9, 10, 22, 26]. В нашем исследовании ДНК боррелий с 1-го по 7-й день

Рисунок 1.
Результаты исследования в ПЦР всех проб крови пациентов с диагнозом «ИКБ»*



* За исключением 35-ти отрицательных результатов, полученных у пациентов через 50 и более дней от начала заболевания.

Таблица 3.
Результаты исследования в ПЦР проб крови от 124 пациентов с острыми лихорадочными заболеваниями, у которых ИКБ был исключен после клинично-серологического обследования

Сроки от начала заболевания (в днях)	Исследовано проб и процент (P ± 2m _p) от их общего числа	Из них число и процент (P ± 2m _p) проб с ДНК боррелий
1 – 7	102 (35,4 ± 5,6)	0
8 – 14	97 (33,7 ± 5,6)	12 (12,4 ± 6,7)
15 – 21	40 (13,9 ± 4,0)	0
22 и больше	49 (17 ± 4,4)	0
Всего проб	288 (100%)	12 (4,1%)

от начала заболевания обнаруживалась лишь в небольшом числе проб крови ($6,5 \pm 5,1\%$) вне зависимости от формы заболевания, что, вероятно, связано со слабой спирохетемией в этот период. При развитии локализованной стадии первоначальное накопление возбудителя происходит в месте его первичного проникновения, чему способствуют многочисленные факторы специфической и неспецифической резистентности макроорганизма. По всей видимости, в этом кроется вероятная причина редкости детекции ДНК *B. burgdorferi sensu lato* в крови в первую неделю от начала заболевания. Ее наиболее часто удается обнаружить в крови пациентов на 8 – 14-й день от начала заболевания (см. табл. 2, 3; рис. 1), что совпадает с оптимальными сроками изоляции боррелий из крови пациентов культуральным методом, то есть со сроками наиболее выраженной боррелиемии [10]. При этом положительными были не только пробы крови, взятые у больных в первые сутки специфического лечения, но и пробы, взятые на 10 – 14-й день с момента назначения антибиотикотерапии. Более того, большинство ПЦР-положительных результатов было именно среди вторых проб крови (рис. 2). Вероятно, определенную роль в этих случаях сыграла способность ПЦР выявлять ДНК как живых, так и погибших микроорганизмов, что, с одной стороны, увеличивает процент подтверждения ИКБ, а с другой, к сожалению, не позволяет судить о дальнейшем развитии инфекционного процесса. На третьей неделе от начала болезни процент ПЦР-положительных проб по сравнению с предыдущим сроком снизился практически в два раза, что, возможно, связано с начинающейся в это время элиминацией возбудителя из крови больных людей. Нам не удалось определить геномный материал боррелий в крови пациентов

позднее 34-го дня от начала заболевания даже методом «nested» ПЦР.

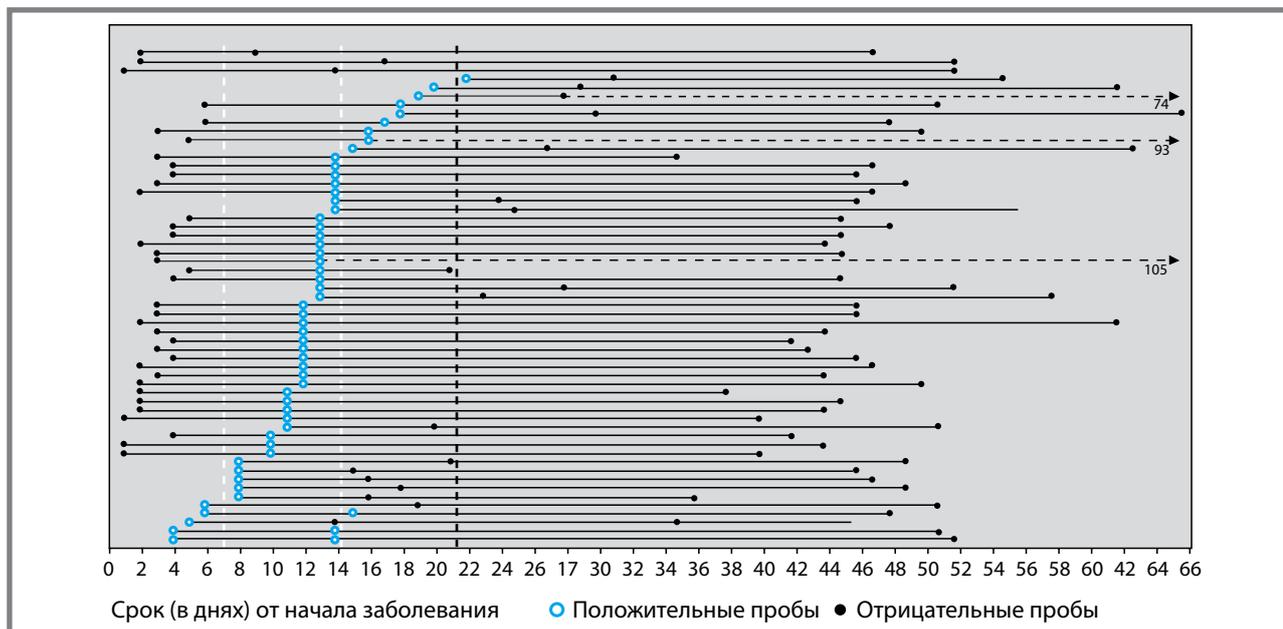
Культуральным и ПЦР-методами показано, что частота обнаружения боррелий в крови больных людей коррелирует с проявлениями их диссеминации [20]. Вместе с тем боррелиемия при эритемной форме может протекать и без каких-либо клинических проявлений [29, 33]. По нашим данным, частота выявления ДНК *B. burgdorferi sensu lato* у пациентов с симптомами заболевания была лишь незначительно большей при диссеминированной стадии ИКБ по сравнению с локализованной.

В первые две недели от начала болезни ДНК возбудителя определялась чаще, чем антитела к боррелиям. В нескольких случаях (9,7%), подобно случаям в Новосибирской области [13], при отрицательном результате серологического исследования только на основании ПЦР нам удалось выявить безэритемную форму ИКБ, что объясняется возможным низким уровнем гуморальных антител в этот период заболевания. Вместе с тем современные высокочувствительные тесты серологической диагностики, например метод фосфоресцентных иммуночипов, разработанный на основе микроплашетной биочип-технологии фосфоресцентного анализа (ФОСФАН™), уже в первые недели заболевания позволяют выявлять специфические антиборрелиозные IgG в 90% случаев [11]. Такой показатель оказывается выше результата, полученного нами с помощью ПЦР, даже в пределах оптимального временного «коридора» взятия от больных проб крови (с 8 – 14-го дня от начала заболевания) для обнаружения ДНК боррелий.

Выводы

Итак, представленные данные свидетельствуют о различной информативности ПЦР, используемой для

Рисунок 2.
Результаты трехкратного тестирования в ПЦР проб крови, взятых в разные сроки от начала заболевания у пациентов с диагнозом «ИКБ»*



* Для трех пациентов сроки получения третьей пробы показаны на рисунке цифрами рядом с пунктирными линиями.

лабораторного подтверждения ИКБ в разные сроки острого периода заболевания. В целом она относительно невысока, особенно в начале инфекционного процесса. По этой причине, а также учитывая отсутствие стандартизации этого метода, он не может рассматри-

ваться в качестве основного для лабораторной диагностики острого периода боррелиоза. Однако в ряде случаев ПЦР позволяет распознать инфекцию в ранние сроки, до формирования серологического ответа, или диагностировать ее серонегативную форму.

Литература

1. Афанасьева М.В., Коренберг Э.И., Фризен В.И. и др. Клинико-лабораторная апробация новых отечественных тест-систем для серологической верификации моноцитарного эрлихиоза и гранулоцитарного анаплазмоза человека // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2005. № 1. С. 45 – 48.
2. Воробьева Н.Н. Клиника, лечение и профилактика иксодовых клещевых боррелиозов / Под. ред. Э.И. Коренберга. – Пермь, 1998. – 136 с.
3. Григорян Е.В., Коренберг Э.И., Воробьева Н.Н. и др. Первые данные о клиническом течении моноцитарного эрлихиоза в России // Эпидемиол. и инфекц. бол. 2000. № 6. С. 20 – 23.
4. Коренберг Э.И. Проблемы болезни Лайма в России / Проблемы клещевых боррелиозов. – М., 1993. С. 13 – 21.
5. Коренберг Э.И., Воробьева Н.Н., Сумливая О.Н. и др. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами, в Пермском крае (этиология, эпидемиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение и профилактика): Методические рекомендации для врачей. – Пермь, 2007. – 257 с.
6. Крючечников В.Н., Коренберг Э.И., Деконенко Е.П. и др. Системный клещевой боррелиоз (болезнь Лайма): Методические рекомендации. – М., 1987. – 27 с.
7. Лобзин Ю.В., Рахманова А.Г., Антонов В.С. и др. Эпидемиология, этиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика иксодовых клещевых боррелиозов: Рекомендации для врачей. – СПб., 2000. – 51 с.
8. Лобзин Ю.В., Усков А.Н., Ющук Н.Д. и др. Иксодовые клещевые боррелиозы (этиология, эпидемиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика): Методические рекомендации ФГОУ ВУНМЦ Росздрава. – М., 2007. – 46 с.
9. Марфина Н.М., Шетекаури С.А., Ольховский И.А. Возможности ранней лабораторной диагностики клещевых нейроинфекций: клещевого энцефалита и Лайм-боррелиоза // Бюл. сиб. мед. 2008. Прил. № 1. С. 55 – 57.
10. Нефедова В.В., Тетерин В.Ю., Коренберг Э.И. и др. Изоляция возбудителя иксодового клещевого боррелиоза из крови больных // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2009. № 1. С. 63 – 66.
11. Помелова В.Г., Коренберг Э.И., Осин Н.С. и др. Применение фосфоресцентных иммуночипов для серологической диагностики иксодовых клещевых боррелиозов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010. № 1. С. 22 – 29.
12. Тетерин В.Ю., Коренберг Э.И., Нефедова В.В. и др. Оптимизация применения полимеразной цепной реакции для лабораторной диагностики иксодовых клещевых боррелиозов // Национальные приоритеты России. 2009. № 2. С. 65 – 67.
13. Фоменко Н.В. Генетическая гетерогенность *Borrelia* spp. Западной Сибири: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Иркутск, 2008. – 23 с.
14. Abu Al-Soud W., Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells // J. Clin. Microbiol. 2001. V. 39. P. 485 – 493.
15. Agüero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I. et al. Diagnosis of Lyme borreliosis // Clin. Microbiol. Rev. 2005. V. 18. P. 484 – 509.
16. Bretschneider S., Bruckbauer H., Klugbauer N. et al. Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy and urine samples from patients with skin borreliosis // J. Clin. Microbiol. 1998. V. 36. P. 2658 – 2665.
17. Busch U., Hizo-Teufel C., Fingerle V. et al. Three species of *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* and *B. garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulse-field gel electrophoresis and PCR // J. Clin. Microbiol. 1996. V. 34. P. 1072 – 1078.
18. Christen H.J., Eiffert H., Ohlenbusch A. et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of *Borrelia burgdorferi* in cerebrospinal fluid of children with acute peripheral facial palsy // Eur. J. Pediatr. 1995. V. 154. P. 374 – 377.
19. Dumler J.S. Molecular diagnosis of Lyme disease: review and meta-analysis // Mol. Diagn. 2001. V. 6. P. 1 – 11.
20. Goodman J.L., Bradley J.F., Ross A.E. et al. Bloodstream invasion in early Lyme disease: results from a prospective, controlled, blinded study using the polymerase chain reaction // Am. J. Med. 1996. V. 101. P. 239.

21. Guy E.C., Stanek G. Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by polymerase chain reaction // J. Clin. Pathol. 1991. V. 44. P. 610, 611.
22. Kondrusik M., Grygorczuk S., Skotarczak B. et al. Molecular and serological diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection among patients with diagnosed erythema migrans // Ann. Agric. Environ. 2007. V. 14. P. 209 – 213.
23. Korenberg E.I., Gorelova N.B., Kovalevskii Y.V. Ecology of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Russia / In: J. Gray, O. Kahl, R.S. Lane, G. Stanek (ed.). Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. – CAB International, 2002. P. 175 – 200.
24. Lebec A.M., Hansen K., Brandrup F. et al. Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in clinical specimens from patients with erythema migrans and Lyme neuroborreliosis // Mol. Diagn. 2000. V. 5. P. 139 – 150.
25. Liebling M.R., Nishio M.J., Rodriguez A. et al. The polymerase chain reaction for the detection of *Borrelia burgdorferi* in human body fluids // Arthritis Rheum. 1993. V. 36. P. 665 – 675.
26. Maraspin V., Ruzic-Sabljic E., Cimperman J. et al. Isolation of *Borrelia burgdorferi sensu lato* from blood of patients with erythema migrans // Infection. 2001. V. 29. P. 65 – 70.
27. Moter S.E., Hofmann H., Wallich R. et al. Detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in lesional skin of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans by ospA-specific PCR // J. Clin. Microbiol. 1994. V. 32. P. 2980 – 2988.
28. Nocton J.J., Dressler F., Rutledge B.J. et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis // N. Engl. J. Med. 1994. V. 330. P. 229 – 234.
29. Pauluzzi P., Bonin S., Gonzalez Inchaurrega M.A. et al. Detection of spirochaetal DNA simultaneously in skin biopsies, peripheral blood and urine from patients with erythema migrans // Acta Dermato-Venereologica. 2004. V. 84. P. 106 – 110.
30. Postic D., Assous M.V., Grimont P.A.D. et al. Diversity of *Borrelia burgdorferi sensu lato* evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S) – rrl (23S) intergenic spacer amplicons // Int. J. Syst. Bacteriol. 1994. V. 44. P. 743 – 752.
31. Priem S., Rittig M.G., Kamradt T. et al. An optimized PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis // J. Clin. Microbiol. 1997. V. 35. P. 685 – 690.
32. Ruzic-Sabljic E., Maraspin V., Lotric-Furlan S. et al. Characterization of *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains isolated from human material in Slovenia // Wien Klin. Wochenschr. 2002. V. 114. P. 544 – 550.
33. Ruzic-Sabljic E., Strle F., Cimperman J. et al. Characterization of *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains isolated from patients with skin manifestations of Lyme borreliosis residing in Slovenia // J. Med. Microbiol. 2000. V. 49. P. 47 – 53.
34. Santino I., Berlutti F., Pantanella F. et al. Detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* DNA by PCR in serum of patients with clinical symptoms of Lyme borreliosis // FEMS Microbiol. Lett. 2008. V. 283. P. 30 – 35.
35. Schmidt B.L. PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections // Clin. Microbiol. Rev. 1997. V. 10. P. 185 – 201.
36. Swanson J., Neitzel D., Reed K.D. et al. Coinfections acquired from *Ixodes* ticks // Clin. Microbiol. Rev. 2006. V. 19. P. 708 – 727.
37. Tylewska-Wierzbanska S., Chmielewski T. Limitation of serological testing for Lyme borreliosis: evaluation of ELISA and western blot in comparison with PCR and culture methods // Wien. Klin. Wochenschr. 2002. V. 114. P. 601 – 605.
38. Wallach F.R., Forni A.L., Hariprasad J. et al. Circulating *Borrelia burgdorferi* in patients with acute Lyme disease: results of blood cultures and serum DNA analysis // J. Infect. Dis. 1993. V. 168. P. 1541 – 1543.
39. Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis // FEMS Microbiol. 2007. V. 49. P. 13 – 21.
40. Wormser G.P. Hematogenous dissemination in early Lyme disease // Wien. Klin. Wochenschr. 2006. V. 118. P. 634 – 637.
41. Zore A., Ruzic-Sabljic E., Maraspin V. et al. Sensitivity of culture and polymerase chain reaction for the etiologic diagnosis of erythema migrans // Wien. Klin. Wochenschr. 2002. V. 114. P. 606 – 609.