

THE INFLUENCE OF PREPARATION,
DERIVED FROM *GALEGA OFFICINALIS* L.
EXTRACT, ON HEMATOLOGICAL INDICES
OF RATS PERIPHERAL BLOOD UNDER
THE EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

M.R. Khokhla, G.Ya. Kleveta, Ya.P. Chajka,
M.I. Skybitska, N.O. Sybirna

The article contains data on the influence of preparation, derived from *Galega officinalis* L. extract, on hematological indices of rats peripheral blood under the circumstance of experimental diabetes mellitus. It was shown that the development of experimental diabetes is accompanied by increasing platelet count, fetal hemoglobin content and negative moves in differential blood count. Admission of *Galega officinalis* medicine leads to the decrease of platelet count and fetal hemoglobin content and the normalization of white blood cell differential count, indicating the activation of protective mechanisms of the body.

УДК 579.887.9:616.37-078

С.І. Похил, О.М. Тимченко,
Л.В. Килипко, Є.І. Семеренська,
С.В. Шагун, Л.С. Каптелов

РОЗРОБКА МЕТОДУ ГНІЗДОВОЇ
ДВОРАУНДОВОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ
ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ
ЗБУДНИКІВ АНАПЛАЗМОЗНОЇ
ТА ЕРЛІХІОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

ДУ "Інститут мікробіології та імунології
імені І.І. Мечникова АМН України", лабораторія
нових та маловивчених інфекційних захворювань,
ТОВ "БіоАналітичні технології", м. Харків, Україна

Анаплазмозна (AI), ерліхіозна інфекції (EI) — група трансмісивних (кліщових) інфекційних захворювань людей та ссавців, що викликаються облігатними внутрішньоклітинними патогенами — бактеріями родів *Anaplasma* і *Ehrlichia* (відповідно), характеризуються розвитком синдрому загальної інфекційної інтоксикації та специфічним ураженням білих клітин крові (гранулоцитів, моноцитів), макрофагів, еритроцитів, тромбоцитів, ендотелію судин та клітин органів кровотворення та лімфопоезу (селезінки, печінки, кісткового мозку, лімфовузлів) [1, 2, 6].

Так як анаплазми і ерліхії ще відносно мало вивчені, класифікація цих мікроорганізмів постійно змінюється. В цей час роди *Anaplasma* і *Ehrlichia* входять до родини *Anaplasmataceae*, порядку *Rickettsiales*, класу α (Alpha) *Proteobacteria*, типу *Proteobacteria* [6]. Рід *Anaplasma* налічує три

види: *A. marginale*, *A. platys* та *A. phagocytophilum*, останній із яких є збудником гранулоцитарного анаплазмозу людини (ГАЛ) [1, 5, 6]. До роду *Ehrlichia* включено шість видів: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, *E. ruminatum* та *E. risticii*, серед яких основну роль у захворюванні людей відіграють види *E. chaffeensis* (збудник моноцитарного ерліхіозу людини, МЕЛ, що домінує в США) і *E. muris* (збудник МЕЛ і рідше гранулоцитарного ерліхіозу людини, ГЕЛ, який домінує в країнах Європи) [3, 5, 6, 8, 14].

Робоча група по вивченню *Rickettsia*, *Coxiella*, *Anaplasma* (*Ehrlichia*) і *Bartonella* (EVWOG) Європейського товариства з клінічної мікробіології та інфекційних хвороб рекомендувала основні (безсумнівні) та допоміжні (ймовірні) критерії для найбільш широко застосовуваних методів лабораторної діагностики ГАЛ, МЕЛ і ГЕЛ: виявлення специфічних інтрацитоплазматичних мікроколоній (морул) збудника в клітинах-мішенях з допомогою світлової мікроскопії; виділення штамів збудника шляхом вирощування на спеціальних культурах еукаріотичних клітин; виявлення в зразках клінічного матеріалу антигену збудника та (або) визначення рівня антитіл проти збудника в сироватці крові з допомогою імунологічних (серологічних) методів; індикація специфічних фрагментів геному збудника з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [2]. ПЛР метод лабораторної діагностики AI та EI має ряд переваг над іншими методами і знайшов широке практичне застосування, при цьому авторами [7, 10–12] запропоновано різні варіанти (формати) відтворення ПЛР: стандартний, з гарячим стартом, гніздовий, в реальному часі, мультіплексний, з реверсною транскрипцією та інші.

Мета даної роботи — розробити і випробувати новий варіант гніздової двораундової (ГД) ПЛР, застосування якої для дослідження біологічного матеріалу різного походження дозволяло б на першому етапі відтворення (раунді) реакції синхронізовано (одночасно) виявляти всіх представників родів *Anaplasma* і *Ehrlichia*, а в другому раунді ГД ПЛР — здійснювати детекцію клінічно найбільш значущих збудників AI (*A. phagocytophilum*) та EI (*E. chaffeensis*, *E. muris*).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

При відтворенні ГД ПЛР з метою детекції в зразках біологічного матеріалу різного походження групо- і видоспецифічних фрагментів геному

Характеристика систем праймерів для детекції збудників анаплазмозної та ерліхіозної інфекції методом гніздової двораундової полімеразної лінцюгової реакції

Система праймерів	Межі специфічної детекції збудників АІ та ЕІ	Локус (ген ампліфікації)	Розмір амплікону (п. н.)	Літературне джерело
EC12A 5'TGATCCTGGGCTCAGAACGAACG3' EC9 5'TACCTTGTTACGACTT3'	Всі види родів <i>Anaplasma</i> і <i>Ehrlichia</i>	16SpPHK	1446–1462	[9, 11, 12]
Ehr	<i>E. chaffeensis</i> + <i>A. phagocytophilum</i>	16SpPHK	337	[10]
Eph	<i>A. phagocytophilum</i>	16SpPHK	227	[10]
Emu	<i>E. muris</i>	16SpPHK	223	[10]

Примітка: п. н. — пар нуклеотидів ДНК.

бактерій родів *Anaplasma* та *Ehrlichia* застосовували систему праймерів (СП) EC12A+EC9, синтезовану на наше замовлення в науково-виробничій фірмі “Литех” (м. Москва, РФ) і комерційні набори реагентів та СП фірми “IsoGene Lab. ltd.” (м. Москва, РФ): Diatom®DNA Prep 100, Gene Pak®DNA PCR Core, Gene Pak®PCR test: E 2048 (включає СП Ehr), E2136 (включає СП Eph) і E 2138 (включає СП Emu) (табл. 1).

Перший раунд ГД ПЛР проводився за протоколом стандартного формату ПЛР із використанням СП EC12A + EC9 (рис.) та наборів реагентів серії Gene Pak®DNA PCR Core [9, 12]. При умові отримання позитивного результату першого раунду реакції (виявлення ампліфікації великорозмірного групоспецифічного амплікону гену 16SpPHK бактерій родів *Anaplasma* та *Ehrlichia*) проводився другий раунд ГД ПЛР із використанням наборів реагентів серії Gene Pak®DNA PCR test, що містять СП Ehr, Eph і Emu для детекції видоспецифічних фрагментів гену 16SpPHK *E. chaffeensis* + *A. phagocytophilum*, *A. phagocytophilum* та *E. muris*, відповідно [10].

Відмінність протоколу другого раунду реакції від стандартного формату ПЛР полягала у тому,

що у пробірці “Мастер Микс” (із реагентами для ПЛР) вносили не 5 мкл зразку виділеної із досліджуваного біологічного матеріалу ДНК, а 1 мкл продукту ампліфікації першого раунду реакції та 4 мкл стерильної бідистильованої води для відновлення визначеного об'єму реакції. Крім того, в другому раунді ГД ПЛР ампліфікацію специфічних локусів збудників АІ та ЕІ здійснювали впродовж сорока циклів із дотриманням температурного і часового режиму проміжних циклів ампліфікації, рекомендованих [10] при використанні СП Ehr, Eph та Emu (табл. 2).

Візуалізацію продуктів ампліфікації після відтворення першого і другого раундів ГД ПЛР здійснювали методом електрофорезу в агоразному гелі з використанням “Комплекту реактивів для детекції ДНК” фірми “IsoGene Lab.ltd.”. При цьому, за результатами електрофорезу продуктів ампліфікації визначали: на треку контрольного позитивного зразку (К+) наявність флюоресцюючої смуги ДНК — амплікону чітко визначеного розміру, що є характерним для кожної використаної СП (табл. 1); на треку контрольного негативного зразку (К–) — відсутність амплікону визначеного розміру; позитивний результат ГД

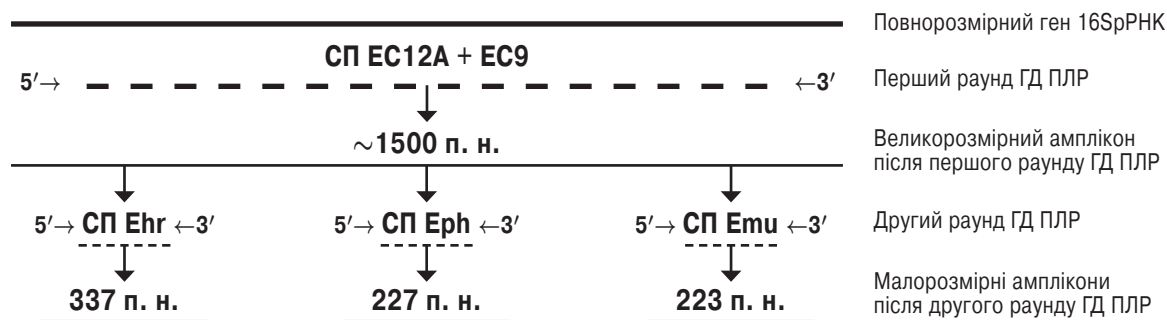


Рис. 1. Схема відтворення гніздової двораундової полімеразної лінцюгової реакції для детекції груп- і видоспецифічних фрагментів геному збудників АІ та ЕІ

Режим ампліфікації (контроль температури блок матриця) специфічних локусів гену 16SpPНК ДНК бактерій родів *Anaplasma* і *Ehrlichia* при відтворенні гніздової двораундової полімеразної лінцюгової реакції

Система праймерів	Температура і тривалість етапів циклу					
	t, °C	тривалість	t, °C	тривалість	t, °C	тривалість
ЕС12А + ЕС9	перший цикл		33 проміжних цикли		останній цикл	
	94	1 хв	88	1 хв	88	1 хв
	48	2 хв	52	2 хв	52	2 хв
	70	1 хв 30 с	70	1 хв 30 с	68	5 хв
Ehr, Eph, Emu	перший цикл		38 проміжних циклів		останній цикл	
	95	1 хв	95	1 хв	95	1 хв
	58	40 с	58	40 с	58	40 с
	74	1 хв	74	1 хв	74	2 хв

ПЛР при дослідженні зразків біологічного матеріалу різного походження за умови наявності на треках смуг амплікону з розміром, ідентичним розміру амплікону на треку К⁺; негативний результат ГД ПЛР — за умови відсутності на треках смуг амплікону будь-якого розміру або при наявності амплікону (чи декількох ампліконів), розмір якого (яких) відрізняється від розміру амплікону на треку К⁺; сумнівний результат ГД ПЛР — за умови наявності на треку слабо вираженого амплікону з розміром, ідентичним розміру амплікону на треку К⁺. Тривалість відтворення ГД ПЛР із процедурами візуалізації та аналізу отриманих результатів становить 7–8 годин.

Враховуючи, що основні характеристики методу ГД ПЛР — такі як межа чутливості, рівень специфічності та відтворюваності результатів досліджень визначаються результативністю першого раунду реакції з використанням синтезованої СП ЕС12А + ЕС9, було проведено експерименти з використанням модельних (штучно створених) зразків для емпіричного встановлення значень (величин) цих характеристик. При цьому, методом ПЛР із СП ЕС12А + ЕС9 в трьох повторях протестовано 30 модельних зразків, що мали таке походження: 12 — суспензії (в ізотонічному розчині хлориду натрію — ІТХН та в крові клінічно здорових людей, донорів крові) бактерійних клітин (б. к.) родини *Anaplasmataceae* (штам *A. marginale* ВІЕВ 1) із концентрацією від $(6,9 \pm 3,8) \cdot 10^6$ до $(9,4 \pm 5,1) \cdot 10^1$ б. к./мл; 9 — суспензії (в ІТХН) б. к. гетерологічних по відношенню до вказаної родини видів мікроорганізмів, але філогенетично найбільш близьких та тих видів, що є збудниками кліщових бактеріальних інфекцій (*Rickettsia prowazekii*, *R. sibirica*, *Brucella abortus*, *Bartonella*

henselae, *B. quintana*, *Borrelia afzelii*, *B. garinii*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*) із концентрацією не нижче $(1-10) \cdot 10^6$ б. к./мл; 3 — зразки крові клінічно здорових людей (донорів крові); 3 — зразки інтактних клітин лінії HL-60; 3 — зразки клітин перитонеальної порожнини інтактних лабораторних тварин (білих нелінійних лабораторних мишей). Крім того, ГД ПЛР було апробовано при цілеспрямованому дослідженні 44 зразків біологічного матеріалу різного походження, що потенційно могли містити збудники АІ та ЕІ: 7 — крові пацієнтів укушених кліщем із клінічною картиною захворювання подібною на АІ та ЕІ; 8 — гомогенатів іксодових кліщів (виготовлених із 73 імаго родів *Ixodes* і *Dermacentor*); 15 — клітин лінії HL-60, інфікованих кров'ю пацієнтів укушених кліщем та гомогенатами кліщів із метою вирощування анаплазм і ерліхій; 14 — клітин перитонеальної порожнини лабораторних тварин, інтраперитонеально інфікованих гомогенатами кліщів для відтворення експериментальної АІ та ЕІ.

Статистична обробка результатів досліджень здійснювалась як викладено у посібнику [4].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При тестуванні модельних зразків (суспензій) із різною концентрацією б. к. штаму *A. marginale* ВІЕВ 1 методом ПЛР при використанні СП ЕС12А + ЕС9 в усіх випадках був отриманий позитивний результат реакції як для суспензійної модельної системи ІТХН + б. к. *A. marginale*, так і для суспензійної модельної системи кров + б. к. *A. marginale*. А рівень відтворюваності результатів цих експериментів становив $(94,6 \pm 5,4)\%$. При цьому слід зазначити, що при візуалізації

продуктів ампліфікації, які утворювались при ПЛР-тестуванні обох цих типів модельних систем виявляли як чітко виражені смуги основного специфічного амплікону (~1500 п. н.), так і додаткові смуги з нечіткими межами, більш слабкою флюоресценцією та із відмінною довжиною треку у порівнянні із аналогічними характеристиками вказаного амплікону.

Високу специфічність СП ЕС12А + ЕС9, що застосовується при першому раунді ГД ПЛР підтверджено негативними результатами (100%) реакції при тестуванні всіх модельних суспензійних систем, які включали гетерологічні по відношенню до родини *Anaplasmataceae* види бактерій (*R. prowazekii*, *R. sibirica*, *B. abortus*, *B. henselae*, *B. quintana*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *F. tularensis*, *C. burnetii*); а також, зразки крові донорів, інтактних клітин лінії HL-60 та клітин перитонеальної порожнини інтактних лабораторних тварин. Додатково викладене вище положення підтверджують і негативні результати другого раунду ГД ПЛР, які було отримано при використанні комерційних видоспецифічних СП Ehr, Eph і Emu за умови, що як ДНК-мішені для останніх слугували великорозмірний амплікон гену 16SpPНК *A. marginale*, синтезований в першому раунді реакції.

Отримані нами результати ПЛР-тестування модельних суспензійних систем із використанням СП ЕС12А + ЕС9 є досить близькими до даних зарубіжних авторів [5, 7, 11–13] щодо ефективності виявлення збудників АІ та ЕІ в зразках біологічного матеріалу методом ПЛР. Виключення становить визначений нами вищий (100%) рівень специфічності цього методу у порівнянні із вказаним (85–90%) у публікаціях [5, 13], що може бути

результатом тестування в наших умовах відносно невеликої групи модельних суспензійних систем із гетерологічними (по відношенню до родини *Anaplasmataceae*) видами бактерій.

Крім того, ефективність використання розробленої ГД ПЛР для детекції збудників АІ та ЕІ підтвердили результати досліджень зразків біологічного матеріалу різного природного походження, які потенційно могли містити вказані патогени (табл. 3). В цілому, при дослідженні 44 зразків різного біологічного матеріалу позитивний результат першого раунду ГД ПЛР із використанням СП ЕС9 + ЕС12А було зафіксовано у 45,5% випадків, а у другому раунді реакції — у 22,7% випадків із СП Ehr і Eph та у 2,3% випадків із СП Emu.

Так як позитивні результати ГД ПЛР із СП Ehr і Eph отримано при дослідженні одних і тих самих зразків біологічного матеріалу, цілком вірогідним є висновок, що в другому раунді реакції використання обох вказаних СП дозволило детектувати в 22,7% цих зразків збудника АІ — *A. phagocytophilum*. В одному зразку гомогенату іксодових кліщів паралельно із виявленням *A. phagocytophilum* було виявлено (в другому раунді ГД ПЛР із СП Emu) *E. muris* — збудника ЕІ (МЕЛ і ГЕЛ). Слід зазначити, що відтворення другого раунду ГД ПЛР із використанням представлених на ринку України комерційних ПЛР наборів Ehr, Eph, Emu фірми “IsoGene Lab. Ltd.” для детекції клінічно найбільш значущих збудників АІ (*A. phagocytophilum*) та ЕІ (*E. chaffeensis*, *E. muris*) забезпечує отримання достатньо чітких результатів дослідження.

Важливе теоретичне і практичне значення мають отримані нами данні щодо перевищення

Таблиця 3

Результати детекції збудників анаплазмозної та ерліхіозної інфекції у зразках біологічного матеріалу різного походження методом гніздової двораундової полімеразної ланцюгової реакції

Походження досліджених зразків	Кількість досліджених зразків	Позитивний результат ПЛР із системою праймерів, абс. ч. (%)			
		ЕС9 + ЕС12А	Ehr	Eph	Emu
Кров пацієнтів укушених кліщем	7	1 (14,3)	1 (14,3)	1 (14,3)	0
Гомогенати іксодових кліщів	8	4 (50,0)	2 (25,0)	2 (25,0)	1 (12,5)
Клітини лінії HL-60 інфіковані кров'ю пацієнтів укушених кліщем та гомогенатами кліщів	15	4 (26,7)	4 (26,7)	4 (26,7)	0
Клітини перитонеальної порожнини лабораторних тварин інфікованих гомогенатами кліщів	14	11 (78,6)	3 (21,4)	3 (21,4)	0
Всього	44	20 (45,5)	10 (22,7)	10 (22,7)	1 (2,3)

майже у два рази частоти позитивних результатів першого раунду ГД ПЛР (із СП ЕС9 + ЕС12А) у порівнянні із аналогічним показником другого раунду реакції (із СП Ehr, Eph та Emu), що може свідчити про ймовірність контамінації зразків біологічного матеріалу не лише видами *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* і *E. muris*, а й іншими представниками родів *Anaplasma* і *Ehrlichia*. Методологія відтворення розробленої ГД ПЛР дозволяє доповнювати другий раунд реакції дослідженнями спрямованими на визначення більш широкого спектру збудників АІ та ЕІ.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено новий варіант ГД ПЛР для синхронізованого виявлення в зразках біологічного матеріалу різного походження клінічно найбільш значущих збудників АІ (*A. phagocytophilum*) та ЕІ (*E. chaffeensis*, *E. muris*).

2. Використання ГД ПЛР дозволяє впродовж 7–8 годин виявляти в зразках збудники АІ та ЕІ із межею чутливості близько 102 бактерійних клітин/мл, рівнями специфічності і відтворюваності результатів досліджень близько (95±5)%.

3. Ефективність використання ГД ПЛР підтверджено на основі повного збігу теоретично прогнозованих (завідомо позитивних і негативних) результатів та фактичних результатів експериментів, отриманих при тестуванні 30 модельних зразків, які були штучно контаміновані різними видами бактерій або представляли собою інтактний біологічний матеріал. Крім того, застосування ГД ПЛР при дослідженні 44 зразків біологічного матеріалу різного походження, що потенційно могли містити збудники АІ та ЕІ дозволило виявити *A. phagocytophilum* у 22,7%, а *E. muris* — у 2,3% цих зразків.

ЛІТЕРАТУРА

1. Васильева И.С. Новые болезни, передаваемые иксодовыми клещами (Ixodidae). Эрлихиозы и анаплазмозы человека [Электронный ресурс] / И.С. Васильева / Режим доступа: <http://lib.2005.rat-info.ru/files/>.
2. Гратиц Н. Трансмиссивные инфекционные заболевания в Европе. Их распространение и влияние на общественное здравоохранение [Текст] / Н. Гратиц; пер. с англ. // ВОЗ. — 2005. — 130 с. — С. 87–118.
3. Коренберг Э.И. Эрлихиоз — новая трансмиссивная инфекция [Текст] / Э.И. Коренберг // Дезинфекционное дело. — 2000. — № 2. — С. 13–18.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия [Текст] / Г.Ф. Лакин. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.: ил.
5. Blanco J.R. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe [Text] / J.R. Blanco, J.A. Oteo // Clin. Microbiol. Infect. — 2002. — № 8. — P. 763–772.
6. Dumler J.S. Anaplasma and Ehrlichia infection [Text] / J.S. Dumler // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2005. — Vol. 1063. — P. 361–373.

7. Ehrlichia chaffeensis, a new species associated with human ehrlichiosis / B.E. Anderson, J.E. Dawson, D.C. Jones, K.Y. Wilson // J. Clin. Microbiol. — 1991. — Vol. 29, № 12. — P. 2838–2842.
8. Ehrlichiosis in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment [Text] / J.S. Dumler, J.E. Madigan, N. Pusterla, J.S. Bakken // Clin. Infect. Dis. — 2007. — Vol. 45, № 1. — P. S45–S51.
9. Gene Pak® DNA PCR Core. Сухой набор реагентов для PCR амплификации ДНК. Для исследовательского применения. Инструкция // ООО “Лаборатория Изоген”. — 2010. — 4 с.
10. Gene Pak® DNA PCR test. Набор реагентов для обнаружения ДНК возбудителей инфекционных заболеваний методом полимеразной цепной реакции. Инструкция // ООО “Лаборатория Изоген”. — 2010. — 14 с.
11. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease [Text] / S.M. Chen, J.S. Dumler, J.S. Bakken, D.H. Walker // J. Clin. Microbiol. — 1994. — Vol. 32, № 3. — P. 589–595.
12. Isolation and characterization of Ehrlichia chaffeensis strains from patients with fatal Ehrlichiosis [Text] / C.D. Paddock, J.W. Sumner, G.M. Shore, D.C. Bartley [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1997. — Vol. 35, № 10. — P. 2496–2502.
13. Massung R.F. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, Anaplasma phagocytophilum [Text] / R.F. Massung, K.G. Slater // J. Clin. Microbiol. — 2003. — Vol. 41, № 2. — P. 717–722.
14. Walker D.H. Human monocytic and granulocytic ehrlichiosis [Text] / D.H. Walker, J.S. Dumler // Arch Pathol. Lab. Med. — 1997. — Vol. 121. — P. 785–791.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ГНЕЗДОВОЙ ДВУРАУНДОВОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ АНАПЛАЗМОЗНОЙ И ЭРЛИХИОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

С.И. Похил, Е.Н. Тимченко, Л.В. Килипко, Е.И. Семеренская, С.В. Шагун, Л.С. Каптелов

Разработан новый вариант гнездовой двураундовой полимеразной цепной реакции (ГД ПЦР), использование которой позволяет синхронизированно детектировать клинически наиболее значимые виды возбудителей анаплазмоза (*A. phagocytophilum*) и эрлихиоза (*E. chaffeensis*, *E. muris*) с границей чувствительности около 10² бактериальных клеток/мл, уровнем специфичности и воспроизводимости результатов исследований около (95±5)%. При исследовании 44 образцов биологического материала различного происхождения методом ГД ПЦР было выявлено *A. phagocytophilum* и *E. muris* в 22,7% и в 2,3% этих образцов, соответственно.

DEVELOPMENT OF NESTED TWO-ROUND POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION ANAPLASMOSIS AND EHRLICHIOSIS AGENT

S.I. Pokhil, Ye.N. Timchenko, L.V. Kilipko, Ye.I. Semerenskaya, S.V. Shagun, L.S. Kaptelov

New variant is developed of nested two-round polymerase chain reaction (NTR PCR) which allows synchronizely detect clinically most significant species causing anaplasmosis (*A. phagocytophilum*) and ehrlichiosis (*E. chaffeensis*, *E. muris*) with range of sensitivity about 10² bacterial cell/ml, level of specificity and reproducibility of results of researches nearby 95±5%. 22,7% of *A. phagocytophilum* and 2,3% of *E. muris* was detected in 44 samples of biological material of various origin by NTR PCR method.