

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ *Anaplasma marginale*
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИС.Н. КОВАЛЬЧУК¹, Г.Ю. КОСОВСКИЙ¹, А.В. АРХИПОВ¹, Т.Т. ГЛАЗКО^{1, 2},
В.И. ГЛАЗКО^{1, 2}

Риккетсия *Anaplasma marginale* — возбудитель анаплазмоза крупного рогатого скота. Заболевание протекает с признаками анемии, лихорадки и потерей веса, вызывает аборт и снижение удойности у коров и во многих случаях приводит к гибели зараженных животных. *A. marginale* переносится клещами и кровососущими насекомыми. Анаплазмоз обычно диагностируется при микроскопическом исследовании мазков крови, окрашенных по Романовскому красителем Гимза, но этот метод ненадежен, если животное находится на ранних стадиях инфицирования. Широко используются серологические методы диагностики, однако они не позволяют дифференцировать *A. marginale* от других видов анаплазм. Подход, основанный на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, сочетает высокую специфичность анализа и возможность количественной оценки числа копий ДНК патогена в образце. Цель выполненного нами исследования — разработать метод дифференцированного выявления *A. marginale* в крови крупного рогатого скота с помощью ПЦР в реальном времени. В качестве мишени для амплификации был выбран однокопийный ген *msp4*. Msp4 — иммунодоминантный белок наружной мембраны всех известных на сегодняшний день риккетсий рода *Anaplasma*. Праймеры на основе гена *msp4* для филогенетического анализа *A. marginale* ранее были предложены J. de la Fuente с соавт. (2001), однако они не видоспецифичны. В результате анализа нуклеотидных последовательностей гена *msp4* разных изолятов *A. marginale* и близкородственных видов анаплазм, включая *A. ovis*, выявили характерные для *A. marginale* участки, на основе которых были разработаны видоспецифичные праймеры и флуоресцентно меченный зонд (MSP4-F 5'-CA-TGAGTCACGAAGTGGCT-3' и MSP4-R 5'-GGCACACT-CACATCAATC-3', MSP4-probe 5'-(Cy5)-AAGGGGGAGTAATGGGAGGTAGCT-3') для амплификации и детекции фрагмента гена *msp4* *A. marginale* длиной 177 п.н. методом ПЦР в реальном времени. Анализ амплифицированных нуклеотидных последовательностей показал, что они имеют 99-100 % идентичности с фрагментом гена *msp4* у разных изолятов *A. marginale*. При определении аналитической чувствительности ПЦР была сконструирована плаزمиды pGEM-*msp4* с фрагментом гена *msp4* длиной 177 п.н. и получены образцы, содержащие 10⁰-10⁷ копий *msp4*. Показано, что чувствительность метода позволяет выявлять от 10² копий гена *msp4* *A. marginale* в анализируемом объеме образца ДНК. Для испытания аналитической специфичности праймеров и зонда использовались образцы ДНК овец, зараженных риккетсиями *A. ovis*, а также ДНК коров, которые по результатам секвенирования содержали ДНК бактерий *Sanguibacter keddii*, *Propionibacterium acnes* и *Pseudomonas aeruginosa*. При этом роста флуоресценции, характерного для материала от зараженных *A. marginale* животных, и каких-либо продуктов ПЦР при электрофоретическом разделении не наблюдали. Таким образом, специфичность метода позволяет надежно дифференцировать *A. marginale* и *A. ovis*. Разработанный способ выявления *A. marginale* на основе амплификации и детекции фрагмента гена *msp4* с помощью ПЦР в реальном времени отличается от существующих аналогов высокой специфичностью, быстротой, а также возможностью количественной оценки бактериальной нагрузки. Метод может быть использован для оперативного дифференциального обнаружения и количественного определения *A. marginale* в образцах крови инфицированного крупного рогатого скота с целью подтверждения диагноза и при проведении эпидемиологического мониторинга анаплазмоза.

Ключевые слова: *Anaplasma marginale*, ген *msp4*, крупный рогатый скот, диагностика, ПЦР в реальном времени.

Анаплазмоз крупного рогатого скота (КРС) — трансмиссивное инфекционное заболевание, вызываемое риккетсиями рода *Anaplasma* (отряд *Rickettsiales*, семейство *Anaplasmataceae*). Анаплазмоз КРС широко распространен во всем мире и приводит к значительным экономическим потерям вследствие уменьшения мясомолочной продуктивности скота, ущерба от недополучения молодняка и гибели животных. Возбудитель анаплазмоза КРС — риккетсия вида *Anaplasma marginale*, облигатный внутриклеточный

паразит, поражающий эритроциты. Встречается также коинфекция КРС анаплазмами вида *A. ovis* (1). Источником возбудителя анаплазмоза служат инфицированные животные, переносчиками — около 20 видов клещей, а также кровососущие насекомые (2, 3). Кроме того, возможна механическая передача возбудителей от зараженных животных к здоровым через нестерильные инструменты при проведении зоотехнических мероприятий.

Анаплазмоз КРС, вызванный *A. marginale*, зафиксирован во многих тропических и субтропических странах, по всей территории США и Канады, а также в некоторых странах Европы, главным образом средиземноморских (4, 5). Это заболевание регистрируют на Украине, в Белоруссии, Молдавии, Казахстане, государствах Средней Азии и Закавказья. Согласно ветеринарной отчетности в РФ, по анаплазмозу неблагополучны субъекты Центрального, Северо-Западного и Приволжского федеральных округов (6).

В настоящее время для диагностики анаплазмоза применяют микроскопические и серологические методы, однако их чувствительность и специфичность недостаточно высоки. Результаты микроскопических исследований мазков крови ненадежны, особенно на ранних стадиях инфицирования и в случаях заболеваний, сопровождающихся тяжелой формой анемии (7, 8). Серологические методы, основанные на использовании антител к антигенам возбудителя анаплазмоза, имеют недостаточно высокую чувствительность и не позволяют дифференцировать *A. marginale* от других видов анаплазм (9-11). Преимущество ПЦР-диагностики заключается в высокой чувствительности и специфичности — она позволяет обнаружить возбудителя на самых ранних стадиях заболевания, в том числе в латентную фазу, и надежно дифференцировать анаплазмоз от ряда сходных по клиническим проявлениям патологий. Согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения животных (OIE, the World Organization for Animal Health) (<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>) ПЦР-диагностику *A. marginale* следует применять перед каждым перемещением животного на новое место и для подтверждения диагноза. Описаны разные методы ПЦР для детекции *A. marginale* (12-22), однако ни один из них не прошел полную валидацию.

Цель представленного исследования — разработка метода выявления *Anaplasma marginale* в крови крупного рогатого скота на основе ПЦР в реальном времени.

Методика. Для подбора праймеров использовали имеющиеся в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) последовательности гена *mSP4* разных изолятов *A. marginale*, а также *A. centrale*, *A. ovis* и *A. phagocytophilum*. Консервативные участки *mSP4*, которые могут послужить праймерами и зондом, выявляли, пользуясь ресурсом сервера ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, открытый доступ). Видоспецифичность праймеров и зонда оценивали, применяя алгоритм BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Анализируемые образцы ДНК выделяли из цельной крови естественно заразившихся животных — КРС с инфекцией *A. marginale*, а также *Sanguibacter keddiei*, *Propionibacterium acnes* и *Pseudomonas aeruginosa*, и овец, инфицированных *A. ovis*. Для этого использовали набор Sorb-M («Синтол», Россия) согласно рекомендациям производителя.

Реакцию амплификации проводили в режиме реального времени в смеси, содержащей 10 мкл реактива для ПЦР LightCycler® 480 Probes Master («Roche», Швейцария); праймер MSP4-F 5'-CATGAGTCACGA-AGTGGCT-3' (0,5 мкМ), праймер MSP4-R 5'-GGCACACTCACATCA-

АТС-3' (0,5 мкМ); флуоресцентно меченный зонд MSP4-probe 5'-(Cy5)-AAGGGGGAGTAATGGGAGGTAGCT-3' (0,1 мкМ); 3 мкл ДНК; общий объем реакционной смеси — 20 мкл. ПЦР выполняли на приборе LightCycler 96 («Roche», Швейцария) при следующих условиях: начальная денатурация в течение 2 мин при 95 °С; 45 циклов — 15 с при 95 °С, 15 с при 58 °С, 15 с при 72 °С. Сигнал флуоресценции снимали по каналу Cy5. Результаты ПЦР оценивали также методом электрофореза в 2 % агарозном геле.

Полученный в ПЦР фрагмент гена *msp4* длиной 177 п.н. очищали с помощью набора GeneJET PCR Purification Kit («Life Technologies», США), лигировали в вектор pGEM-T («Promega», США) и клонировали в клетках *Escherichia coli* DH5. Для выявления колоний трансформантов, содержащих плазмиду pGEM-*msp4*, проводили ПЦР с использованием пары стандартных праймеров для секвенирования M13 («Сибэнзим», Россия) с последующим анализом продуктов амплификации методом электрофореза в 2 % агарозном геле.

Целевые колонии инкубировали в течение ночи при 37 °С в 2 мл жидкой среды LB, содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Для очистки плазмидной ДНК использовали набор GeneJET Miniprep Kit («Thermo Fisher Scientific», США). Концентрацию плазмидной ДНК определяли с помощью набора PicoGreen® dsDNA Assay Kit («Thermo Fisher Scientific», США) на флуориметре QuantiFluor-ST («Promega», США). Секвенирование полученных плазмид pGEM-*msp4* проводили методом Сэнгера с использованием набора ABI Prism Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США) и генетического анализатора Applied Biosystems 3130 («Life Technologies», США). Для определения аналитической чувствительности ПЦР была выполнена серия 10-кратных разведений плазмиды pGEM-*msp4* и получены образцы, содержащие 10^0 - 10^7 копий гена *msp4*. Определение аналитической чувствительности ПЦР проводилось в трех повторностях.

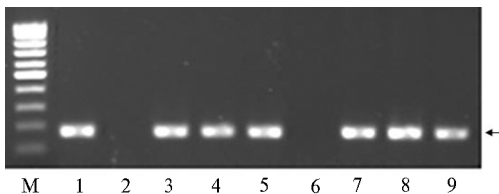


Рис. 1. Электрофоретическое разделение ДНК, полученной в результате ПЦР с использованием оригинальных праймеров (MSP4-F и MSP4-R) и ДНК, выделенной из крови инфицированных (1, 3-5, 7-9) и не инфицированных *Anaplasma marginale* (2, 6) коров: М — маркер размера фрагментов ДНК (100-1000 п.н., «Диалат Лтд.», Россия). Стрелкой отмечен фрагмент размером 177 п.н.

Результаты. В представленном исследовании были разработаны праймеры и зонд для амплификации и детекции фрагмента гена *msp4* (major surface protein 4) *A. marginale* методом ПЦР в реальном времени. Msp4 — иммунодоминантный белок наружной мембраны всех известных на сегодняшний день риккетсий рода *Anaplasma* (5, 23). Согласно результатам полногеномного секвенирования, у *A. marginale* *msp4* представлен одной копией (24). Праймеры

на основе гена *msp4* для филогенетического анализа *A. marginale* ранее были предложены J. de la Fuente с соавт. (13), однако они не видоспецифичны для этой анаплазмы, так как имеют 100 % идентичность с соответствующими участками гена *msp4* анаплазмы *A. ovis*, вследствие чего их нельзя использовать для дифференцирования двух этих патогенов. Также были предложены праймеры на основе *msp4* для дифференциального выявления *A. marginale* и *A. ovis* методом классической ПЦР с идентификацией продуктов амплификации посредством электрофореза в агарозном геле (17). Преимущество метода ПЦР в реальном времени перед классической

ПЦР заключается в том, что регистрация накопления ДНК происходит непосредственно в процессе ПЦР, то есть детекция результатов как дополнительный этап анализа отсутствует. Это значительно сокращает время исследования, а сочетание праймеров и видоспецифичного флуоресцентно меченного зонда повышает надежность правильной идентификации патогена.

Подобранные праймеры MSP4-F и MSP4-R были использованы для проведения ПЦР, в которой матрицей служила ДНК коров, инфицированных *A. marginale*, что подтвердили результаты проведенного нами ранее секвенирования фрагментов генома КРС (25), а также ПЦР с праймерами AmargMSP4Fw 5'-CTGAAGGGGGAGTAATGGG-3' и AmargMSP4Rev 5'-GGTAATAGCTGCCAGAGATTCC-3' к *msp4* у *A. marginale*, предложенными А. Тогина с соавт. (17). В результате ПЦР с разработанными нами праймерами MSP4-F и MSP4-R (рис. 1) были получены и секвенированы фрагменты ДНК длиной 177 п.н.

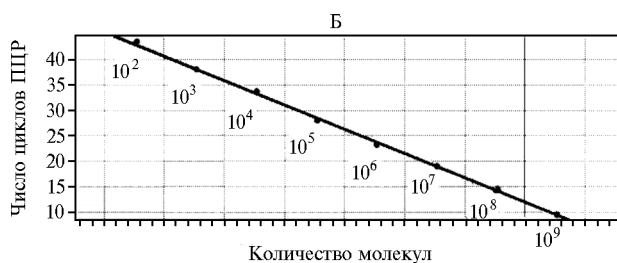
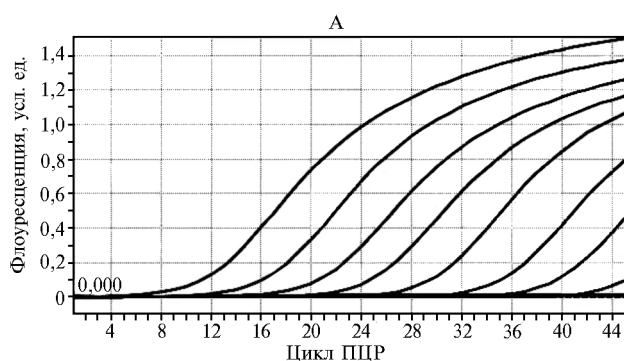


Рис. 2. Кривые изменения флуоресценции при ПЦР в реальном времени для последовательных 10-кратных разведений плазмиды rGEM-*msp4* (А) и оценка порога чувствительности (зависимость между необходимым числом циклов ПЦР и исходным числом копий гена *msp4* в реакционной смеси) (Б). Light-Cycler 96 («Roche», Швейцария; сигнал флуоресценции снимали по каналу Cy5).

были использованы для ПЦР в реальном времени. Во всех образцах ДНК инфицированных коров наблюдалось экспоненциальное нарастание флуоресценции.

Для испытания специфичности праймеров MSP4-F и MSP4-R и зонда MSP4-probe использовались образцы ДНК овец, зараженных риккетсиями *A. ovis*, что было установлено в результате ПЦР с праймерами AovisMSP4Fw 5'-TGAAGGGGAGCGGGGTCATGGG-3' и AovisMSP4Rev 5'-GAGTAATTGCAGCCAGGGACTCT-3' к гену *msp4* *A. ovis* (17), а также образцы ДНК коров, которые по результатам секвенирования (25) содержали ДНК бактерий *Sanguibacter keddiei*, *Propionibacterium acnes* и *Pseudomonas aeruginosa*. При ПЦР-анализе этих образцов ДНК в режиме реального времени не наблюдали роста флуоресценции, характерного для материала от зараженных *A. marginale* животных, а при электрофоретическом разделении какие-либо продукты ПЦР отсутствовали, что свидетельствует о видоспецифичности праймеров и зонда.

При определении аналитической чувствительности ПЦР была сконструирована плаزمида rGEM-*msp4* с фрагментом гена *msp4* длиной 177 п.н. (стандарт) и в результате серии последовательных 10-кратных разбавлений

стандарта получены образцы, содержащие 10^0 - 10^7 копий фрагмента гена *msp4*. Результаты ПЦР с этими образцами стандартов в качестве матрицы и разработанными нами праймерами и зондом показали, что чувствительность метода позволяет выявлять в исследуемом объеме образца 10^2 копий гена *msp4* и более (рис. 2), то есть, учитывая однокопийность этого гена (24), от 100 молекул ДНК *A. marginale*.

Следует отметить, что разработанный нами метод выявления *A. marginale* отличается от существующих аналогов (13, 17) высокой специфичностью, быстротой анализа, а также возможностью количественной оценки бактериальной нагрузки.

Таким образом, нами разработана пара праймеров и зонд к гену *msp4* для дифференциального выявления риккетсий вида *Anaplasma marginale* в крови крупного рогатого скота методом ПЦР в реальном времени. Чувствительность метода позволяет выявлять от 10^2 копий гена *msp4* *A. marginale* в анализируемом объеме образца ДНК, а специфичность достаточна для того, чтобы надежно дифференцировать *A. marginale* и *A. ovis*, то есть предложенный метод (в отличие от описанных в литературе) высокоспецифичен. Более того, он дает возможность количественно оценивать бактериальную нагрузку, при этом процедура требует меньшего времени. Поэтому его можно использовать в случае необходимости оперативного дифференциального обнаружения и количественного определения *A. marginale* в образцах крови инфицированного крупного рогатого скота с целью подтверждения диагноза и при проведении эпидемиологического мониторинга анаплазмоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kocan K.M., de la Fuente J., Blouin E.F., Coetzee J.F., Ewing S.A. The natural history of *Anaplasma marginale*. Vet. Parasitol., 2010, 167: 95-107 (doi: 10.1016/j.vetpar.2009.09.012).
2. Kocan K.M., de la Fuente J., Blouin E.F., Garcia-Garcia J.C. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. Parasitology, 2004, 129: 285-300 (doi: 10.1017/S0031182003004700).
3. Scoles G.A., Broce A.B., Lysyk T.J., Palmer G.H. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor Andersoni* (Acar: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). J. Med. Entomol., 2005, 42: 668-675 (doi: 10.1093/jmedent/42.4.668).
4. Guglielmo A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. Vet. Parasitol., 1995, 57: 109-119.
5. de la Fuente J., Lew A., Lutz H., Meli M.L., Hofmann-Lehmann R., Shkap V., Molad T. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. Anim. Health Res., 2005, 6: 75-89 (doi: 10.1079/AHR2005104).
6. Гулюкин М.И., Заблочный В.Т., Белименко В.В. Мониторинг эпизоотической ситуации по протозойным кровепаразитарным болезням домашних животных в Российской Федерации (2007-2012). Российский ветеринарный журнал СХЖ, 2013, 2: 36-40.
7. Noaman V., Shayan P. Comparison of Microscopy and PCR-RFLP for detection of *Anaplasma marginale* in carrier cattle. Iran. J. Microbiol., 2010, 2(2): 89-94.
8. Potgieter F.T., Stoltz W.H. Anaplasmosis. In: Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa /J.A.W. Coetzer, G.R. Thompson, R.C. Tustin (eds.). Oxford University Press, Cape Town, South Africa, 1994.
9. Dreher U.M., Fuente J., Hofmann-Lehmann R., Meli M.L., Pusterla N., Kocan K.M., Woldehiwet Z., Braun U., Regula G., Staerk K.D., Lutz H. Serologic crossreactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2005, 12: 1177-1183 (doi: 10.1128/CDLI.12.10.1177-1183.2005).
10. Al-Adhami B., Scandrett W.B., Lovanov V.A., Gajadhar A.A. Serological cross reactivity between *Anaplasma marginale* and *Ehrlichia* species in naturally and experimentally infected cattle. J. Vet. Diagn. Invest., 2011, 23: 1181-1188 (doi: 10.1177/1040638711425593).
11. Strik N.L., Alleman A.R., Barbet A.F., Sorenson H.L., Wamsley H.L., Gaschen F.P., Luckschander N., Wong S., Chu F., Foley J.E., Bjo-

- ersdorff A., Stuen S., Knowles D.P. Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* major surface protein 5 and the extent of its cross-reactivity with *A. marginale*. Clin. Vaccine Immunol., 2007, 14: 262-268 (doi: 10.1128/CVI.00320-06).
12. Torioni de Echaide S., Knowles D.P., McGuire T., Palmer G.H., Suarez C.E., McElwain T.F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using recombinant major surface protein 5. J. Clin. Microbiol., 1998, 36: 777-782.
 13. de la Fuente J., Van Den Bussche R.A., Kocan K.M. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). Vet. Parasitol., 2001, 97: 65-76 (doi: 10.1016/S0304-4017(01)00378-8).
 14. Carelli G., Decaro N., Lorusso A., Elia G., Lorusso E., Mari V., Ceci L., Buonavoglia C. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. Vet. Microbiol., 2007, 124: 107-114 (doi: 10.1016/j.vetmic.2007.03.022).
 15. Fyumagwa R.D., Simmler P., Meli M.L., Hoare R., Hofmann-Lehmann R., Lutz H. Prevalence of *Anaplasma marginale* in different tick species from Ngorongoro Crater, Tanzania. Vet. Parasitol., 2009, 161(1-2): 154-157 (doi: 10.1016/j.vetpar.2008.12.018).
 16. Picoloto G., Lima R.F., Olegário L.A.O., Carvalho C.M.E., Lacerda A.C.R., Tomás W.M., Borges P.A.L., Pellegrin A.O., Madruga C.R. Real-time polymerase chain reaction to diagnose *Anaplasma marginale* in cattle and deer (*Ozotoceros bezoarcticus leucogaster*) of the Brazilian Pantanal. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, 2010, 19(3): 186-188 (doi: 10.1590/S1984-29612010000300012).
 17. Torina A., Agnone A., Blanda V., Alongi A., D'Agostino R., Carrappa S., Marino A.M., Di Marco V., de la Fuente J. Development and validation of two PCR tests for the detection of and differentiation between *Anaplasma ovis* and *Anaplasma marginale*. Ticks and Tick-borne Diseases, 2012, 3(5-6): 283-287 (doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.10.033).
 18. Reinbold J.B., Coetzee J.F., Sirigireddy K.R., Ganta R.R. Detection of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in bovine peripheral blood samples by duplex real-time reverse transcriptase PCR assay. J. Clin. Microbiol., 2010, 48(7): 2424-2432 (doi: 10.1128/JCM.02405-09).
 19. Molad T., Mazuz M.L., Fleiderovitz L., Fish L., Savitsky I., Krigel Y., Leibovitz B., Molloy J., Jongejan F., Shkap V. Molecular and serological detection of *A. centrale*- and *A. marginale*-infected cattle grazing within an endemic area. Vet. Microbiol., 2006, 113: 55-62 (doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.026).
 20. Bilgiç H.B., Karagenc T., Simuunza M., Shiels B., Tait A., Eren H., Weir W. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* incattle. Exp. Parasitol., 2013, 133(2): 222-229 (doi: 10.1016/j.exppara.2012.11.005).
 21. Lew A.E., Bock R.E., Minchin C.M., Masaka S. A *msp1alpha* polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. Vet. Microbiol., 2002, 86: 325-333 (doi: 10.1016/S0378-1135(02)00017-2).
 22. Ybañez A.P., Sivakumar T., Ybañez R.H.D., Ratilla J.C., Perez Z.O., Gabotero S.R., Hakimi H., Kawazu S., Matsumoto K., Yokoyama N., Inokuma H. First molecular characterization of *Anaplasma marginale* in cattle and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in Cebu, Philippines. J. Vet. Med. Sci., 2013, 75: 27-36 (doi: 10.1292/jvms.12-0268).
 23. Vidotto M.C., McGuire T.C., McElwain T.F., Palmer G.H., Knowles D.P. Jr. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. Infect. Immunol., 1994, 62(7): 2940-2946.
 24. Brayton K.A., Kappmeyer L.S., Herndon D.R., Dark M.J., Tibbals D.L., Palmer G.H., McGuire T.C., Knowles D.P. Jr. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. PNAS USA, 2005, 102(3): 844-849 (doi: 10.1073/pnas.0406656102).
 25. Глазко В.И., Косовский Г.Ю., Ковальчук С.Н., Архипов А.В., Петрова И.О., Дедович Г.О., Глазко Т.Т. Инвертированный повтор микросателлита (AGC)₆G фланкирует районы ДНК с участками гомологии к ретротранспозонам в геноме крупного рогатого скота. Инновационные технологии в медицине, 2014, 2(03): 63-79.

¹ФГБНУ Центр экспериментальной эмбриологии
и репродуктивных биотехнологий,

127422 Россия, г. Москва, ул. Костякова, 12, стр. 4,
e-mail: s.n.kovalchuk@mail.ru, gkosovsky@mail.ru, batler51@yandex.ru,
tglazko@rambler.ru, vigvalery@gmail.com, info-ceerb@mail.ru;

²ФГБОУ ВПО Российский государственный
аграрный университет—МСХА им. К.А. Тимирязева,
127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49

Поступила в редакцию
14 августа 2015 года

DEVELOPMENT OF REAL-TIME PCR ASSAY FOR DETECTION OF *Anaplasma marginale*

S.N. Koval'chuk¹, G.Yu. Kosovskii¹, A.V. Arkhipov¹, T.T. Glazko^{1, 2}, V.I. Glazko^{1, 2}

¹Center for Experimental Embryology and Reproductive Biotechnology, Federal Agency of Scientific Organizations, 12/4, ul. Kostyakova, Moscow, 127422 Russia, e-mail s.n.kovalchuk@mail.ru, gkosovsky@mail.ru, batler51@yandex.ru, tglazko@rambler.ru, vglazko@yahoo.com, info-ceerb@mail.ru

²K.A. Timiryazev Russian State Agrarian University—Moscow Agrarian Academy, 49, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia

Received August 14, 2015

doi: 10.15389/agrobiology.2015.6.825eng

Abstract

Anaplasma marginale is a rickettsial pathogen responsible for bovine anaplasmosis, the acute disease in cattle herds which is associated with anemia, fever, rapid loss of milk production and weight, abortion, and, in some cases, death of the infected cattle. *Anaplasma marginale* is transmitted by ticks and biting insects. Diagnosis of bovine anaplasmosis is made by microscopic examination of blood smears stained with Giemsa stain, but this method is not useful to detect presymptomatic animals. Several serological tests have used extensively for epidemiological studies, but they do not discriminate between different *Anaplasma* species. A real-time polymerase chain reaction (PCR) combines high specificity with accurate measurement of DNA copy number and allows quantification of the targeted pathogen DNA. The goal of this study was to develop a real-time PCR assay for differential detection of *A. marginale* in the blood of cattle. The single-copy gene *msp4* was chosen as a target DNA for PCR. *Msp4* is a dominant immune protein of outer membrane of all *Anaplasma* known to date. The primers for phylogenetic analysis in *A. marginale* based on *msp4* were reported earlier by J. de la Fuente et al. (2001), but they were not species-specific. The analysis of *msp4* gene sequence of different *A. marginale* isolates and closely related species, including *A. ovis*, revealed species-specific areas, which were used for design of primers and TaqMan probe (MSP4-F 5'-CA-TGAGTCACGAAGTGGCT-3' and MSP4-R 5'-GGCACACT-CACATCAATC-3', MSP4-probe 5'-(Cy5)-AAGGGGGAGTAATGGGAGGTAGCT-3') for amplification and detection of 177 bp fragment of *msp4* gene by a real time PCR. In the amplified nucleotide sequences a 99 to 100 % homology to *msp4* fragments was found in different isolates of *A. marginale*. To assess analytical sensitivity of our PCR test, we used pGEM-*msp4*, a constructed recombinant plasmid with 177 bp fragment of *msp4* gene, diluted to obtain samples with 10^0 - 10^7 *msp4* copies. It was shown that the assay was able to detect as few as 10^2 of *A. marginale msp4* gene in the analyzed DNA sample. Analytical specificity of the developed primers and the MSP4-probe was proved in tests with DNA of sheep naturally infected by *A. ovis*, and also DNA isolated from cows with *Sanguibacter keddiei*, *Propionibacterium acnes* and *Pseudomonas aeruginosa* infection pre-detected by sequencing. In these samples no increased fluorescence characteristic of probes from animals infected by *A. marginale* was observed with no PCR products identified. Thus, the method specificity allowed to differ *A. marginale* and *A. ovis*. The developed method of *A. marginale* identification on the basis on amplification and detection of the *msp4* gene fragment using a real time PCR differed from known analogues with high sensitivity, rapidity and opportunity of quantitative evaluation of the bacterial load. The developed method could be used for rapid differential detection and quantification of *A. marginale* in blood samples from infected cattle for confirmation of anaplasmosis and epidemiological studies.

Keywords: *Anaplasma marginale*, *msp4* gene, cattle, diagnostics, a real-time PCR.

Книги издательства «Беларуская навука»:

Ковалев Н.А., Красочко П.А. **Вирусы и прионы в патологии животных и человека.** Минск: изд-во «Беларуская навука», 2012, 426 с. ISBN 978-985-08-1451-7.. 2013, 257 с. (ISBN 978-985-08-1614-6).

В книге на основании данных литературы и результатов многолетних собственных исследований дано общее представление о вирусах как биологических объектах и о их взаимодействии с организмом хозяина. Рассмотрены история изучения вирусов, их происхождение, природа, репродукция и классификация, патогенез вирусных инфекций, вирусный иммунитет, типы противовирусных вакцин и вакцин для профилактики бешенства и вирусных пневмонитов крупного рогатого скота, разработанных в Белорусском институте экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского. Дано описание новой формы патогенов — прионов: история их изучения, антигенная структура, устойчивость к физико-химическим факторам, клиническое проявление вызываемых ими заболеваний у животных, методы диагностики и профилактики этих заболеваний.