

УДК 619.616.993.192.6

DOI: 10.31016/1998-8435-2018-12-3-47-54

## Диагностика анаплазмоза крупного рогатого скота методом ПЦР в реальном времени

Анна Леонидовна Архипова<sup>1</sup>, Анна Владимировна Бабий<sup>2</sup>,  
Андрей Владимирович Архипов<sup>3</sup>, Светлана Николаевна Ковальчук<sup>4</sup>

<sup>1-4</sup> Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий, 127422, Москва, ул. Костякова, д. 12, стр. 4,  
e-mail: info-ceerb@mail.ru

Поступила в редакцию: 04.04.2018; принята в печать: 17.09.2018

### Аннотация

**Цель исследования:** разработка метода ПЦР в реальном времени для диагностики анаплазмоза крупного рогатого скота.

**Материалы и методы.** Для разработки праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для ПЦР в реальном времени были использованы имеющиеся в базе данных Генбанк (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) последовательности гена *msp1a* 57 изолятов *Anaplasma marginale*. Выявление консервативных участков гена *msp1a* проводили с помощью программы Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Специфичность праймеров и зонда была проверена *in silico* с использованием программы BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) экспериментально на образцах крови животных, инфицированных анаплазмами *A. ovis*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. phagocytophilum* и *A. platys*, и секвенированием ампликонов методом Сэнгера. Для оценки чувствительности метода была использована сконструированная нами плаزمиды pGEM-*msp1a*, содержащая фрагмент гена *msp1a* длиной 207 п.н.

**Результаты и обсуждение.** Разработан метод ПЦР в реальном времени для выявления возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота *A. marginale*. Были разработаны праймеры и флуоресцентно-меченый зонд для амплификации и детекции фрагмента гена *msp1a* длиной 207 п.н. и оптимизированы условия ПЦР. Чувствительность метода позволяет выявлять одну копию гена *msp1a* *A. marginale* в анализируемом образце ДНК. Специфичность метода позволяет дифференцировать *A. marginale* от других видов анаплазм (*A. ovis*, *A. bovis*, *A. centrale*, *A. phagocytophilum*, *A. platys*). Разработанный метод может быть использован для обнаружения и количественной оценки *A. marginale* в образцах крови инфицированных животных с целью подтверждения диагноза, а также при проведении эпизоотологического мониторинга анаплазмоза крупного рогатого скота.

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот; анаплазмоз; *Anaplasma marginale*; ПЦР в реальном времени.

**Для цитирования:** Архипова А. Л., Бабий А. В., Архипов А. В., Ковальчук С. Н. Диагностика анаплазмоза крупного рогатого скота методом ПЦР в реальном времени // Российский паразитологический журнал. 2018. Т. 12. № 3. С. 47–54.

DOI: 10.31016/1998-8435-2018-12-3-47-54

© Архипова А. Л., Бабий А. В., Архипов А. В., Ковальчук С. Н.

---

## Real-Time Diagnostics of Anaplasmosis in Cattle by PCR Method

Anna L. Arkhipova<sup>1</sup>, Anna V. Babiy<sup>2</sup>, Andrey V. Arkhipov<sup>3</sup>, Svetlana N. Kovalchuk<sup>4</sup>

<sup>1-4</sup> Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies 12, Kostyakova street, 4, Moscow, 127422,  
e-mail: info-ceerb@mail.ru

Received on: 04.04.2018; accepted for printing on: 17.09.2018

### Abstract

**The purpose of the research** is real-time development of PCR method for diagnostics of anaplasmosis in cattle.

**Materials and methods.** For real time development of primers and fluorescence-labeled probe for PCR *msp1a* gene sequences 57 isolates *Anaplasma marginale* available on database Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) were used. Conservative areas of *msp1a* gene were revealed with Clustal Omega programme (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Specificity of primers and probe were checked

experimentally *in silico* using BLASTN programme (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) on the animals' blood samples infected by *Anaplasma* *A. ovis*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. phagocytophilum* u *A. platys*, and sequence analysis of amplicon by Sanger's method. pGEM-*msp1a* plasmid designed by us containing *msp1a* gene fragment with a length of 207 bps was used to assess of sensitivity of the method.

**Results and discussion.** PCR method has been developed in real time mode to detect *A. marginale* anaplasmosis agent in cattle. Primers and fluorescence-labeled probe have been developed to amplify and detect *msp1a* gene fragment with a length of 207 bps and PCR conditions have been optimized. Sensitivity of the method allows to detect one copy of *msp1a* gene copy of *A. marginale* in analysed DNA sample. Specificity of method allows to differentiate *A. marginale* from other anaplasma types (*A. ovis*, *A. bovis*, *A. centrale*, *A. phagocytophilum*, *A. platys*). The developed method can be used to detect and assess *A. Marginale* quantitatively in blood samples of infected animals in order to prove the diagnosis as well as to perform epizootological monitoring of anaplasmosis in cattle.

**Keywords:** cattle; anaplasmosis; *Anaplasma marginale*; PCR in real time mode.

**For citation:** Arkhipova A. L., Babiy A. V., Arkhipov A. V., Kovalchuk S. N. Real-Time Diagnostics of Anaplasmosis in Cattle by PCR Method. *Rosiyskiy parazitologicheskii zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2018; 12(3):47–54. DOI: 10.31016/1998-8435-2018-12-3-47-54

## Введение

Анаплазмоз крупного рогатого скота (КРС) – трансмиссивное инфекционное заболевание, вызываемое риккетсиями *Anaplasma marginale* (отряд Rickettsiales, семейство Anaplasmatacea). Анаплазмоз КРС протекает с признаками лихорадки, анемии, атонии пищеварительного тракта и истощения. Источником возбудителя являются инфицированные животные, переносчиками – около 20 видов клещей и кровососущие насекомые [19]. Возможна также механическая передача возбудителя от зараженных животных к здоровым через нестерильные инструменты при проведении зоотехнических мероприятий.

Анаплазмоз КРС причиняет значительный экономический ущерб животноводческим хозяйствам вследствие потерь молочной и мясной продуктивности и гибели скота. Летальность при анаплазмозе КРС составляет от 10 до 100% в зависимости от географического региона и патогенности штамма [26]. По имеющимся оценкам, ежегодные экономические потери от анаплазмоза КРС только в США и Танзании составляют около 300 и 47,3 млн. долларов соответственно [18, 20]. Специальных исследований по определению экономического ущерба от анаплазмоза КРС в нашей стране проведено мало. По имеющимся предварительным оценкам, ежегодный экономический ущерб от снижения молочной продуктивности коров только в Калининградской области составляет свыше 2 млн. рублей [8].

Анаплазмоз КРС зарегистрирован во многих тропических и субтропических странах, распространен по всей территории США, а также в некоторых странах Европы, главным

образом средиземноморских [19]. В Российской Федерации за последние десятилетия значительно расширился нозоареал анаплазмоза КРС в первую очередь вследствие изменения ареала обитания клещей в условиях меняющегося климата [3]. Согласно ветеринарной отчетности, в Российской Федерации неблагополучными по анаплазмозу являются южные области России, Брянская, Калужская, Рязанская, Калининградская, Саратовская, Тверская, Тюменская, Владимирская, Нижегородская, Новосибирская и Ульяновская области, Алтайский край [2, 3]. Случаи заболевания КРС анаплазмозом были зарегистрированы на территории Московской области [5].

Исследований по определению уровня зараженности КРС возбудителем анаплазмоза в животноводческих хозяйствах РФ проведено немного. Согласно опубликованным данным, зараженность КРС анаплазмозом в животноводческих хозяйствах на юге Тюменской области составляет 21,4–56% [6], в Кадомском районе Рязанской области – 75–100% [7], в хозяйствах Московской области – 23,3–57,1% [5].

Решающую роль в предотвращении распространения анаплазмоза КРС играет современная диагностика. Многообразие клинических проявлений анаплазмоза затрудняет его диагностику. В Инструкции по борьбе с анаплазмозом крупного и мелкого рогатого скота (Утверждена Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 31 июля 1970 года) в качестве основных методов диагностики анаплазмоза КРС были рекомендованы микроскопические исследования мазков крови животных и серологические методы (РСК). Однако их чувствитель-

ность и специфичность недостаточно высоки. Результаты микроскопических исследований мазков крови, окрашенных по методу Романовского-Гимза, ненадежны на ранних стадиях инфицирования и в случаях заболеваний, сопровождающихся тяжелой формой анемии [19]. Серологические методы, основанные на использовании антител к антигенам возбудителя анаплазмоза, имеют недостаточно высокую чувствительность и не позволяют дифференцировать *A. marginale* от непатогенных для КРС видов анаплазм [15, 24].

Наиболее оперативную и точную диагностическую информацию позволяет получить выявление ДНК возбудителей анаплазмоза в крови КРС с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Преимуществом ПЦР-диагностики является высокая чувствительность и специфичность – она позволяет обнаружить возбудителя на самых ранних стадиях заболевания, в том числе и во время латентной фазы, и надежно дифференцировать анаплазмоз от ряда сходных по клиническим проявлениям заболеваний. ПЦР-диагностика также значительно сокращает время проведения анализа и трудозатраты, что повышает экономичность и производительность лабораторной диагностики анаплазмоза. Преимуществом метода ПЦР в реальном времени перед «классической» ПЦР заключается в том, что регистрация накопления ДНК происходит непосредственно в процессе ПЦР, т.е. детекция результатов методом электрофореза в агарозном геле как дополнительный этап анализа отсутствует. Это значительно сокращает время исследования, а использование помимо праймеров видоспецифичного флуоресцентно-меченого зонда повышает надежность правильной идентификации патогена. ПЦР в реальном времени позволяет также проводить оценку уровня паразитемии у зараженных животных.

На сегодняшний день на российском рынке отсутствуют коммерческие тест-системы на основе ПЦР для выявления возбудителя анаплазмоза КРС, поэтому проблема их создания остается актуальной.

Цель исследования – разработка метода ПЦР в реальном времени для диагностики анаплазмоза КРС.

## Материалы и методы

ДНК выделяли из цельной крови КРС ( $n = 42$ ) с помощью набора Sorb-M (Синтол, Россия) согласно рекомендациям производителя. Выявление животных, инфицированных *A. marginale*, проводили с использованием методики ПЦР, предложенной Torina с соавт. [25].

Для подбора праймеров к гену *msp1a* были использованы имеющиеся в базе данных Генбанка (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) полноразмерные последовательности гена *msp1a* из 57 изолятов *A. marginale*. Выявление консервативных участков *msp1a* для подбора праймеров проводили с помощью программы Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Видоспецифичность праймеров была проверена *in silico* с использованием программы BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Реакцию амплификации проводили в 10 мкл смеси, содержащей 5 мкл реактива для ПЦР LightCycler® 480 Probes Master («Roche», Швейцария), праймер MSP1a-F 5'-TGTTTGG AACCTAGGCTTATAG-3' (0,5 мкМ), праймер MSP1a-R 5'-CTTCTGCTGATCTTCTGTCTC-3, (0,5 мкМ), флуоресцентно-меченый зонд MSP1a-probe 5'-(VIC)CGCTGATTTGGGGCTGCCTGGCACT(BHQ2)-3' (0,1 мкМ), 30 нг ДНК. ПЦР проводили с помощью прибора LightCycler 96 («Roche», Швейцария) при следующих условиях: начальная денатурация в течение 2 мин при 95°C; последующие 40 циклов амплификации (денатурация при 95°C в течение 15 с, отжиг праймеров при 60°C в течение 15 с, элонгация при 72°C в течение 15 с). Результаты ПЦР оценивали по нарастанию флуоресценции по каналу VIC и методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Полученный в результате ПЦР фрагмент гена *msp1a* длиной 207 п.н. был очищен с помощью набора GeneJET PCR Purification Kit (Life technologies, USA), лигирован в вектор pGEM-T (Promega, США) и клонирован в клетках *E. coli* DH5α. Поиск колоний *E. coli* DH5α, содержащих плазмиду pGEM-*msp1a*, проводили методом ПЦР с использованием пары стандартных праймеров M13 (Сибэнзим, Россия) с последующим анализом результатов ПЦР электрофорезом в 1,2%-ном агарозном геле. Целевые колонии наращивали в течение ночи при 37°C в 2 мл среды LB, содержащей ампициллин в концентрации 100

мкг/мл. Очистку плазмидной ДНК проводили с использованием набора GeneJET Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Оценку концентрации плазмидной ДНК проводили с помощью набора PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием флуориметра QuantiFluor-ST (Promega, США). Секвенирование полученных плазмид рGEM-*msp1a* проводили методом Сэнгера («Евроген», Москва).

Для определения аналитической чувствительности ПЦР была построена стандартная кривая. Для этого была выполнена серия десятикратных разведений плазмиды рGEM-*msp1a*, и получены образцы, содержащие  $10^0$ – $10^6$  копий гена *msp4*, которые были использованы в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени с использованием разработанных нами праймеров и флуоресцентно-меченого зонда.

Для оценки специфичности метода использовали ДНК, выделенную из крови животных, инфицированных анаплазмами *A. ovis*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. phagocytophilum* и *A. platys*. Инфицированных животных выявляли с помощью методов, предложенных Torina [25], Decaro [14], Kawahara [17], de la Fuente [13] и Inokuma [17]. Образцы крови животных, инфицированных *A. platys* и *A. phagocytophilum*, были предоставлены Е. В. Радюк (Ветеринарная клиника «Свой доктор», Москва).

### Результаты и обсуждение

Нами разработан метод ПЦР в реальном времени для диагностики анаплазмоза КРС. На сегодняшний день известно несколько методов на основе ПЦР для выявления *A. marginale*, однако, ни один из них не лишен недостатков, которые связаны с выбором мишени для ПЦР и способа получения и анализа результатов. В методе, предложенном Reinbold с соавт. [23], используются праймеры и зонд к гену 16S рРНК. Недостатком данного метода является необходимость дополнительной стадии подготовки образца для ПЦР – реакции обратной транскрипции. Такой подход является достаточно трудоемким и приводит к значительному увеличению как времени, так и стоимости анализа. В двух других тест-системах для детекции *A. marginale* в качестве мишени был выбран ген *msp5* [21, 22]. Недостатком этих методов является ис-

пользование неспецифической системы детекции продуктов ПЦР с помощью интеркалирующего красителя SYBR Green I, который связывается с любой двухцепочечной ДНК, включая димеры праймеров, что может приводить к ложноположительным результатам. Мишенью для метода, предложенного Carelli с соавт. [12], был ген *msp1*. Однако геном *A. marginale* содержит две полноразмерные и три укороченные копии гена *msp1β* [11], поэтому данный метод не может быть использован для точной оценки паразитемии у животных, инфицированных *A. marginale*. Известен метод на основе четырех праймеров к гену *groEL* [27], недостатком которого является необходимость постановки двух последовательных реакций амплификации, что приводит к значительному увеличению времени анализа. В методах, предложенных Torina [25], Bilgiç [10], Самуйленко [9], анализ результатов ПЦР проводится методом электрофореза в агарозном геле, что увеличивает время проведения исследования по сравнению с ПЦР в режиме реального времени.

В нашем исследовании в качестве мишени для ПЦР использован высоко консервативный фрагмент гена *msp1a* *A. marginale* и флуоресцентно-меченый зонд, что увеличивает надежность и специфичность диагностики и уменьшает время проведения анализа (до 2 ч, не включая этап выделения ДНК). Ген *msp1a* представлен в геноме *A. marginale* в одной копии [11], что делает его подходящим для точной оценки паразитемии.

Подобранные праймеры MSP1a-F и MSP1a-R и флуоресцентно-меченый зонд были использованы в ПЦР в режиме реального времени, в которой в качестве матрицы использовалась ДНК коров, инфицированных *A. marginale*, обнаруженных нами с помощью метода, предложенного Torino [25]. Были подобраны оптимальные условия для амплификации и детекции фрагмента гена *msp1a* длиной 207 п.н. Во всех образцах ДНК инфицированных коров наблюдалось экспоненциальное нарастание флуоресценции (рис. 1). Секвенирование полученных ампликонов показало, что они имеют 99–100% идентичности с соответствующими фрагментами гена *msp1a* из базы банных Генбанк. Из 42 исследованных образцов 24 коровы (57,1%) оказались анаплазманосителями.

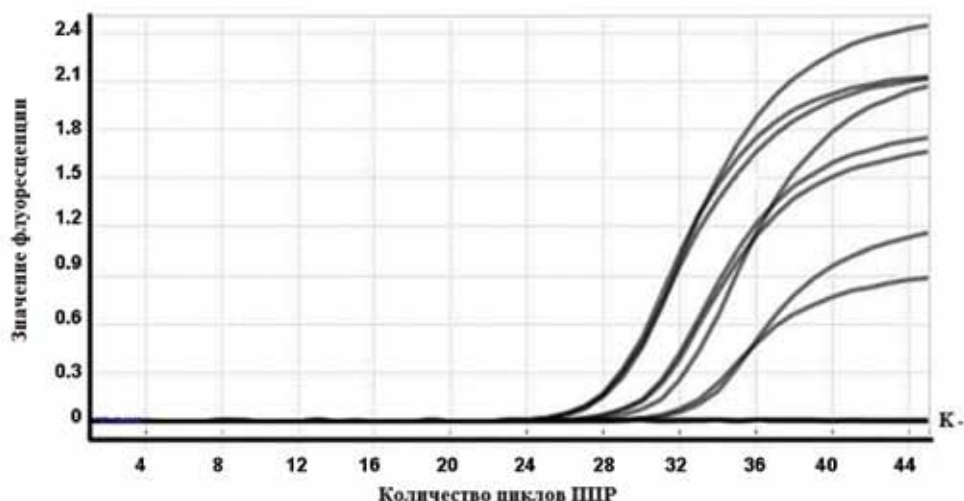


Рис. 1. Динамика накопления амплифицированных фрагментов гена *msp1a* *A. marginale* в ходе ПЦР в режиме реального времени для образцов ДНК, выделенной из крови зараженных животных: К- – отрицательный контроль; ось ординат – уровень флуоресценции; ось абсцисс – число циклов ПЦР

Для испытания аналитической специфичности праймеров и зонда использовали образцы ДНК животных, зараженных риккетсиями *A. ovis*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. phagocytophilum* и *A. platys*. Анализ результатов ПЦР в режиме реального времени с этими образцами ДНК показал отсутствие роста флуоресценции, характерного для образцов ДНК из крови зараженных *A. marginale* животных, и отсутствие каких-либо продуктов ПЦР при анализе результатов методом электрофореза в 1,2%-ном агарозном геле, что свидетельствует о видоспецифичности праймеров и зонда.

Для определения аналитической чувствительности ПЦР была сконструирована плазми-

да рGEM-*msp1a* с фрагментом гена *msp1a* длиной 207 п.н. и получены образцы, содержащие  $10^0$ – $10^6$  копий *msp1a*. По результатам ПЦР, проведенной в трех повторностях с использованием этих образцов в качестве матрицы, была построена стандартная кривая, отражающая линейное отношение между числом циклов ПЦР (*Ct*) и исходным числом копий гена *msp1a* в реакционной смеси, и установлено, что эффективность ПЦР составляет 1,91, а чувствительность метода позволяет выявить одну копию гена *msp1a* в реакционной смеси (рис. 2). На основании полученной стандартной кривой можно проводить количественную оценку уровня паразитемии у зараженных животных.

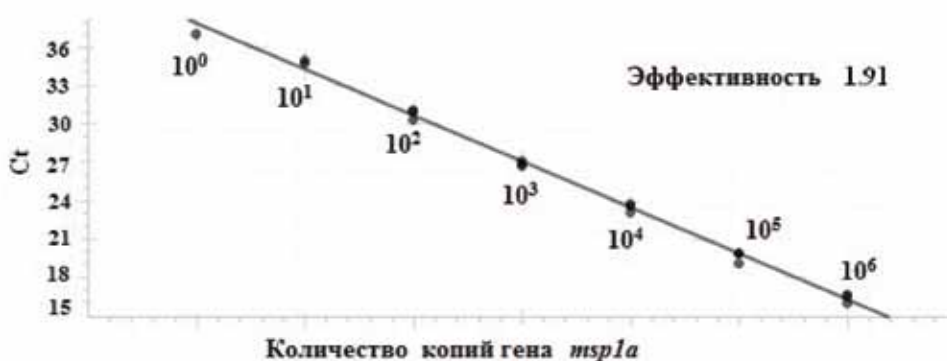


Рис. 2. График зависимости цикла ПЦР (*Ct*) от числа копий гена *msp1a*

### Заключение

Нами разработан метод ПЦР в реальном времени с флуоресцентно-меченым зондом для диагностики анаплазмоза КРС. Метод позволяет выявлять от одной копии гена *msp1a* *A. marginale* в анализируемом образце ДНК и надежно дифференцировать *A. marginale* и непатогенные для КРС виды анаплазм *A. ovis*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. phagocytophilum* и *A. platys*. Разработанный нами метод характеризуется высокой специфичностью и чувствительностью, быстротой получения результатов диагностики, возможностью количественной оценки уровня паразитемии. Метод может быть использован для обнаружения и количественной оценки *A. marginale* в образцах крови инфицированных животных с целью подтверждения диагноза, а также при проведении эпизоотологического мониторинга анаплазмоза КРС.

### Литература

1. Георгиу Х., Белименко В. В. Анаплазмоз крупного рогатого скота // Рос. вет. журнал. Сельскохозяйственные животные. 2015. № 1. С. 5–7.
2. Гулюкин М. И., Заблоцкий В. Т., Белименко В. В. Мониторинг эпизоотической ситуации по протозойным кровепаразитарным болезням домашних животных в Российской Федерации (2007–2012) // Рос. вет. журнал. Сельскохозяйственные животные. 2013. № 2. С. 36–40.
3. Казаков Н. А., Идина М. Ф. Анаплазмоз крупного рогатого скота в Тверской области // Ветеринарная патология. 2009. № 2. С. 72–75.
4. Казакова Е. В., Ясюкевич В. В., Попов И. О., Семенов С. М. Распространение клещей *Ixodes ricinus* L., 1758 и *Ixodes persulcatus* Shulze, 1930 (Parasitiformes, Ixodidae) на территории России и соседних стран и наблюдаемые изменения климата // Доклады Академии наук. 2009. № 5. С. 688–692.
5. Ковальчук С. Н., Бабий А. В., Архипова А. Л., Архипов А. В., Косовский Г. Ю. Оценка уровня паразитемии методом ПЦР в реальном времени при анаплазмозе крупного рогатого скота // Проблемы биологии продуктивных животных. 2016. № 3. С. 98–105.
6. Либерман Е. Л., Хлызова Т. А. Зависимость инвазивности крупного рогатого скота анаплазмозом от численности насекомых комплекса «Гнус» // Educatio. 2015. № 3. С. 46–50.
7. Мальцева О. Е. Анаплазмоз крупного рогатого скота в Центральном регионе РФ (эпизоотология, вакцинопрофилактика, химиотерапия и меры борьбы): автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2004. 15 с.
8. Минасян В. Г., Ткаченко Ю. Г., Идина М. Ф. Методы лечения коров больных анаплазмозом // Ветеринарная патология. 2009. № 4. С. 82–85.
9. Самуйленко А. Я., Гулюкин М. И., Василевич Ф. И., Ковальчук С. Н., Глазко Т. Т., Бабий А. В., Архипов А. В., Косовский Г. Ю. ДНК-диагностика анаплазмоза крупного рогатого скота // Российский паразитологический журнал. 2015. № 4. С. 72–78.
10. Bilgiç H. B., Karagenç 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* in cattle // Exp. Parasitol. 2013. № 133(2). P. 222–229.
11. 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 // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2005. № 102. P. 844–849.
12. 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. Vol. 124. P. 107–114.
13. de la Fuente J., Massung R. F., Wong S. J., Chu F. K., Lutz H., Meli M. et al. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains // J. Clin. Microbiol. 2005. V. 43. P. 1309–1317.
14. Decaro N., Carelli G., Lorusso E., Lucente M. S., Greco G., Lorusso A., Radogna A., Ceci L., Buonavoglia C. Duplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection and quantification of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* // J. Vet. Diagn. Invest. 2008. Vol. 20. 606–611.
15. 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. P. 1177–1183.
16. Inokuma H., Raoult D., Brouqui P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan // J. Clin. Microbiol. 2000. № 38. С. 4219–4221.

17. Kawahara M., Rikihisa Y., Lin Q., Isogai E., Tahara K., Itagaki A., Hiramitsu Y., Tajima T. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. № 72. P. 1102–1109.
18. Kivaria F. M. Estimated direct economic costs associated with tick-borne diseases on cattle in Tanzania // *Trop. Anim. Health Prod.* 2006. V. 38. P. 291–299.
19. Kocan K. M., de la Fuente J., Blouin E. F., Coetzee J. F., Ewing S. A. The natural history of *Anaplasma marginale* // *Veterinary parasitology.* 2010. V. 167. P. 95–107.
20. Kocan K. M., de la Fuente J., Guglielmone A. A., Melendez R. D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle // *Clin. Microbiol. Rev.* 2003. V. 16. P. 698–712.
21. Löhr C. V., Rurangirwa F. R., McElwain T. F., Stiller D., Palmer G. H. Specific expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 salivary gland variants occurs in the midgut and is an early event during tick transmission // *Infect. Immun.* 2002. Vol. 70. P. 114–120.
22. Picoloto G., Lima R. F., Olegário L. A., Carvalho C. M., Lacerda A. C., Tomás W. M., Borges P. A., Pellegrin A. O., Madruga C. R. Real-time polymerase chain reaction to diagnose *Anaplasma marginale* in cattle and deer (*Ozotoceros bezoarticus leucogaster*) of the Brazilian Pantanal // *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2010. Vol. 19. P. 186–188.
23. 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. Vol. 48. P. 2424–2432.
24. Strik N. I., Alleman A. R., Barbet A. F., Sorenson H. L., Wamsley H. L., Gaschen F. P., Luckschander N., Wong S., Chu F., Foley J. E., Bjoersdorff A., Stuenkel 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. V. 14. P. 262–268.
25. Torina A., Agnone A., Blanda V., Alongi A., D'Agostino R., Caracappa 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 Tick Borne Dis.* 2012. V. 3. P. 283–287.
26. Wall D. T. Anaplasmosis control and diagnosis in South Africa // *Ann N Y Acad Sci.* 2000. № 916. P. 474–83.
27. 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. V. 75. P. 27–36.

## References

1. Georgiu H., Belimenko V. V. Anaplasmosis in cattle. *Ros. vet. zhurnal. Selskokhozyaystvennyye zhivotnyye = Russian Veterinarian Journal. Live-stock animals.* 2015; (1):5–7 (In Russ.).
2. Gulyukin M. I., Zabolotskiy V. T., Belimenko V. V. Monitoring of epidemic situation on protozoal blood protozoan diseases of domestic animals in Russian Federation (2007–2012). *Ros. vet. zhurnal. Selskokhozyaystvennyye zhivotnyye = Russian Veterinarian Journal. Live-stock animals.* 2013; (2):36–40 (In Russ.).
3. Kazakov N. A., Idina M. F. Anaplasmosis of cattle in Tverskaya region. *Veterinary Pathology.* 2009; (2):72–75. (In Russ.).
4. Kozakova E. V., Yasyukevich V. V., Popov I. O., Semenov S. M. Extension of acarid *Ixodes ricinus* L., 1758 and *Ixodes persulcatus* Shulze, 1930 (Parasitiformes, Ixodidae) within the territory of Russia and neighboring countries and observable changes of climate. *Reports of the Academy of Science.* 2009; (5):688–692. (In Russ.).
5. Kovalchuk S. N., Babiy A. V., Arkhipova A. L., Arkhipov A. V., Kosovskiy G. Yu. Estimation of parasitemia level by PCR method in real time in the case of anaplasmosis of cattle. *Problems of productive animals' biology.* 2016; (3):98–105. (In Russ.).
6. Liberman E. L., Khlyzova T. A. Relationship between anaplasmosis infesting of cattle and insects population of the "Gnus" complex. *Educatio.* 2015; (3):46–50. (In Russ.).
7. Maltseva O. E. Anaplasmosis of cattle in the central region of the Russian Federation (epizootology, preventive vaccination, chemotherapy, and control measures). *Avtoref. diss. Dr. Biol. Sci. Moscow.* 2004: 15. (In Russ.).
8. Manisyan V. G., Tkachenko Yu. G., Idina M. F. Methods of treatment cows suffering from anaplasmosis. *Veterinarnaya patologiya = Veterinary pathology.* 2009; (4):82–85 (In Russ.).
9. Samuylenko A. Ya., Glyukin M. I., Vasilevich F. I., Kovalchuk S. N., Glazko T. T., Babiy A. V.,

- Arkhipov A. V., Kosovsky G. Yu. DNA-diagnostic of anaplasmosis of cattle. *Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2015; (4):72–78 (In Russ.).
10. Bilgiç H. B., Karagenç 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* in cattle. *Exp. Parasitol.* 2013; 133(2):222–229. (In Eng.).
  11. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; (102):844–849. (In Eng.).
  12. 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. (In Eng.).
  13. de la Fuente J., Massung R. F., Wong S. J., Chu F. K., Lutz H., Meli M. et al. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: P.1309–1317.
  14. Decaro N., Carelli G., Lorusso E., Lucente M. S., Greco G., Lorusso A., Radogna A., Ceci L., Buonavoglia C. Duplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection and quantification of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2008; 20:606–611. (In Eng.).
  15. 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.
  16. Inokuma H., Raoult D., Brouqui P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38:4219–4221.
  17. Kawahara M., Rikihisa Y., Lin Q., Isogai E., Tahara K., Itagaki A., Hiramitsu Y., Tajima T. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72:1102–1109.
  18. Kivaria F. M. Estimated direct economic costs associated with tick-borne diseases on cattle in Tanzania. *Trop. Anim. Health Prod.* 2006; 38: 291–299.
  19. Kocan K. M., de la Fuente J., Blouin E. F., Coetzee J. F., Ewing S. A. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary parasitology*. 2010; 167: 95–107.
  20. Kocan K. M., J. de la Fuente J., Guglielmono A. A., Melendez R. D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003; 16:698–712.
  21. Löhr C. V., Rurangirwa F. R., McElwain T. F., Stiller D., Palmer G. H. Specific expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 salivary gland variants occurs in the midgut and is an early event during tick transmission. *Infect. Immun.* 2002; 70:114–120.
  22. Picoloto G., Lima R. F., Olegário L. A., Carvalho C. M., Lacerda A. C., Tomás W. M., Borges P. A., Pellegrin A. O., Madruga C. R. Real-time polymerase chain reaction to diagnose *Anaplasma marginale* in cattle and deer (*Ozotoceros bezoarticus leucogaster*) of the Brazilian Pantanal. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2010; 19:186–188.
  23. 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: 2424–2432.
  24. Strik N. I., Alleman A. R., Barbet A. F., Sorenson H. L., Wamsley H. L., Gaschen F. P., Luckschander N., Wong S., Chu F., Foley J. E., Bjoersdorff 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.
  25. Torina A., Agnone A., Blanda V., Alongi A., D'Agostino R., Caracappa 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 Tick Borne. Dis.* 2012; 3:283–287.
  26. Wall D. T. Anaplasmosis control and diagnosis in South Africa. *Ann NY Acad. Sci.* 2000; 916:474–83.
  27. 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.