

УДК 619:616.993.192.6

DOI:

Поступила в редакцию: 08.12.2016

Принята в печать: 10.03.2017

Для цитирования:

Василевич Ф. И., Ковальчук С. Н., Бабий А. В., Архипов А. В., Архипова А. Л., Глазко Т. Т., Косовский Г. Ю. Молекулярная идентификация изолятов *Anaplasma marginale*, обнаруженных в крови крупного рогатого скота на территории Московской области // Российский паразитологический журнал. – М., 2017. – Т.40, Вып.2. – С.

For citation: Vasilevich F.I., Kovalchuk S.N., Babiya A.V., Arkhipov A.V., Arkhipova A.L., Glazko T.T., Kosovskiy G.Yu. Molecular identification of isolates *Anaplasma marginale* found in blood of cattle on the territory of Moscow region. // Russian Journal of Parasitology, 2017, V. 40, Iss.2, pp.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИЗОЛЯТОВ *Anaplasma marginale*, ОБНАРУЖЕННЫХ В КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ТЕРРИТОРИИ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Василевич Ф. И.¹, Ковальчук С. Н.², Бабий А. В.², Архипов А. В.², Архипова А. Л.², Глазко Т. Т.², Косовский Г. Ю.²

¹ Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К. И. Скрябина, 109472, Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23

² Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий, 127422, Москва, ул. Костякова, д. 12, стр.4, e-mail: info-ceerb@mail.ru

Реферат

Цель исследования – выявить и идентифицировать с помощью молекулярно-генетических методов изоляты *Anaplasma marginale*, циркулирующие на территории Московской области.

Материалы и методы. Образцы крови крупного рогатого скота были отобраны в 2015 г. на территории Московской области. ДНК выделяли из цельной крови с помощью набора Sorb-M. Выявление животных, инфицированных *A. marginale*, и оценку уровня паразитемии проводили методом ПЦР в реальном времени, разработанным нами ранее. Типирование штаммов *A. marginale* осуществляли на основе метода с модификацией в части структуры праймеров.

Полученные фрагменты гена были клонированы в клетках *Escherichia coli*. Поиск целевых рекомбинантных клонов *E. coli* проводили методом ПЦР с использованием стандартных праймеров M13 с последующим анализом продуктов реакции электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле.

Результаты и обсуждение. Показано, что семь из тридцати исследованных животных являлись носителями *A. marginale* с уровнем паразитемии в пределах $3,6 \times 10^3 - 5,4 \times 10^5$ на 1 мл крови. Типирование обнаруженных изолятов на основе нуклеотидных последовательностей гена *msp4* выявило их принадлежность к двум уже известным генотипам. Полученные результаты могут быть использованы при проведении эпидемиологического мониторинга анаплазмоза на территории Московской области, а также учитываться при разработке вакцин.

Ключевые слова: анаплазмоз, *Anaplasma marginale*, крупный рогатый скот, ПЦР, паразитемия, генотипирование.

Введение

Риккетсия *Anaplasma marginale* (отряд Rickettsiales, семейство Anaplasmataceae) – облигатный внутриэритроцитарный паразит, возбудитель анаплазмоза крупного рогатого скота. Анаплазмоз у крупного рогатого скота протекает с признаками лихорадки, анемии, атонии желудочно-кишечного тракта и истощения [3]. Анаплазмоз приносит значительный экономический ущерб животноводческим хозяйствам вследствие потерь молочной и мясной продуктивности и гибели скота – летальность при анаплазмозе может достигать 100 % [5, 17]. Источником возбудителя являются инфицированные животные, переносчиками – около 20 видов клещей и кровососущие насекомые [15]. Возможна также механическая передача возбудителя от зараженных животных к здоровым через нестерильные инструменты при проведении зоотехнических мероприятий [1].

Анаплазмоз крупного рогатого скота зарегистрирован во многих тропических и субтропических странах; эндемичен для Мексики, Центральной и Южной Америки, Карибских островов, Африки и Азии [5, 12]; распространен фактически по всей территории США, а также в некоторых странах Европы, главным образом средиземноморских [10]. Случаи заболевания крупного рогатого скота анаплазмозом зарегистрированы на территории Украины, Белоруссии, Молдовы, Казахстана, государств Средней Азии и Закавказья. В Российской Федерации неблагоприятными по анаплазмозу согласно ветеринарной отчетности являются субъекты Центрального, Северо-Западного и Приволжского ФО [2, 4].

К настоящему времени установлены полные последовательности геномов четырнадцати, преимущественно американских, изолятов *A. marginale* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/404>]. Для *A. marginale* характерен небольшой размер генома (около 1,2 Mb), что является результатом регрессивной эволюции и типично для внутриклеточных паразитов [16]. Сравнительный анализ геномов *A. marginale* показал, что число однонуклеотидных полиморфизмов между разными штаммами варьирует от 0,20 до 0,58 % генома [7].

Для оценки генетической вариабельности изолятов и штаммов *A. marginale* был предложен метод сиквенс-типирования по генам белков внешней мембраны *msp1a* и *msp4* [8, 9]. Показано, что для гена *msp1a* характерна высокая скорость мутирования в пределах даже одного штамма, поэтому его используют для выявления генетического разнообразия изолятов *A. marginale* [11, 14]. Наиболее подходящим маркером для геногеографических исследований изолятов и штаммов *A. marginale* является ген *msp4* [8]. На его основе был разработан метод сиквенс-типирования [8], с помощью которого на сегодняшний день идентифицировано 110 изолятов *A. marginale*, большинство из которых было обнаружено на территории Мексики и США [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Anaplasma+marginale+msp4+complete>].

Подобные исследования в России до настоящего времени не проводились.

Цель наших исследований – с помощью молекулярно-генетических методов выявить и идентифицировать изоляты *A. marginale*, циркулирующие на территории Московской области.

Материалы и методы

Образцы крови крупного рогатого скота были отобраны в мае 2015 г. на территории Московской области. ДНК выделяли из цельной крови животных с помощью набора Sorb-M. Выявление животных, инфицированных *A. marginale*, и оценку уровня паразитемии проводили методом ПЦР в реальном времени, разработанным нами ранее [6].

Типирование штаммов *A. marginale* осуществляли на основе метода [8] с модификацией в части структуры праймеров, амплификацию гена *msp4* – с помощью набора реактивов FastStartHiFi PCR System, праймеров MSP4phyl-D: 5'-ATGAATTACAGAGAATTGTTTAC-3' и Msp4phyl-R: 5'-TTAGCTGAACAGGAATCTTGC-3' в концентрации 0,5 мкМ каждого и 3 мкл ДНК, выделенной из крови инфицированных животных, ПЦР – при следующих условиях: начальная денатурация в течение 2 мин при 95 °С; 45 циклов (15 с при 95 °С, 15 с при 62 °С, 40 с при 72 °С).

Полученные фрагменты гена *msp4* длиной 849 п. н. были клонированы в клетках *Escherichia coli* XL-blue с помощью набора реактивов CloneJET™. Поиск целевых рекомбинантных клонов *E. coli* проводили методом ПЦР с использованием стандартных праймеров M13 с последующим анализом продуктов реакции электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле, очистку плазмидной ДНК – с использованием набора GeneJET Miniprep Kit, секвенирование плазмид – в обоих направлениях по методу Сэнгера с помощью набора ABI Prism Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit и праймеров M13 согласно рекомендациям изготовителя.

Поиск гомологов полученных нами последовательностей гена *msp4* проводили с помощью программы BLASTN [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>].

Результаты и обсуждение

С целью выявления изолятов *A. marginale*, циркулирующих на территории Московской области, были получены и исследованы методом ПЦР в реальном времени тридцать образцов ДНК, выделенной из цельной крови голштинизированного черно-пестрого крупного рогатого скота одного из животноводческих хозяйств Московской области. По результатам исследования семь из тридцати животных (23,3 %) оказались анаплазмоносителями. Была проведена количественная оценка уровня паразитемии методом, описанным нами ранее [6], результаты которой приведены в таблице. Уровень паразитемии у исследованных животных находился в пределах от $3,6 \times 10^3$ до $5,4 \times 10^5$ анаплазм в 1 мл крови.

Таблица 1

Результаты количественной оценки уровня паразитемии у инфицированных животных

№ образца	Титр <i>A. marginale</i> (число клеток <i>A. marginale</i> в 1 мл крови)
1	$5,43 \times 10^5$
2	$8,33 \times 10^4$
3	$6,53 \times 10^4$
4	$3,01 \times 10^4$
5	$4,83 \times 10^5$
6	$4,53 \times 10^3$
7	$3,55 \times 10^3$

Идентификацию выявленных изолятов *A. marginale* проводили на основе нуклеотидной последовательности кодирующего участка гена *msp4* методом, описанным ранее [8] с модификацией структуры праймеров с учетом имеющихся на сегодняшний день в базе данных GenBank последовательностей гена *msp4*. Ампликоны длиной 849 п. н., полученные в результате ПЦР с использованием в качестве матрицы ДНК инфицированных животных, были клонированы в клетках *E. coli*, и по три клона для каждого ампликона были секвенированы в обоих

направлениях. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей с помощью программы BLASTN [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>] показал, что четыре из полученных семи ампликонов полностью идентичны гену *msp4* изолята *A. marginale* 50 (G16) (GenBank accession no. EU315782.1), обнаруженному ранее на территории Венгрии [13]. Остальные три ампликона полностью идентичны гену *msp4* штамма *A. marginale* Israeli non-tailed (accession no AY786993) и изолята 1.6 (GenBank accession no AY666006), обнаруженным ранее на территории Израиля и Зимбабве, соответственно.

Заключение

Молекулярно-генетическое типирование изолятов *A. marginale*, выявленных в крови крупного рогатого скота на территории Московской области, выявило изоляты, относящиеся к двум известным генотипам. Полученные результаты могут быть использованы при проведении эпидемиологического мониторинга анаплазмоза на территории Московской области, а также учитываться при разработке вакцин.

Литература

1. Василевич Ф. И., Белименко В. В., Гулюкин М. И., Георгиу Х. Практическое руководство по борьбе с кровепаразитарными болезнями домашних животных. – М.: ЗооВетКнига, 2015. – С. 86.
2. Георгиу Х., Белименко В. В. Современные лабораторные методы диагностики анаплазмоза крупного рогатого скота и овец // Рос. вет. журнал. С/х животные. – 2014. – № 3. – С. 31–32.
3. Гулюкин М. И., Заблоцкий В. Т., Белименко В. В., Христиановский П. И., Саруханян А. Р. Кровепаразитарные болезни домашних животных (Атлас). – М.: ЗооВетКнига, 2013. – С. 86.
4. 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. С/х животные. – 2013. – № 2. – С. 36–40.
5. Казаков Н. А. Минимальная заражающая доза возбудителей (*A. marginale*, *A. ovis*) при анаплазмозе КРС и овец критерий объективной оценки иммуногенных свойств противоанаплазмозных адьювантных инактивированных эмульгированных вакцин // Ветеринарная патология. – 2008. – № 2. – С. 68–70.
6. Ковальчук С. Н., Косовский Г. Ю., Архипов А. В., Глазко Т. Т., Глазко В. И. Разработка метода выявления *Anaplasma marginale* с использованием ПЦР в реальном времени // Сельскохозяйственная биология. 2015.- Т. 50, № 6. – С. 825–831.
7. Dark M. J., Herndon D. R., Kappmeyer L. S., Gonzales M. P., Nordeen E., Palmer G. H. Conservation in the face of diversity: multistrain analysis of an intracellular bacterium. BMC Genomics, 2009, vol. 10, p.16.
8. Fuente J., Van Den Bussche R. A., Kocan K. M. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). Veterinary parasitology, 2001, vol. 97, pp. 65–76.
9. Fuente J., Passos L. M., Van Den Bussche R. A., Ribeiro M. F., Facury-Filho E. J., Kocan K. M. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. Vet. Parasitol., 2004, vol. 121 (3–4), pp. 307–316.
10. Fuente J., Lew A., Lutz H., Meli M. L., Hofmann-Lehmann R., Shkap V. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. Anim. Health Res. Rev., 2005, vol. 6, pp. 75–89.

11. Fuente J., Rubial P., Mtshali M. S., Naranjo V., Shuqing L., Mangold A. J. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequence. *Vet. Microbiol.*, 2006, vol. 119, pp. 382–390.
12. Guglielmone A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.*, 1995, vol. 57, pp. 109–119.
13. Hornok S., Foldvari G., Elek V., Naranjo V., Farkas R., de la Fuente J. Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). *J. Vet. Parasitol.*, 2008, vol. 154 (3–4), pp. 354–359.
14. Kocan K. M., Blouin E. F., Barbet A. F. Anaplasmosis control: past, present and future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2000, vol. 916, pp. 501–509.
15. Kocan K. M., Fuente J., Blouin E. F., Coetzee J. F., Ewing S. A. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.*, 2010, vol. 167, pp. 95–107.
16. Ogata H., Audic S., Renesto–Audiffren P., Fournier P. E., Barbe V., Samson D., Roux V., Cossart P., Weissenbach J., Claverie J. M., Raoult D. Mechanisms of evolution in *Rickettsia conorii* and *R. prowazekii*. *Science*, 2001, vol. 293, pp. 2093–2098.
17. Wall D. T. Anaplasmosis control and diagnosis in South Africa. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 2000, no 916, p. 474–83.

References

1. Georgiu Kh., Belimenko V.V. Modern laboratory methods for diagnostics of anaplasmosis in cattle and sheep]. *Ros. vet. zhurnal* [Russ. Vet. J.], 2014, no. 3, pp. 31–32. (In Russian)
2. Gulyukin M.I., Zablotskiy V.T., Belimenko V.V., Khristianovskiy P.I., Sarukhanyan A.R. *Kroveparazitarnye bolezni domashnikh zhivotnykh (Atlas)* [Blood parasitic diseases of domestic animals (Atlas)]. M., Zoovetkniga, 2013. 86 p. (In Russian)
3. Gulyukin M. I., Zablotskiy V. T., Belimenko V. V. Monitoring of epizootic situation on protozoan blood parasitic diseases of domestic animals in Russian Federation (2007–2012). *Ros. vet. zhurnal. S/h zhivotnye*. [Russ. Vet. J. Farm Animals], 2013, no. 2, pp. 36–40. (In Russian)
4. Kazakov N. A. The highest infective dose of pathogenic agents (*A. marginale*, *A. ovis*) at anaplasmosis in cattle and sheep - objective assessment criteria of immunogenic properties of adjuvant inactivated emulsified anaplasmosis vaccines. *Veterinarnaya patologiya* [Veterinary pathology], 2008, no. 2, pp. 68–70. (In Russian)
5. Koval'chuk S. N., Kosovsky G. Yu., Arkhipov A. V., Glazko T. T., Glazko V. I. Development of real-time PCR for detection of *Anaplasma marginale*. *Sel'skohozyaystvennaya biologiya* [Agricultural biology], 2015, vol. 50, no 6, pp. 825–831. (In Russian)
6. Vasilevich F. I., Belimenko V. V., Gulyukin M. I., Georgiu Kh. *Prakticheskoe rukovodstvo po bor'be s kroveparazitarnymi boleznyami domashnikh zhivotnykh*. [A practical guide on struggle against blood parasitic diseases of domestic animals]. M., ZooVetKniga, 2015, 86 p. (In Russian)
7. Dark M. J., Herndon D. R., Kappmeyer L. S., Gonzales M. P., Nordeen E., Palmer G. H. Conservation in the face of diversity: multistrain analysis of an intracellular bacterium. *BMC Genomics*, 2009, vol. 10, pp.16.
8. Fuente J., Van Den Bussche R. A., Kocan K. M. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Veterinary parasitology*, 2001, vol. 97, pp. 65–76.

9. Fuente J., Passos L. M., Van Den Bussche R. A., Ribeiro M. F., Facury-Filho E. J., Kocan K. M. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2004, vol. 121 (3–4), pp. 307–316.
10. Fuente J., Lew A., Lutz H., Meli M. L., Hofmann-Lehmann R., Shkap V. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Anim. Health Res. Rev.*, 2005, vol. 6, pp. 75–89.
11. Fuente J., Rubial P., Mtshali M. S., Naranjo V., Shuqing L., Mangold A. J. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequence. *Vet. Microbiol.*, 2006, vol. 119, pp. 382–390.
12. Guglielmone A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.*, 1995, vol. 57, pp. 109–119.
13. Hornok S., Foldvari G., Elek V., Naranjo V., Farkas R., de la Fuente J. Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). *J. Vet. Parasitol.*, 2008, vol. 154 (3–4), pp. 354–359.
14. Kocan K. M., Blouin E. F., Barbet A. F. Anaplasmosis control: past, present and future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2000, vol. 916, pp. 501–509.
15. Kocan K. M., Fuente J., Blouin E. F., Coetzee J. F., Ewing S. A. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.*, 2010, vol. 167, pp. 95–107.
16. Ogata H., Audic S., Renesto-Audiffren P., Fournier P. E., Barbe V., Samson D., Roux V., Cossart P., Weissenbach J., Claverie J. M., Raoult D. Mechanisms of evolution in *Rickettsia conorii* and *R. prowazekii*. *Science*, 2001, vol. 293, pp. 2093–2098.
17. Wall D. T. Anaplasmosis control and diagnosis in South Africa. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2000, no 916, pp. 474–83.

Russian Journal of Parasitology, 2017, V.40, Iss.2

Received: 08.12.2016

Accepted: 10.03.2017

MOLECULAR IDENTIFICATION OF ISOLATES *ANAPLASMA MARGINALE* FOUND IN BLOOD OF CATTLE ON THE TERRITORY OF MOSCOW REGION

Vasilevich F.I.¹, Kovalchuk S.N.², Babiy A.V.², Arkhipov A.V.², Arkhipova A.L.², Glazko T.T.², Kosovskiy G.Yu.²

¹ Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin., 109472 Moscow, 23 Academician Skryabin St.

² Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies, 127422, Moscow, 12 Kostyakov St., Build. 4, e-mail: info-ceerb@mail.ru

Abstract

Objective of research: To detect and identify by molecular and genetic methods isolates *Anaplasma marginale* circulating on the territory of Moscow region.

Materials and methods: Blood samples were taken from cattle on the territory of Moscow region in 2015. DNA was isolated from whole blood by the kit «Sorb-M». Identification of animals infected with *A. marginale* and estimation of the parasitemia level were carried out by real-time PCR methods. Typing of *A. marginale* strains was performed by modifying the primer structure. The received gene fragments were cloned in *Escherichia coli* cells. Targeted selection of recombinant clones of *E. coli* was

conducted by PCR methods using standard primers M13 with the following analysis of reaction products by 1,5% agarose gel electrophoresis.

Results and discussion: It was shown that seven of thirty animals were carriers of *A. marginale* strains; levels of parasitemia range from $3,6 \times 10^3$ to $5,4 \times 10^5$ per 1 ml blood. The analysis of msp4 gene sequence of *A. marginale* isolates shows their belonging to two already known genotypes. The results obtained can be used for epidemiological monitoring of anaplasmosis on the territory of Moscow region as well as taken into account for development of vaccines.

Keywords: anaplasmosis, *Anaplasma marginale*, cattle, PCR, parasitemia, genotyping.

© 2017 The Author(s). Published by All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K.I. Skryabin. This is an open access article under the Agreement of 02.07.2014 (Russian Science Citation Index (RSCI) http://elibrary.ru/projects/citation/cit_index.asp) and the Agreement of 12.06.2014 (CABI.org / Human Sciences section: <http://www.cabi.org/Uploads/CABI/publishing/fulltext-products/cabi-fulltext-material-from-journals-by-subject-area.pdf>).