

# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ТИПИРОВАНИЕ РОССИЙСКИХ ИЗОЛЯТОВ *ANAPLASMA MARGINALE*



**КОСОВСКИЙ Глеб Юрьевич**, Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий

**КОВАЛЬЧУК Светлана Николаевна**, Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий

**ФЕДОРИНА Екатерина Александровна**, Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий

**АРХИПОВА Анна Леонидовна**, Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий

**ЛАРИОНОВА Ольга Сергеевна**, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

**КРАСНИКОВА Екатерина Сергеевна**, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

*В статье представлены результаты по выявлению и молекулярно-генетическому типированию российских изолятов *Anaplasma marginale*. Выявление инфицированных животных проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan-зонда. Показано, что 41,9 % исследованных животных были инфицированы *A. marginale*. Типирование обнаруженных изолятов *A. marginale* проводили на основе результатов секвенирования гена *msp4*. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей выявил принадлежность российских изолятов *A. marginale* к двум известным генотипам.*

Риккетсия *Anaplasma marginale* (отряд Rickettsiales, семейство Anaplasmataceae) – облигатный внутриэритроцитарный паразит, возбудитель анаплазмоза крупного рогатого скота. Заболевание протекает с признаками лихорадки, анемии, атонии желудочно-кишечного тракта и истощения [5]. Источником возбудителя являются инфицированные животные, переносчиками – около 20 видов клещей и кровососущие насекомые [1, 15]. Возможна также механическая передача возбудителя от зараженных животных к здоровым через нестерильные инструменты при проведении зоотехнических мероприятий. Анаплазмоз крупного рогатого скота зарегистрирован во многих тропических и субтропических странах, эндемичен для Мексики, Центральной и Южной Америки, Карибских островов, Африки и Азии, распространен фактически по всей территории США, а также в некоторых странах Европы, главным образом Средиземноморских [11, 15]. В Российской Федерации согласно ветеринарной отчетности неблагополучными по анаплазмозу являются южные области России, а также Брянская, Калужская, Рязанская, Калининградская, Саратовская, Тверская, Тюменская, Владимирская, Нижегородская, Новосибирская, Ульяновская области и Алтайский край [2, 4, 6].

Анаплазмоз крупного рогатого скота приносит значительный экономический ущерб животноводческим хозяйствам вследствие потерь молочной и мясной продуктивности и гибели скота – летальность КРС при этом составляет от 10–30 до 100 % [3, 19]. По имеющимся оценкам, ежегодные эконо-

мические потери от анаплазмоза крупного рогатого скота только в США и Танзании составили 100 и 47,3 млн долларов соответственно [14, 16]. Сведения об экономическом ущербе от анаплазмоза крупного рогатого скота в нашей стране, к сожалению, отсутствуют.

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 [17]. Сравнительный анализ геномов *A. marginale* показал, что количество однонуклеотидных полиморфизмов между разными штаммами варьирует от 0,20 до 0,58 % генома [10]. Для оценки генетической вариабельности изолятов *A. marginale* и проведения филогенетического анализа были предложены методы сиквенс-типирования по генам белков внешней мембраны *msp1α* и *msp4* [10, 11]. Показано, что для гена *msp1α* характерна высокая скорость мутирования в пределах одного изолята, поэтому его используют для выявления генетического разнообразия *A. marginale* [10].

Наиболее подходящим маркером для географических исследований *A. marginale* является ген *msp4* [11]. На его основе был разработан метод сиквенс-типирования [11], с помощью которого на сегодняшний день идентифицировано более 300 изолятов *A. marginale*, в основном в тропических и



субтропических странах (база данных GenBank). Подобные исследования в России до настоящего времени не проводились.

Цель данного исследования – выявить и идентифицировать российские изоляты *A. marginale* с помощью молекулярно-генетических методов.

**Методика исследований.** Образцы крови КРС ( $n = 62$ ) были отобраны в 2015–2016 гг. на территории Московской и Саратовской областей. ДНК выделяли с помощью набора Sorb-M («Синтол», Россия) согласно рекомендациям производителя. Инфицированных *A. marginale* животных выявляли методом ПЦР в реальном времени, разработанным нами ранее [8]. Реакцию амплификации проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл LightCycler®480 Probes Master (Roche, Швейцария), 0,5 мкМ праймера MSP4-F: 5'-CATGAGTCACGAAGTGGCT-3', 0,5 мкМ праймера MSP4-R: 5'-GGCACACTCACATCAATC-3', 0,1 мкМ флуоресцентно-меченого зонда MSP 4-probe: 5'-(Cy5)-AAGGGGGAGTAATGGGAGGTAGCT-3' и 3 мкл ДНК. Амплификацию проводили на приборе LightCycler 96 (Roche, Швейцария). Профиль реакции: начальная денатурация – 2 мин при 95 °С; 40 циклов амплификации (15 с при 95 °С, 15 с при 58 °С, 15 с при 72 °С).

Типирование обнаруженных российских изолятов *A. marginale* проводили на основе метода, предложенного J. Fuente и др. [11], с модификацией в части структуры праймеров. Амплификацию гена *msp4* проводили с помощью набора реактивов FastStartHiFi PCR System (Roche, Швейцария), 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 проводили 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™ (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Поиск целевых рекомбинантных клонов *E. coli* проводили методом ПЦР с использованием стандартных праймеров M13 с последующим анализом продуктов реакции электрофорезом в 1,5%-м агарозном геле. Очистку плазмидной ДНК проводили с использованием набора GeneJET Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Секвенирование плазмид, выделенных из трех независимых клонов для каждого ампликона, проводили в обоих направлениях по методу Сэнгера («Синтол», Россия). Поиск гомологов, полученных нами последовательностей гена *msp4*, проводили с помощью программ BLAST [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>].

**Результаты исследований.** С целью выявления российских изолятов *A. marginale* были исследованы образцы крови ( $n = 62$ ) голштинизированного

черно-пестрого скота из двух животноводческих хозяйств Московской и Саратовской областей. На сегодняшний день для диагностики анаплазмоза применяют микроскопические и серологические методы исследования, однако их чувствительность и специфичность недостаточно высоки. Результаты микроскопических исследований мазков крови ненадежны на ранних стадиях инфицирования и в случаях заболеваний, сопровождающихся тяжелой формой анемии. Серологические методы, основанные на использовании антител к антигенам возбудителя анаплазмоза, имеют недостаточно высокую чувствительность и не позволяют дифференцировать *A. marginale* от других видов анаплазм [18].

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. Применение метода ПЦР в режиме реального времени значительно сокращает время исследования за счет регистрации накопления ДНК непосредственно в процессе ПЦР.

Для выявления животных, инфицированных *A. marginale*, был использован разработанный нами ранее метод на основе ПЦР в реальном времени (см. рисунок), в котором праймеры и флуоресцентно-меченый зонд были подобраны на видоспецифичные для *A. marginale* участки гена *msp4*, что позволяет надежно дифференцировать *A. marginale* от других видов анаплазм [8].

Результаты проведенного исследования показали, что инфицированными оказались 41,9 % животных. При этом уровень инфицированности в хозяйстве Московской области составил 57,1 %, в хозяйстве Саратовской области – 10 %. Сопоставимый уровень зараженности крупного рогатого скота анаплазмами *A. marginale* был обнаружен в результате масштабных серологических и микроскопических исследований, проведенных в 2010–2014 гг. в разных хозяйствах на юге Тюменской области [6].

Идентификацию выявленных изолятов *A. marginale* проводили на основе нуклеотидной последовательности кодирующего участка гена *msp4* методом, описанным ранее [11] 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 крови инфицированных животных, были клонированы в клетках *E. coli* XL-blue и секвенированы. Анализ полученных данных выявил два типа нуклеотидных последовательностей гена *msp4*, один из которых характерен для изолята 50(G16) (GenBank EU315782.1), обнаруженного ранее на территории Венгрии [13], другой – для изолятов Israeli non-tailed (GenBank AY786993) и 1.6 (GenBank AY666006), выявленных на территории Израиля и Зимбабве соответственно.



**Динамика накопления амплифицированных фрагментов гена *msp4 A. marginale* в ходе ПЦР в режиме реального времени. Ось ординат – уровень флуоресценции, ось абсцисс – количество циклов ПЦР. К – отрицательный контроль**

Обнаруженная гетерогенность популяции *A. marginale* в исследуемых хозяйствах может отражать как ввоз животных из разных географических регионов, так и расширение в условиях меняющегося климата ареала обитания клещей – основных переносчиков кровопаразитарных заболеваний [7].

**Выводы.** Впервые проведены исследования по молекулярно-генетической идентификации и типированию российских изолятов *A. marginale*, выявленных в крови крупного рогатого скота. Секвенирование гена *msp4* выявленных изолятов *A. marginale* показало их принадлежность к двум известным генотипам, обнаруженным ранее на территории Венгрии, Израиля и Зимбабве. Полученные результаты могут быть использованы при проведении эпидемиологического мониторинга анаплазмоза крупного рогатого скота на территории Российской Федерации и при разработке вакцин.

Учитывая уже имеющиеся и полученные нами данные о высоком (до 57,1%) уровне зараженности крупного рогатого скота *A. marginale* на территории РФ и значительных экономических потерях, связанных с анаплазмозом, представляется целесообразным проводить ПЦР-исследования на анаплазмозоносительство всех животных, ввозимых на территорию Российской Федерации. Кроме того, необходимо принимать меры по профилактике анаплазмоза крупного рогатого скота в соответствии с действующими инструкциями.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бушемла Ф., Агольцов В.А. Эпизоотологическая характеристика блутанга – новой эмерджентной трансграничной инфекционной болезни жвачных животных // Аграрный научный журнал. – 2014. – № 11. – С. 9–14.
2. Георгиу Х., Белименко В.В. Анаплазмоз крупного рогатого скота // РВЖ. Сельскохозяйственные животные. – 2015. – № 1. – С. 5–7.
3. Казаков Н.А. Минимальная заражающая доза возбудителей (*A. marginale*, *A. ovis*) при анаплазмозе КРС и овец – критерий объективной оценки иммуногенных свойств противонаплазмозных адьювантных инактивированных эмульгированных вакцин // Ветеринарная патология. – 2008. – № 2. – С. 68–70.
4. Казаков Н.А., Идина М.Ф. Анаплазмоз крупного рогатого скота в Тверской области // Ветпатология. – 2009. – № 2. – С. 72–75.
5. Кровепаразитарные болезни домашних животных (Атлас) / М.И. Гулюкин [и др.]. – М.: ЗооВетКнига,

2013. – С. 86.

6. Либерман Е.Л., Хлызова Т.А. Зависимость инвазирования крупного рогатого скота анаплазмозом от численности насекомых комплекса «Гнус» // Educatio. – 2015. – № 3. – С. 46–50.

7. Распространение клещей *Ixodes ricinus* L., 1758 и *Ixodes persulcatus* Shulze, 1930 (Parasitiformes, Ixodidae) на территории России и соседних стран и наблюдаемые изменения климата / Е.В. Казакова [и др.] // Доклады Академии наук. – 2009. – № 5. – С. 688–692.

8. Разработка метода выявления *Anaplasma marginale* с использованием ПЦР в реальном времени / С.Н. Ковальчук [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – № 6. – С. 825–831.

9. 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.

10. 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, P. 382–390.

11. 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, P. 65–76.

12. Guglielme A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America // Veterinary parasitology, 1995, Vol. 57, P. 109–119.

13. Hornok S., Foldvari G., Elek V., Naranjo V., Farkas R., Fuente J. Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae) // Veterinary parasitology, 2008, Vol. 154, P. 354–359.

14. Kivaria F.M. Estimated direct economic costs associated with tick-borne diseases on cattle in Tanzania // Tropical Animal Health and Production, 2006, Vol. 38, P. 291–299.

15. 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, Vol. 167, P. 95–107.

16. McCallon B.R. Prevalence and economic aspects of anaplasmosis. In: Proceedings of the 6-th National Anaplasmosis Conference, Las Vegas, Nevada, 1973, P. 1–3.

17. 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, V. 293, P. 2093–2098.

18. 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* // Clinical and vaccine immunology, 2007, V. 14, P. 262–268.

19. Waal D.T. Anaplasmosis control and diagnosis in South Africa // Annals of the New York Academy of Sciences, 2000, No. 916, P. 474–483.

**Косовский Глеб Юрьевич**, д-р биол. наук, директор, Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий. Россия.

**Ковальчук Светлана Николаевна**, канд. биол. наук, зав. отделом молекулярных биотехнологий, Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий. Россия.

**Федорина Екатерина Александровна**, канд. биол. наук, научный сотрудник отдела молекулярных биотехнологий, Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий. Россия.



**Архипова Анна Леонидовна**, младший научный сотрудник отдела молекулярных биотехнологий, Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий. Россия. 127422, г. Москва, ул. Костякова, 12.

Тел.: (495) 610-21-31; e-mail: info-ceerb@mail.ru.

**Ларионова Ольга Сергеевна**, д-р биол. наук, зав. кафедрой «Микробиология, биотехнология и химия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

**Красникова Екатерина Сергеевна**, канд. биол. наук,

доцент кафедры «Микробиология, биотехнология и химия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

410012, г. Саратов, ул. Соколова, 335.

Тел.: (8452) 69-25-32.

**Ключевые слова:** *Anaplasma marginale*; анаплазмоз крупного рогатого скота; ПЦР; генотипирование; секвенирование; *msp4*.

#### MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION AND TYPING RUSSIAN ISOLATES OF ANA-PLASMA MARGINALE

**Kosovskiy Gleb Yurievich**, Doctor of Biological Sciences, Director, Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies. Russia.

**Kovalchuk Svetlana Nikolaevna**, Candidate of Biological Sciences, Head of the Department of Molecular biotechnologies, Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies. Russia.

**Fedorina Ekaterina Alexandrovna**, Candidate of Biological Sciences, Researcher of the Department of Molecular biotechnologies, Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies. Russia.

**Arkhipova Anna Leonidovna**, Junior Researcher of the Department of Molecular biotechnologies, Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies. Russia.

**Larionova Olga Sergeevna**, Doctor of Biological Sciences, Head of the chair "Microbiology, Biotechnology and Chemistry", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

**Krasnikova Ekaterina Sergeevna**, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the chair "Microbiology, Biotechnol-

ogy and chemistry", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

**Keywords:** *Anaplasma marginale*; bovine anaplasmosis; PCR; genotyping; sequencing; *msp4*.

*Anaplasma marginale* (order Rickettsiales, family Anaplasmataceae) is an intraerythrocytic parasite and a causative agent of bovine anaplasmosis. Bovine anaplasmosis causes significant economic losses to animal husbandry. This article presents the results on identification and molecular genetic typing of Russian isolates of *A. marginale*. Detection of infected animals was performed by TaqMan real-time polymerase chain reaction assay. It was shown that 41,9 % of tested animals were infected with *A. marginale*. Genotyping the obtained *A. marginale* isolates was carried out on the basis of *msp4* gene sequencing data. The analysis of the obtained sequences elicited that Russian isolates of *A. marginale* belong to two known genotypes.

УДК 631. 634.237:626.80

## ВОЗДЕЙСТВИЕ АГРОТЕХНИЧЕСКИХ И ЛЕСОМЕЛИОРАТИВНЫХ ПРИЕМОМ НА ЭЛЕМЕНТЫ ВОДНОГО БАЛАНСА В СТЕПИ ПРИВОЛЖСКОЙ ВОЗВЫШЕННОСТИ

**ПРОЕЗДОВ Пётр Николаевич**, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

**ПАНФИЛОВ Андрей Владимирович**, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

**РОЗАНОВ Александр Владимирович**, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

**МАШТАКОВ Дмитрий Анатольевич**, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

**КАРПУШКИН Алексей Владимирович**, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

В статье на основе многолетних исследований (1964–2016 гг.) дан анализ преобразования элементов водного баланса под влиянием культур севооборотов и естественных трав пастбищ в системе агролесомелиоративных противоэрозионных мелиораций.

Противоэрозионные мелиорации, включающие в себя организационно-хозяйственные, агро-, лесо- и гидромелиоративные мероприятия способствуют изменению элементов водного баланса, прежде всего запасов воды в снеге, талого и ливневого поверхностного стока, почвенно-грунтовой влаги в зоне аэрации и на водосборе [1, 2, 4, 7, 8]. Заложенный под руководством И.А. Кузника в 1964 г. опыт защиты почв от эрозии в с. Вязовка, а затем расширенный в с. Мизино-Лапшиновка

Саратовской области (степь Приволжской возвышенности) позволил обобщить накопленный экспериментальный материал, опубликованный ранее [2, 4, 7, 8].

Цель исследования – установить влияние культур севооборота и естественных трав пастбищ в системе агротехнических и лесомелиоративных мероприятий на элементы водного баланса.

**Методика исследований.** Элементы водного баланса изучали по общепринятой методике [6].