Разработка метода выявления *Anaplasma phagocytophilum* на основе ПЦР в реальном времени

Development of the method for identification of *Anaplasma phagocytophilum* on the basis of real-time PCR

Архипова А.Л.

г. Москва

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-5-20
УДК 619.616.993.192.6

Ключевые слова: *Anaplasma phagocytophilum*, клещевая лихорадка, гранулоцитарный анаплазмоз человека, диагностика, ПЦР в реальном времени.

Key words: *Anaplasma phagocytophilum*, tick-borne fever, human granulocytic anaplasmosis, diagnostics, real-time PCR

Резюме. *Anaplasma phagocytophilum* (отряд Rickettsiales, семейство Anaplasmataceae) является возбудителем анаплазмоза широкого круга животных, включая крупный и мелкий рогатый скот, лошадей, собак, грызунов, а также человека. Цель исследования – разработка метода выявления *A. phagocytophilum* на основе ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). В результате анализа последовательностей гена *msp4* разных видов анаплазм были выявлены характерные для *A. phagocytophilum* участки, на основе которых были разработаны видоспецифичные праймеры для амплификации фрагмента гена длиной 207 п.н. Были оптимизированы условия проведения ПЦР-РВ с использованием красителя SYBR Green I. Чувствительность метода позволяет выявлять 100 копий гена *msp4 A. phagocytophilum* в анализируемом образце ДНК. Специфичность метода позволяет дифференцировать *A. phagocytophilum* от других видов анаплазм (*A. ovis*, *A. bovis*, *A. marginale*, *A. centrale*, *A. platys*). Разработанный метод может быть использован для обнаружения и количественной оценки *A. phagocytophilum* в образцах крови инфицированных животных с целью подтверждения диагноза, при проведении эпизоотологического мониторинга анаплазмоза, вызванного *A. phagocytophilum*, а также оценки эффективности лечения инфицированных животных.

Summary. *Anaplasma phagocytophilum* (Order Rickettsiales, Family Anaplasmataceae) is a causative agent of anaplasmosis in a wide range of animals, including cattle and small ruminants, horses, dogs, rodents, as well as human. The aim of the study was to develop a method for detection of *A. phagocytophilum* on the basis of real-time PCR. As a result of the analysis of the *msp4* gene sequences from different *Anaplasma* species the regions, which are characteristic for *A. phagocytophilum*, were identified and specie-specific primers

were designed to amplify 207 bp fragment of the gene. The conditions for conducting PCR with using SYBR Green I were optimized. Sensitivity of the method allows identifying 100 copies of the *A. phagocytophilum msp4* gene in an analyzed DNA sample. Specificity of the method makes it possible to differentiate *A. phagocytophilum* from other *Anaplasma* species (*A. ovis*, *A. bovis*, *A. marginale*, *A. centrale*, *A. platys*). The developed method can be used to detect and quantify *A. phagocytophilum* in blood samples of infected animals in order to confirm the diagnosis, for epizootological monitoring of anaplasmosis caused by *A. phagocytophilum*, as well as to evaluate the effectiveness of treatment of infected animals.

Введение

Anaplasma phagocytophilum (отряд Rickettsiales, семейство Anaplasmataceae) является возбудителем клещевой лихорадки (ТБФ - tick-borne fever) широкого круга животных, включая крупный и мелкий рогатый скот, лошадей, собак, грызунов, а также гранулоцитарного анаплазмоза человека [15]. Переносчиками *A. phagocytophilum* являются клещи рода Ixodes (*I. persulcatus*, *I. ricinus*, *I. scapularis*, *I. pacificus*). *A. phagocytophilum* выявлена в клещах на территории Европы, Кореи, Китая, Японии и США [13]. В РФ клещи, зараженные *A. phagocytophilum*, были обнаружены в Калининградской и Ленинградской областях, на Урале, в Сибири и на Дальнем Востоке [2, 14].

Клиническими проявлениями анаплазмоза, вызванного *A. phagocytophilum*, являются лихорадка, апатичность, отсутствие аппетита и атаксия у зараженных животных, а также снижение мясной и молочной продуктивности и аборт у крупного и мелкого рогатого скота [17, 7]. Клинические признаки клещевой лихорадки, вызванной *A. phagocytophilum*, могут проявиться спустя длительное время после инфицирования. Поражая гранулоциты, *A. phagocytophilum* вызывает подавление иммунитета, что способствует присоединению грибковых, бактериальных и вирусных инфекций. Поэтому особую важность приобретает раннее выявление *A. phagocytophilum* и проведение превентивной терапии.

В лабораторной диагностике для выявления *A. phagocytophilum* используются микроскопические исследования, серологические методы (ИФА) и ПЦР-диагностика. Метод микроскопии мазка крови, окрашенного по Романовскому-Гимза, заключается в обнаружении в нейтрофилах колоний бактерий (морул). Это достаточно простой и доступный способ диагностики анаплазмоза, однако он может быть малоэффективным при низком уровне паразитемии. Серологические методы, основанные на использовании антител к антигенам возбудителя анаплазмоза, имеют достаточно высокую чувствительность, однако не позволяют дифференцировать *A. phagocytophilum* от других видов анаплазм [6]. Преимуществом метода ПЦР в реальном времени является его быстрота, высокая чувствительность и видоспецифичность при условии правильно подобранных праймеров, а также возможность количественной оценки бактериальной нагрузки [11].

Целью данного исследования является разработка метода обнаружения *A. phagocytophilum* в крови зараженных животных на основе ПЦР в реальном времени.

Материалы и методы

Для разработки праймеров для ПЦР были использованы имеющиеся в базе данных Генбанк (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) последовательности гена *msp4* разных изолятов *A. phagocytophilum*, а также анаплазм *A. ovis*, *A. centrale*, и *A. marginale*. Консервативные участки *msp4*, специфичные для *A. phagocytophilum*, выяв-

Авторы / Authors

Архипова А.Л., м.н.с. отдела молекулярных биотехнологий, kamfora3@gmail.com

Ковальчук С.Н., кандидат биологических наук, врио директора, s.n.kovalchuk@mail.ru

ФГБНУ "Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий", г. Москва

Arkhipova A. L., Kovalchuk S.N.

лялись с помощью Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Образцы крови животных, инфицированных *A. phagocytophilum*, а также *A. platys* были любезно предоставлены Е.В. Радюк (Ветеринарная клиника "Свой доктор", Москва). ДНК выделяли с помощью набора Sorb-M (Синтол, Россия) согласно рекомендациям производителя. Амплификации гена *msh4* длиной 207 п.н проводилась на приборе LightCycler 96 ("Roche", Швейцария) в режиме реального времени в 10 мкл реакционной смеси qPCRmix- HS SYBR ("Евроген" Москва), содержащей по 0.2 мкМ праймеров *msh4Aph-D*: 5'- TTTAATTAGTGGATCCTCATTTGC-3' и *msh4Aph-R*: 5'- GGATCTGAAAYATTCAACGTGC-3', 3 мкл образца ДНК. Амплификация проводилась при следующих условиях: начальная денатурация 2 мин -95 °С, денатурация 15 сек - 95 °С, отжиг 15 сек - 62 °С элонгация 15 сек - 72 °С, 40 циклов.

Полученный в ПЦР фрагмент гена *msh4* длиной 207 п.н. лигировали в вектор pJET 1.2 (ThermoScientific, США) и клонировали в клетках *Escherichia coli* DH5. Целевые колонии инкубировали в течение ночи при 37 °С в 2 мл жидкой среды LB, содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Для выделения плазмидной ДНК использовали набор PlasmidMiniprep (Евроген, Москва). Концентрацию плазмидной ДНК определяли с помощью набора PicoGreen® dsDNAAssayKit ("ThermoFisherScientific", США) на флуориметре QuantiFluor-ST ("Promega", США). Секвенирование полученных плазмид pJET-*msh4* проводили методом Сэнгера с использованием набора ABI Prism BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit ("Applied Biosystems", США) и генетического анализатора Applied Biosystems 3130 ("Life Technologies", США).

Для оценки специфичности метода использовали ДНК, выделенную из крови животных, инфицированных анаплазмами *A. ovis*, *A. centrale*, *A. bovis* и *A. marginale*. Инфицированных животных выявляли с помощью методов, предложенных [1, 5, 10, 16].

Для определения аналитической чувствительности ПЦР была выполнена серия 10-кратных разведений плазмиды pJET-*msh4* и получены образцы, содержащие от 10⁸ до 10² копий фрагмента гена *msh4*.

Результаты исследований

На сегодняшний день предложено несколько методов на основе ПЦР для выявления *A. phagocytophilum* [4, 9, 12] (таблица 1). В методах, предложенном Pancholi [12] и Hildebrandt [9] в качестве мишени для ПЦР был выбран ген *p44(msh2)* и *16S rPHK*, соответственно, и используется электрофоретический способ анализа результатов ПЦР, что увеличивает время проведения исследования по сравнению с ПЦР в режиме реального времени. Методы Courtney [4] и Henningsson [8] основаны на гене *p44 (msh2)* и *gltA*, соответственно, и детекция продуктов ПЦР осуществляется с помощью флуоресцентно-меченых зондов (ПЦР в режиме реального времени), что ускоряет время проведения анализа, но увеличивает его стоимость.

Нами разработан метод выявления *A. phagocytophilum* на основе ПЦР в реальном времени с использованием

интеркалирующего красителя SYBR Green I, который сочетает в себе преимущества ПЦР с флуоресцентно-мечеными ДНК-зондами, но отличается большей экономичностью за счет использования более дешевого флуорофора. В качестве мишени для амплификации был выбран ген *msh4*, содержащий видоспецифичные для *A. phagocytophilum* участки ДНК. Праймеры *msh4Aph-D* и *msh4Aph-R* инициируют амплификацию фрагмента гена *msh4* длиной 207 п.н. (Рис. 1), детекция продукта ПЦР происходит по нарастанию флуоресценции по каналу красителя SYBR Green I (Рис. 2).

Для определения специфичности разработанного нами метода праймеры *msh4Aph-D* и *msh4Aph-R* были использованы для проведения ПЦР с ДНК животных, инфицированных другими видами анаплазм -*A. centrale*, *A. ovis*, *A. marginale*, *A. bovis* и *A. platys*. При проведении ПЦР-анализа был обнаружен подъем флуоресценции по каналу SYBR Green I только для образцов ДНК животных, инфицированных *A. phagocytophilum*, что свидетельствует о специфичности метода по отношению к этому патогену.

Для определения аналитической чувствительности метода была сконструирована плазида pJET-*msh4Aph* со встроенным фрагментом гена *msh4* длиной 207 п.н., и получены образцы плазмиды, содержащие 10²–10⁸ копий гена *msh4*. По результатам ПЦР с использованием полученных образцов в качестве матрицы была построена стандартная кривая, отражающая линейное отношение между количеством циклов ПЦР и исходным количеством копий гена *msh4* в реакционной смеси. Согласно полученным данным, чувствительность метода позволяет выявить от 100 копий гена *msh4* в исследуемом образце ДНК (Рис. 3).

Таким образом, нами была разработан метод выявления *A. phagocytophilum* на основе ПЦР в реальном времени. Чувствительность метода позволяет выявлять от 100 копий гена *msh4 A. phagocytophilum* в анализируемом образце. Специфичность метода позволяет надежно дифференцировать *A. phagocytophilum* от других видов анаплазм. Разработанный метод отличается специфичностью, быстротой анализа, а также возможностью количественной оценки бактериальной нагрузки. Преимуществом разработанного нами метода заключается в том, что детекция фрагмента гена *msh4 A. phagocytophilum* происходит непосредственно в процессе ПЦР по нарастанию флуоресценции по каналу красителя SYBR Green I, что значительно сокращает время диагностики по сравнению с "классической" ПЦР с электрофоретической детекцией результатов. При этом использование интеркалирующего красителя SYBR Green I значительно удешевляет ПЦР-диагностику по сравнению с методами ПЦР с использованием флуоресцентно-меченых ДНК-зондов. Метод может быть использован для обнаружения и

Рис 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР фрагмента гена *msh4 A. phagocytophilum* длиной 207 п.н. (-K- минус контроль; М- маркер).

количественной оценки *A. phagocytophilum* в образцах крови животных с целью подтверждения диагноза, при проведении эпизоотологического мониторинга анаплазмоза, вызванного *A. phagocytophilum*, а также для оценки эффективности лечения инфицированных животных.

Литература

1. Ковальчук С.Н., Бабий А.В., Архипова А.Л., Архипов А.В. Косовский Г.Ю. Оценка уровня паразитиии методом ПЦР в реальном времени при анаплазмозе крупного рогатого скота// Проблемы биологии продуктивных животных, 2016.-№3.- С. 98-105.
2. Alekseev, A. N., Dubinina, H. V., VanDePol, I. & Schouls, L. M. Identification of Ehrlichia

Таблица 1. Методы ПЦР в реальном времени

Ген	Праймеры, зонды	Длина фрагмента	Метод детекции	Ссылка
<i>16S rPHK</i>	Ap16S1f: 5'-CAAGCT TAACATGCAAGTCGAAC-3' Ap16S1r:5'-CCCTTCGGTTAAGAAGGATCTAATC-3'	944п.н.	Электрофоретический	[9]
<i>p44 (msh2)</i>	MSP3F: 5'-CCAGCGTTTAGCAAGATAAGAG-3' MSP3R: 5'-GCCAGTAACATCATAAG C-3'	334 п.н.	Электрофоретический	[12]
<i>p44 (msh2)</i>	ApMSP2f: 5'-ATGGAAGGTAGTGTGTGTTATG GTATT-3') ApMSP2r: 5'-TT GGTCTGAAGCGCTCGTA-3' Зонд ApMSP2p-HEX: 5'-TGGTGCCAGGG TTGAGCTTGAGATTG-3'	77п.н.	Флуоресцентный	[4]
<i>gltA</i>	ApF: 5'-TTTTGGGCGCTGAATACGAT-3' ApR: 5'- TCTCGAGGAATGATCTAATAA CGT -3' Зонд ApM: 5'-TGCTGAACAAGTTATG-3'	64 п.н.	Флуоресцентный	[3]

Рис.2. Динамика накопления амплифицированных фрагментов гена *msp4* *A. phagocytophilum* в ходе ПЦР в режиме реального времени для образцов ДНК, выделенной из крови зараженных животных. K+ – положительный контроль; K- – отрицательный контроль. Ось ординат – уровень флуоресценции, ось абсцисс – количество циклов ПЦР.

Рис 3. График зависимости цикла ПЦР от количества копий гена *msp 4* *A. phagocytophilum*

spp. and *Borrelia burgdorferi* in Ixodes ticks in the Baltic regions of Russia // J Clin Microbiol. 2001. - 39. -P. 2237-2242.

3. Henningsson A. J., Hvidsten D., Kristiansen, B.-E., Matussek A., Stuenkel S. and Jenkins A. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Ixodes ricinus ticks from Norway using a real time PCR assay targeting the *Anaplasma* citrate synthase gene *gltA* // BMC Microbiology, 2015 - Vol. 15. - P. 153

4. Courtney J.W., Kostelnik L.M., Zeidner N.S., Massung R.F. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* // J.Clin.Microbiol. 2004. Vol. 42. - P.316.

5. 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. - P. 606-611.

6. 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. Vol.12. -P. 1177-1183.

7. Granick J.L., Armstrong P.J., Bender J.B. *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000-2007) // J. Am. Vet. Med. Assoc. 2009. Vol. 234(12). - P. 1559-1565.

8. Henningsson A.J., Hvidsten D., Kristiansen B.E., Matussek A., Stuenkel S., Jenkins A. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Ixodes ricinus ticks from Norway using a real time PCR assay targeting the *Anaplasma* citrate synthase gene *gltA*. // BMC Microbiol. 2015, Vol15/ - P.153.

9. Hildebrand A., Schmidt K.H., Fingerle V., Wilske B., Straube E., 2002. Prevalence of granulocytic Ehrlichiae in Ixodes ricinus ticks in Middle Germany (Thuringia) detected by PCR and sequencing of a 16S ribosomal DNA fragment. FEMS Microbiology Letters 211, P. 225-230.

10. 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, Vol.72. - P. 1102-1109.

11. Massung RF, Slater KG. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Anaplasma phagocytophilum* // J Clin Microbiol. 2003. Vol. 41. - 717-722.

12. Pancholi P., Kolbert C.P., Mitchell P.D., Reed K.D. Jr., Dumler J.S., Bakken J.S., Telford S.R. 3rd, Persing D.H. Ixodes dammini as a potential vector of human granulocytic ehrlichiosis // J. Infect. Dis., 1995. Vol. 172(4). - P.1007-1012.

13. Rar V., Golovljova I. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and "Candidatus Neoehrlichia" bacteria: Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review // Infection, Genetics and Evolution. 2011. Vol. 11(8). - P. 1842-1861.

14. Rar V.A., Livanova N.N., Panov V.V., Doroshenko E.K., Pukhovskaya N.M., Vysochina N.P., Ivanov L.I. Genetic diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia* in the Asian part of Russia // Ticks Tick Borne Dis. 2010. Vol. 1(1). - P. 57-65.

15. Stuenkel S., Granquist, E.G., Silaghi, C. *Anaplasma phagocytophilum* - a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2013. Vol. 3- P. 31.

16. 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.

17. Woldehiwet Z. *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants in Europe. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2006. 1078, 446-460.