DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-4-3

УДК 636.2:619:579.881.31:577.21:579.083.1

Метод ПЦР в реальном времени для выявления *Anaplasma marginale*

Архипова А.Л.
Arkhipova A.L.

Архипова А.Л., младший научный сотрудник отдела молекулярных биотехнологий, kamfora3@gmail.com
Бабий А.В., к.б.н., научный сотрудник отдела молекулярных биотехнологий, anna.babii@yahoo.com
Ковальчук С.Н., к.б.н., врио директора, s.n.kovalchuk@mail.ru

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий", 127422, Москва, ул. Костякова, дом 12, стр. 4, e-mail: info-ccerb@mail.ru

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

Резюме: Анаплазмоз крупного рогатого скота – трансмиссивное инфекционное заболевание, вызываемое риккетсиями *Anaplasma marginale* (отряд Rickettsiales, семейство Anaplasmataceae). Анаплазмоз крупного рогатого скота приносит значительный экономический ущерб животноводческим хозяйствам вследствие потерь молочной и мясной продуктивности и гибели скота. Летальность при анаплазмозе крупного рогатого скота находится в пределах от 10–30% до 100%, в зависимости от географического региона и уровня распространения клещей – основных переносчиков возбудителя анаплазмоза. Решающую роль в предотвращении распространения анаплазмоза крупного рогатого скота играет раннее выявление инфицированных животных. Наиболее оперативную и точную диагностическую информацию позволяет получить прямое выявление ДНК патогена с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), однако чувствительность и специфичность данного метода зависит от выбора ДНК-мишени, структуры праймеров и условий проведения ПЦР.

Целью данного исследования была разработка метода ПЦР в реальном времени с флуоресцентно-меченым зондом TaqMan для выявления *A. marginale* в крови крупного рогатого скота (КРС). Чувствительность метода позволяет выявлять единичные копии ДНК *A. marginale* в анализируемом образце. Специфичность метода позволяет надежно дифференцировать *A. marginale* от других видов анаплазм, таких как *A. ovis*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. phagocytophilum* и *A. platys*. Разработанная рекомбинантная плазмида, содержащая ДНК *A. marginale*, может быть использована для определения уровня паразитемии у КРС, инфицированного *A. marginale*. Разработанный нами метод может быть ис-

Real-time PCR for detection of *Anaplasma marginale*

Arkhipova A.L., Babii A.V., Kovalchuk S.N.

FSBI Center of experimental embryology and reproductive biotechnologies, 127422, Moscow, Russian Federation, тел.: 84956102131; e-mail: info-ccerb@mail.ru

Key words: cattle; anaplasmosis; *Anaplasma marginale*; real-time PCR

Abstract. Bovine anaplasmosis is a transmissible tick-borne infectious disease of cattle caused by *Anaplasma marginale* (Rickettsiales, Anaplasmataceae). Bovine anaplasmosis causes significant economic damage to livestock farms due to loss of dairy and meat productivity as well as mortality in cattle herds. Mortality due to bovine anaplasmosis ranges from 10-30% to 100%, depending on the geographic region and the prevalence of ticks - the main vectors of the disease. Earlier detection on infected animals plays a crucial role in preventing the distribution of bovine anaplasmosis. Direct detection of pathogen's DNA by a polymerase chain reaction is the most rapid and accurate diagnostic method, but its sensitivity and specificity depends on choose of a proper DNA target, structure of primers and PCR conditions. The aim of the study was development of real-time PCR with TaqMan probe for detection of *A. marginale* DNA in bovine blood. The sensitivity of the developed method allows to identify single copy of *A. marginale* in an analyzed sample. The specificity of the method allows differentiation of *A. marginale* from other *Anaplasma* species, including *A. ovis*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. phagocytophilum* and *A. platys*. The developed recombinant plasmid with *A. marginale* gene can be used for determination of parasitemia level in *A. marginale*-positive cattle. The developed by us method can be used to detect and quantify *A. marginale* in blood samples of infected animals in order to confirm the diagnosis, for epizootological monitoring of bovine anaplasmosis, for evaluation of the efficacy of antirickettsial drugs and anaplasmosis vaccines.

пользован для обнаружения и количественного определения *A. marginale* в образцах крови КРС с целью подтверждения диагноза, при проведении эпизоотологического мониторинга анаплазмоза КРС, оценки эффективности лечения инфицированных животных и вакцин против анаплазмоза КРС.

Введение

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

Для цитирования / For citation

Архипова А.Л. Метод ПЦР в реальном времени для выявления *Anaplasma marginale* / А.Л. Архипова, А.В. Бабий, С.Н. Ковальчук С.Н. // Ветеринария и кормление. – М., 2019 - № 4 – С. 11 -14.
Arkhipova A.L. Real-time PCR for detection of *Anaplasma marginale* / A.L. Arkhipova, A.V. Babii, S.N. Kovalchuk // Veterinary i kormlenie. - 2019 - № 4. - P. 13-15.

Анаплазмоз крупного рогатого скота приносит значительный экономический ущерб животноводческим хозяйствам вследствие потерь молочной и мясной продуктивности и гибели скота – летальность при анаплазмозе КРС находится в пределах от 10 – 30% до 100 %, в зависимости от географического региона и уровня распространения клещей – основных переносчиков возбудителя анаплазмоза [27]. По имеющимся оценкам, ежегодные экономические потери от анаплазмоза крупного рогатого скота только в США и Танзании составляют около 300 и 47,3 миллиона долларов, соответственно [11, 21 19]. Специальных исследований по точному определению экономического ущерба от рассматриваемых болезней в нашей стране, к сожалению, проведено мало. По имеющимся предварительным оценкам, ежегодный экономический ущерб от снижения молочной продуктивности коров только в Калининградской области составляет свыше 2 млн. рублей [9].

Анаплазмоз КРС зарегистрирован во многих тропических и субтропических странах, распространен фактически по всей территории США, а также в некоторых странах Европы, главным образом средиземноморских [20, 13]. В Российской Федерации за последние 10 – 15 лет значительно расширился нозоареал анаплазмоза крупного рогатого скота в первую очередь вследствие изменения ареала обитания клещей в условиях меняющегося климата [4]. 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 [1, 2, 3, 7, 8]. Случаи заболевания КРС анаплазмозом были зарегистрированы на территории Московской области [5].

Решающую роль в предотвращении распространения анаплазмоза крупного рогатого скота играет своевременная диагностика. Многообразие клинических проявлений анаплазмоза затрудняет его диагностику. В качестве основных методов диагностики анаплазмоза крупного рогатого скота используют микроскопические исследования мазков крови животных и серологические методы. Однако результаты микроскопических исследований мазков крови, окрашенных по методу Романовского-Гимза, ненадежны на ранних стадиях инфицирования и в случаях заболеваний, сопровождающихся тяжелой формой анемии [20]. Серологические методы, основанные на использовании антител к антигенам возбудителя анаплазмоза, не позволяют дифференцировать *A. marginale* от непатогенных для крупного рогатого скота видов анаплазм [16, 25].

Наиболее оперативную и точную диагностическую информацию позволяет получить выявление ДНК возбудителей анаплазмоза в крови КРС с помощью 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. Преимуществом метода ПЦР в реальном времени перед "классической" ПЦР заключается в том, что регистрация накопления ДНК происходит непосредственно в процессе ПЦР, то есть 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.

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

Материалы и методы

ДНК выделяли из цельной крови КРС (n=124) с помощью набора Sorb-M (Синтол, Россия) согласно рекоменда-

циям производителя. Поиск КРС, инфицированных *A. marginale* проводили с использованием методики ПЦР, предложенной Torina с соавторами (2012). Для подбора праймеров к гену *msp1a* были использованы имеющиеся в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) полноразмерные последовательности *msp1a* *A. marginale*. Выявление консервативных участков гена для подбора праймеров проводили с помощью программы Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Видоспецифичность праймеров была проверена 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'-TGTTTGAACCTAGGCTTATAG-3' (0,5 мкМ), праймер MSP1a-R 5'-CTTCTGCTGATCTTCCTGTCTC-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 °С; последующие 45 циклов амплификации (денатурация при 95 °С в течение 15 с, отжиг праймеров при 60 °С в течение 15 с, элонгация при 72 °С 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

Рисунок 1. Кривые накопления амплифицированной ДНК *A. marginale* в ходе ПЦР в режиме реального времени для образцов крови зараженных животных. К+ – положительный контроль; К- – отрицательный контроль. Ось ординат – уровень флуоресценции, ось абсцисс – количество циклов ПЦР.

Figure 1. Curves of accumulation of the amplified fragments DNA of *A. marginale* in real-time PCR for blood samples of infected animals. K+ – positive control; K- – negative control. The ordinate axis is the level of fluorescence; the abscissa axis is the number of PCR cycles.

Рисунок 2. График зависимости цикла ПЦР (Ct) от количества копий ДНК *A. marginale*

Figure 2. Graph of PCR cycle versus number of copy numbers of the *A. marginale* DNA

Kit (Life technologies, USA), лигирован в вектор pGEM-T (Promega, США) и клонирован в клетках *E. coli* DH5 α . 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 pGEM-msp1a проводили методом Сэнгера (Евроген, Москва).

Для определения аналитической чувствительности ПЦР была выполнена серия десятикратных разведений плазмиды pGEM-msp1 α , и получены образцы, содержащие 10⁶–10⁰ копий гена msp4 и построена стандартная кривая. Для ее построения была проведена серия 10-кратных разведений стандартной плазмиды pGEM-msp1 α с известной концентрацией, и полученные образцы pGEM-msp4 были использованы в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени с использованием разработанных нами праймеров и флуоресцентно-меченого зонда, как описано выше.

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 [26], Decaro [15], Kawahara [18], de la Fuente [13] и Inokuma [17]. Образцы крови животных, инфицированных *A. platys* и *A. phagocytophilum*, были любезно предоставлены Е.В. Радюк (Ветеринарная клиника "Свой доктор", Москва).

Результаты и обсуждение

Нами разработан метод выявления возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота методом ПЦР в реальном времени. На сегодняшний день известно несколько тест-систем на основе ПЦР в реальном времени для детекции *A. marginale* однако ни один из них не лишен недостатков, которые в связаны с выбором мишени для ПЦР и способа получения и анализа результатов. В методе, предложенном Reinbold с соавторами [24], 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 [22, 23]. Недостатком этих методов является использование неспецифической система 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 соавторами [12], был ген msp1 β . Однако геном *A. marginale* содержит две полноразмерные и три укороченные копии гена msp1 β [10], поэтому данный метод не может быть использован для точной оценки паразитемии у животных, инфицированных *A. marginale*.

В качестве мишени для ПЦР мы использовали фрагмент гена msp1a (major surface protein 1a) *A. marginale*. Ген msp1a представлен в геноме *A. marginale* в одной копии [10], что делает его подходящим для точной оценки бактериальной нагрузки. Ген msp1a *A. marginale* содержит высоко вариабельный 5'- терминальный участок и консервативный для всех известных изолятов *A. marginale* 3'- концевой фрагмент [14]. Для разработки праймеров и флуоресцентно- меченого зонда нами был использован высоко консервативный 3'- концевой фрагмент гена msp1a *A. marginale*.

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 ранее с помощью метода, предложенного Torino [26]. Были подобраны оптимальные условия для амплификации и детекции фрагмента гена длиной 207 п.н. Во всех образцах ДНК инфицированных коров наблюда-

лось экспоненциальное нарастание флуоресценции (Рис. 1). Секвенирование полученных ампликонов показало, что они имеют 99–100 % идентичности с фрагментами гена msp1a из базы банных GenBank.

Для испытания аналитической специфичности праймеров и зонда использовались 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 от зараженных *A. marginale* животных и отсутствие каких-либо продуктов ПЦР при анализе результатов методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле, что свидетельствует о видоспецифичности праймеров и зонда. Для определения аналитической чувствительности ПЦР была сконструирована плазида pGEM-msp1a, содержащая фрагмент гена msp1a длиной 207 п.н., и получены образцы, содержащие 106 ? 100 копий msp1a. По результатам ПЦР чувствительность метода с разработанными праймерами и зондом позволила выявить единичные копии гена msp1a (Рис. 2). Эффективность реакции составила 1.9.

Таким образом, нами разработан метод ПЦР в реальном времени с флуоресцентно-меченым зондом для обнаружения и количественного определения *A. marginale* в образцах крови инфицированного крупного рогатого скота. Чувствительность метода позволяет выявлять от одной копии ДНК *A. marginale* в анализируемом образце, а специфичность – надежно дифференцировать *A. marginale* и непатогенные для КРС виды анаплазм *A. ovis*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. phagocytophilum* и *A. platys*. Метод может быть использован для подтверждения диагноза, а также при проведении эпизоотологического мониторинга анаплазмоза крупного рогатого скота.

Литература

1. Георгию Х., Белименко В.В. Анаплазмоз крупного рогатого скота // РВЖ. Сельскохозяйственные животные. - 2015. - №1. - С. 5–7. <http://cyberleninka.ru/article/n/anaplazmoz-kрупного-rogatogo-skota>
2. Гулюкин М.И., Заблочкий В.Т., Белименко В.В. Мониторинг эпизоотической ситуации по протозойным кровепаразитарным болезням домашних животных в Российской Федерации (2007–2012) // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. - 2013. - № 2. - С. 36–40
3. Казаков Н.А., Идина М.Ф. Анаплазмоз крупного рогатого скота в Тверской области // Ветпатология. - 2009. - №2. - С.72–75.
4. Казакова Е.В., В.В. Ясюкевич, И.О. Попов, С.М. Семенов. Распространение клещей *Ixodes ricinus* L., 1758 и *Ixodes persulcatus* Schulze, 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. 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 // Сельхозбиология, 2015, том 50, № 6, с. 825–831.
7. Либерман Е.Л., Хлызова Т.А. Зависимость инвазирования крупного рогатого скота анаплазмозом от численности насекомых комплекса "Гнус" // Educatio. - 2015. ? № 3. - С. 46–50.
8. Мальцева О.Е. Анаплазмоз крупного рогатого скота в Центральном регионе РФ (эпизоотология, вакцинопрофилактика, химиотерапия и меры борьбы): Автореферат диссертации канд. биол. наук/ ВИЭВ им. Я.Р.Коваленко. М., 2004 г. - 15 с.
9. Минасян В.Г., Ткаченко Ю.Г., Идина М.Ф. Методы лечения коров больных анаплазмозом // Ветеринарная патология. - 2009. - № 4. - С. 82–85.
10. 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 - Vol. 102. P. 844–849.
11. Brown C.G. Dynamics and impact of tick-borne diseases of cattle / Trop Anim Health Prod. - 1997 - Vol 29:1S–3S.
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., 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. -V. 6. - P. 75–89.
14. de la Fuente, J., Ruybal, P., Mtshali, M.S., Naranjo, V., Shuqing, L., Mangold, A.J., Rodriguez, S.D., Jimenez, R., Vicente, J., Moretta, R., Torina, A., Almazan, C., Mbatia, P.M., de Echaide, S.T., Farber, M.,

- Rosario-Cruz, R., Gortazar, C., Kocan, K.M. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences // *Vet Microbiol* - 2007 - Vol. 119, P. 382-390.
15. 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.
16. 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.
17. 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. - Vol. 38, P. 4219-4221.
18. 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.
19. Kivaria, F.M. (2006) Estimated direct economic costs associated with tick-borne diseases on cattle in Tanzania. *Trop Anim Health Prod* 38, 291-299.
20. 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 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19811876>)
21. Kocan, K. M., J. 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. - Vol. 16. - P. 698-712.
22. Lohr 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.
23. Picoloto G., Lima R. F., Oleg?rio L. A., Carvalho C. M., Lacerda A. C., Tomas 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.
24. 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.
25. 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. - Vol. 14. P. 262-268.
26. Torina, A., Agnone, A., Blanda, V., Alongi, A., D'Agostino, R., Caracappa, S., Marino, A.M., DiMarco, 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. - Vol. 3. -P. 283-287.
27. Wall D.T. Anaplasmosis control and diagnosis in South Africa // *Ann N Y Acad Sci.* - 2000. - № 916. - P. 474-83.