DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-6-2
УДК 619.616.993.192.6

Клонирование и экспрессия рекомбинантного полипептида на основе белка MSP1 β *Anaplasma marginale* в *Escherichia coli*

Ковальчук С.Н.
Kovalchuk S. N.

Ковальчук С.Н., к.б.н., врио директора,
s.n.kovalchuk@mail.ru

Федорина Е.А., к.б.н., старший научный сотрудник,
efedorina@inbox.ru

Бурсаков С.А., к.б.н., старший научный сотрудник,
sergeymoscu@gmail.com

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

Ключевые слова: крупный рогатый скот; анаплазмоз; *Anaplasma marginale*; рекомбинантный антиген; MSP1 β

Резюме. Анаплазмоз крупного рогатого скота – трансмиссивное инфекционное заболевание, вызываемое риккетсиями *Anaplasma marginale* (порядок Rickettsiales, семейство Anaplasmataceae), приносящее значительный экономический ущерб животноводческим хозяйствам вследствие потерь молочной и мясной продуктивности и гибели скота. Анаплазмоз КРС зарегистрирован во многих тропических и субтропических странах. В Российской Федерации неблагополучными по анаплазмозу являются южные районы России, Тверская, Тюменская, Кировская области. Решающую роль в предотвращении распространения анаплазмоза крупного рогатого скота играет раннее выявление инфицированных животных. Ряд белков наружной мембраны *A. marginale*, такие как MSP1 α , MSP1 β , MSP2, MSP3, MSP4, MSP5 и VirB9 и VirB10, были охарактеризованы как потенциальные кандидаты на роль антигенов для разработки методов серологической диагностики анаплазмоза крупного рогатого скота и вакцин против анаплазмоза КРС. На сегодняшний день для выявления животных, инфицированных *A. marginale*, широко используется ИФА на основе рекомбинантного антигена MSP5. Недостатком данного метода является его низкая специфичность вследствие перекрестной реактивности с *A. ovis*, *A. centrale* и *A. phagocytophilum*, что не позволяет дифференцировать *A. marginale* и эти непатогенные для крупного рогатого скота виды анаплазм. Целью данной работы была разработка и получение специфичного для *A. marginale* рекомбинантно-

Cloning and expression of the recombinant polypeptide based on the *Anaplasma marginale* MSP1 β protein in *Escherichia coli*

Kovalchuk S. N.,
Fedorina E.A.,
Bursakov S.A.

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

Key words: cattle; anaplasmosis; *Anaplasma marginale*; recombinant antigen; MSP1 β

Abstract. Bovine anaplasmosis is a transmissible infectious disease caused by *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae), causing significant economic losses in many countries due to the high morbidity and mortality in cattle herds. Bovine anaplasmosis was registered in many tropical and subtropical countries. In Russian Federation the most disadvantaged regions for anaplasmosis are the southern regions of Russia, Tver, Tyumen, and Kirov regions. Earlier detection of infected animals plays a crucial role in preventing the distribution of bovine anaplasmosis. A number of outer membrane proteins, such as MSP1 α , MSP1 β , MSP2, MSP3, MSP4, MSP5 and VirB9 and VirB10, have been described as potential candidates for the role of antigens for the development of serological methods of bovine anaplasmosis diagnosis and vaccines against bovine anaplasmosis. To date, ELISA based on the recombinant MSP5 antigen is the widely used method for detection of animals infected with *A. marginale*. The disadvantage of this assay is its low specificity due to cross-reactivity with *A. ovis*, *A. centrale* and *A. phagocytophilum*, that does not allow differentiation of *A. marginale* and these non-pathogenic for cattle *Anaplasma* species. The aim of this work was to develop and obtain a specific for *A. marginale* recombinant polypeptide to use it as an antigen in serological method of *A. marginale* detection. A plasmid containing three fragments of the *A. marginale* msp1 β gene was constructed, expressed in *Escherichia coli* cells, and a recombinant polypeptide with a molecular weight of 26 kDa was obtained in the insoluble fraction of *E. coli* lysate. Purification of the recombinant protein was performed using affinity chromatography with Ni-NTA-Sepharose. The obtained recombinant polypeptide could be used to develop highly specific serological method for *A. marginale* detection.

го полипептида для его использования в дальнейшем в качестве антигена при разработке высокоспецифичных серологических методов выявления *A. marginale*. Была получена плаزمид, содержащая три фрагмента гена msp1 β *A. marginale*, проведена ее экспрессия в клетках *Escherichia coli* и получен рекомбинантный полипептид с молекулярной массой 26 кДа в нерастворимой фракции лизата *E. coli*. Очистку рекомбинантного белка проводили с помощью аффинной хроматографии с помощью Ni-NTA-сефарозы. Полученный нами рекомбинантный полипептид на основе белка MSP1 β может быть использован для разработки высокоспецифичных серологических методов выявления *A. marginale*.

Для цитирования / For citation

Ковальчук, С.Н. Клонирование и экспрессия рекомбинантного полипептида на основе белка MSP1 β *Anaplasma marginale* в *Escherichia coli*. Ковальчук С.Н., Федорина Е.А., Бурсаков С.А. // Ветеринария и кормление. – 2019. №6. С. 15–17.

Kovalchuk, S.N. Cloning and expression of the recombinant polypeptide based on the *Anaplasma marginale* MSP1 β protein in *Escherichia coli*. Kovalchuk, S.N. Fedorina E.A., Bursakov S.A. // Veterinaria i kormlenie. – 2019. №6. P. 15–17.

Введение

Anaplasma marginale (порядок Rickettsiales, семейство Anaplasmataceae), облигатный внутриэритроцитарный патоген, является возбудителем анаплазмоза крупного рогатого скота, распространённого по всему миру и наносящего серьёзный экономический ущерб [1, 11]. Было показано, что иммунизация животных очищенными наружными мембранами вызывает защиту от острой инфекции *A. marginale* [24]. Ряд белков наружной мембраны (MSP - major surface proteins), такие как MSP1 α , MSP1 β , MSP2, MSP3, MSP4, MSP5 и VirB9 и VirB10, были охарактеризованы как потенциальные кандидаты на роль антигенов для производства вакцин против *A. marginale* и для серологической диагностики анаплазмоза крупного рогатого скота [19, 12, 25].

Белки MSP1 α (105 кДа) и MSP1 β (100 кДа) образуют комплекс MSP1 и являются адгезинами для эритроцитов KPC [13, 14]. При этом белок MSP1 α является адгезином *A. marginale* как для бычьих эритроцитов, так и для клеток клещей - основных переносчиков анаплазм, в то время как MSP1 β является адгезином исключительно для эритроцитов KPC [5]. MSP1 α кодируется одним геном *msh1* α у всех штаммов *A. marginale*, тогда как белок MSP1 β кодируется несколькими генами (*msh1* β 1 и *msh1* β 2) [19]. Все штаммы *A. marginale* содержат консервативный эпитоп, распознаваемый моноклональными антителами [20, 3]. Белковый комплекс MSP1 индуцирует интенсивную пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови и CD4⁺ Т-клеток у крупного рогатого скота, инокулированных гомологичными и гетерологичными изолятами *A. marginale* [18, 4]. Пролиферация мононуклеарных клеток связана с участием консервативных эпитопов Т-клеток, которые стимулируют повышение уровня интерферона γ .

На сегодняшний день разработано несколько иммунологических методов для выявления животных, инфицированных *A. marginale*, такие как реакция связывания комплемента (complement fixation - CF) [7], пластинчатая реакция агглютинации [15], иммуноферментный анализ (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) [7, 16, 10] и непрямой метод флуоресцирующих антител (indirect fluorescent antibody test (IFAT) [22]. Конкурентный иммуноферментный анализ (C-ELISA) с использованием рекомбинантного антигена rMSP5 и MSP5-специфичных моноклональных антител (MAb) является наиболее чувствительным методом для выявления инфицированных животных [9, 21, 23]. Белок MSP5 (семейство SCO1/SenC) обнаружен у всех риккетсий (Rickettsiales). Все протестированные штаммы *A. marginale*, а также *A. centrale*, *A. ovis* и *A. phagocytophilum*, экспрессируют антиген MSP5 и индуцируют выработку у крупного рогатого скота антител против иммунодоминантного эпитопа, распознаваемого MSP5-специфичными MAb [6]. Недостатком данного метода является его низкая специфичность вследствие перекрёстной реактивности с *A. ovis*, *A. centrale* и *A. phagocytophilum*, что не позволяет дифференцировать *A. marginale* и эти непатогенные для крупного рогатого скота виды анаплазм [6, 23].

Целью работы была разработка и получение рекомбинантного полипептида на основе белка MSP1 β , который в дальнейшем может быть использован как антиген для разработки высокоспецифичных серологических методов выявления *Anaplasma marginale*.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы *E. coli* DH5 α и Rosetta (DE3). Штаммы культивировали на среде LB без антибиотиков или с добавлением 100 мкг/мл ампициллина. В качестве вектора для клонирования и экспрессии использовали плазмиду pET22b(+) (Novagen, США).

Ампликоны фрагментов гена *msh1* β *A. marginale* получали с помощью ПЦР, для чего были сконструированы три пары праймеров. Для анализа гена *msh1* β были использованы последовательности, принадлежащие разным изолятам *A. marginale* доступные в базе данных GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Праймеры содержали на 5'-концах сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции, исполь-

зуемые для клонирования ампликонов. В качестве матрицы в ПЦР использовалась ДНК, выделенная из образца крови коровы, инфицированной *A. marginale*, что было подтверждено результатами ПЦР и секвенированием [2].

Продукты PCR анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, визуализировали с помощью UV (трансиллюминатор). Фрагменты ДНК выделяли из геля с помощью Cleanup Mini Kit (Евроген, Россия).

Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия). Рестрикцию и лигирование фрагментов ДНК проводили с помощью соответствующих эндонуклеаз рестрикции и T4 ДНК-лигазы согласно рекомендациям производителей.

Трансформацию *E. coli* проводили методом теплового шока. Поиск колоний *E. coli*, содержащих плазмиду с целевой вставкой, проводили методом ПЦР с использованием пары стандартных праймеров T7dir, T7rev. Секвенирование проводилось по методу Сэнгера (Евроген, Россия).

Получение и очистка рекомбинантного полипептида. Ночную культуру клеток *E. coli* Rosetta, содержащих рекомбинантную плазмиду pET22b-rBeta, выращивали при 37°C в 5 мл среды LB с 100 мкг/мл ампициллина. Затем культуру пересевали в разведении 1:100 в свежую среду LB, содержащую антибиотик, и выращивали при 37°C до ОП600 = 0,6, после чего в нее вносили изопропил- β -D-1-тиогалактопириозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ для индукции экспрессии. Культуру инкубировали в течение 16 часов при 30°C с интенсивной аэрацией, клетки осаждали центрифугированием (5000 об./мин, 15 мин) и хранили при -20°C для последующего выделения белков. Часть биомассы анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли. Клетки суспендировали в 300 мкл буфера Трис HCl pH 7.5 с 100мМ фенилметилсульфонил фторида (PMSF) и разрушали с помощью ультразвука на Q125 соникаторе (Qsonica, USA). Дебрис осаждали центрифугированием.

Выделение и очистку рекомбинантного полипептида из биомассы клеток *E. coli* осуществляли с помощью аффинной хроматографии на колонке с Ni-NTA-сефарозой.

Результаты и обсуждение

На основании анализа последовательностей гена *msh1* β , кодирующего белок внешней мембраны *A. marginale*, нами были подобраны праймеры для получения фрагментов гена, способных выступать в роли антигена. Для последующего клонирования ампликонов на 5'-концах каждого праймера был внесен сайт узнавания рестриктазой. Ампликон фрагмента 1 (269 п.о.) был вырезан из агарозного геля, очищен, после чего обработан эндонуклеазами рестрикции NcoI и BamHI. По тем же сайтам рестрикции фрагмент встраивали в экспрессирующий вектор pET22b(+) с помощью ДНК-лигазы фага T4. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* DH5 α . Полученные ампициллин-резистентные клоны анализировали с помощью ПЦР на наличие рекомбинантных плазмид с целевой вставкой. Из положительных клонов выделяли плазмидную ДНК. Одна из полученных рекомбинантных плазмид pET22b(+)-fr1 использовалась в дальнейшем в качестве вектора. Амплифицированный фрагмент 2 гена *msh1* β был клонирован в этой плазмиде по сайтам рестрикции BamHI Sall. На следующем этапе работы была использована одна из полученных таким образом рекомбинантных плазмид pET22b(+)-fr1-fr2, содержащая оба фрагмента гена. Фрагмент 3 *msh1* β был встроен в нее по сайтам Sall XhoI. После трансформации *E. coli* из ПЦР-положительных клонов, несущих вставку, состоящую из трех фрагментов гена *msh1* β , была выделена плазмидная ДНК. Было обнаружено три клон с плазмидой, содержащих целевую вставку. Структура вставки была подтверждена с помощью секвенирования.

Отобранные по результатам секвенса гибридные плазмиды, названные pET22-rBeta, исследовали на способность продуцировать рекомбинантный полипептид. Для этого был использован штамм *E. coli* Rosetta (DE3), в который перенесли гибридную конструкцию с помощью транс-

Рис.1. Электрофореграмма в полиакриламидном геле лизатов клеток *E. coli* Rosetta (DE3). 1 - *E. coli* Rosetta без плазмид (контроль); 2 - *E. coli* Rosetta (pET22b (+)); 3 - *E. coli* Rosetta (pET22-rBeta) клон 1, выращенный без индукции; 4, 5, 7 - 10 - клоны 1-3 *E. coli* Rosetta (pET22-rBeta), выращенные с индукцией ИПТГ; 4, 7, 9 - растворимая фракция лизатов клеток; 5, 8, 10 - нерастворимая фракция; 6 - белки-стандарты молекулярных масс, кДа.

Figure.1. SDS-PAAG electrophoregram of *E. coli* Rosetta(DE3) cell lysates. 1 - *E. coli* Rosetta without plasmids (control); 2 - *E. coli* Rosetta with plasmid pET22b (+); 3 - *E. coli* Rosetta with plasmid pET22-rBeta without IPTG induction; 4, 5, 7 - 10 - *E. coli* Rosetta (pET22-rBeta) with IPTG induction: 4, 7, 9 - soluble fractions of *E. coli* cell lysates; 5, 8, 10 - insoluble fractions of *E. coli* cell lysates; 6 - Protein markers, kDa.

формации. Выбранные клоны, содержащие рекомбинантную плазмиду pET22-rBeta, исследовали на индуцируемую продукцию рекомбинантного полипептида методом электрофореза лизатов клеток в полиакриламидном геле. Пример такого анализа представлен на рис.1. После индукции ИПТГ синтез продукта наблюдался в трех исследованных клонах. Молекулярная масса рекомбинантного белка составляла примерно 26кДа, что соответствовало расчетной. Для определения локализации рекомбинантного полипептида электрофорезу подвергали растворимую и нерастворимую фракции клеток, разделенных центрифугированием. По результатам электрофореза, целевой полипептид выявлен главным образом в нерастворимой фракции (тельцах включения) (рис.1).

На следующем этапе работы был получен очищенный полипептид. Клонированный рекомбинантный полипептид содержит на С-конце шесть остатков гистидина (6His-tag), что позволяет выделение и очистку с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии. Для выделения поли-

пептида из тельц включения биомассу клеток двукратно промывали после ресуспендирования в 10 mM Tris-HCl буфере, pH 8.0 и разрушали на Q125 соникаторе (Qsonica, USA) (22 кГц, 15 мин) в присутствии 2 M NaCl, 10 mM дитиотрейтола (DTT) и 1 mM фенолметилсульфонил фтора (PMSF).

Смесь инкубировали в течение 1,5 часов при комнатной температуре и повторяли обработку ультразвуком. Супернатант удаляли и осадок, содержащий тельца включения, промывали 50 mM TrisCl-фосфатным буфером pH 8,5 с последующим растворением в 15 мл 8 M мочевины, содержащей 50 mM TrisCl-фосфатный буфер pH 8,5 и 1 mM DTT. Растворенный полипептид, наносили на колонку (GE Healthcare HisTrap™ HP, Fisher Scientific).

После соответствующего промывания буфером для нанесения 50 mM TrisCl-фосфатным буфером pH 8,0, содержащего 8M мочевины, и 50 mM TrisCl-фосфатным буфером pH 6,3 с 8M мочевиной для промывания, полипептид смывали 50 mM TrisCl-фосфатным буфером pH 4,5 с 8M мочевиной и концентрировали на центрифуге 10000 (Amicon Ultra-4, Merck). Очищенный полипептид анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле для определения его чистоты и гомогенности (рис. 2).

Таким образом, была сконструирована рекомбинантная плазмиды на основе вектора pET22b(+), содержащая три последовательно клонированных фрагмента гена *mvp1β*, кодирующего белок внешней мембраны *A. marginale*, и способная к эффективной экспрессии рекомбинантного полипептида в *E. coli*. Был получен и очищен рекомбинантный полипептид на основе белка MSP1β, который может быть использован для последующей разработки высоко-специфичных серологических методов выявления *Anaplasma marginale*.

Литература

1. Гулюкин, М.И. Кровепаразитарные болезни домашних животных (Атлас) / В.Т. Заблоцкий, В.В. Белименко, П.И.Христиановский, А.Р. Саруханян // ЗооВетКнига. - М., 2013. - С. 86.
2. 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
3. Allred, D.R., McGuire, T.C., Palmer, G.H., Leib, S.R., Harkins, T.M., McElwain, T.F., Barbet, A.F. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale* // Proc. Natl. Acad. Sci. -1990. - 87, 3220-3224.
4. Brown WC, McGuire TC, Zhu D, Lewin HA, Sosnow J, Palmer GH Highly conserved regions of the immunodominant major surface protein 2 of the genogroup II ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* are rich in naturally derived CD4+ T lymphocyte epitopes that elicit strong recall responses // J Immunol. - 2001. - 15. - 1114-1124.
5. De la Fuente, J., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., Kocan, K.M. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells // Int. J. Parasitol. - 2001. - 31. - 145-153.
6. Dreher U.M., de la Fuente J., Hofmann-Lehmann R., Meli M.K., Pusterian N., Kocan K.M., Woldehiwet A., Regula G., Staerk K.D.C. Serologic cross reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum* // Clin. Vaccine. Immunol. - 2005. - 12. - 1177-1183.
7. Duzgun A, Schuntner CA, Wright IG, et al. A sensitive ELISA technique for the diagnosis of *Anaplasma marginale* infections // Vet Parasitol. - 1988. 29. - 1-7.
8. Gonzalez EF, Long RF, Todorovic RA. Comparisons of the complement-fixation, indirect fluorescent antibody, and card agglutination tests for the diagnosis of bovine anaplasmosis. // Am J Vet Res. - 1978. - 39. - 1538-1541.
9. Hofmann-Lehmann R., Meli M.K., Dreher U.M., Goncz E., Deplazes

Рис.2. SDS ПААГ электрофореграмма белков из лизатов клеток *E. coli* (pET22-rBeta), продуцирующих рекомбинантный полипептид. 1 - грубый экстракт клеток *E. coli* Rosetta (pET22-rBeta); 2 - очищенный рекомбинантный полипептид после промывания тельц включения и очистки с помощью Ni-хелатной хроматографии; 3 - белки стандарты молекулярной массы, кДа (Thermo scientific).

Figure 2. SDS-PAAG electrophoregram of proteins from *E. coli* (pET22-rBeta) cells lysates with the recombinant polypeptide. 1 - Crude extract of *E. coli* Rosetta (pET22-rBeta) cells; 2 - purified recombinant polypeptide after washing of inclusion bodies and affinity chromatography with Ni-NTA-Sepharose; 3 - Protein markers, kDa (Thermo scientific).

- P., Braun U., Engels M., Schupbach J., Jorger K., Thoma R., Griot C., Stark K.D.C., Willi B., Schmidt J., Kocan K.M., Lutz H. Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal haemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland // J. Clin. Microbiol. - 2004. - 42. - 3775-3780.
10. Knowles D, Torioni de Echaide S, Palmer G, et al. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle // J Clin Microbiol. 1996. - 34. - 2225-2230.
11. Kocan, K.M., de la Fuente, J., Guglielmono, A.A., Mel?ndez, R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle // Clin. Microbiol. Rev. - 2003. - 16, 698-712.
12. Lopez JE, Palmer GH, Brayton KA, Dark MJ, Leach SE, Brown WC. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine // Infect Immun. - 2007. - 75(5). - 2333-2342. Epub 2007 Mar 5.
13. McGarey DJ, Allred DR. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins // Infect Immun. - 1994. - 62(10). - 4587-4593.
14. McGarey, D.J., Barbet, A.F., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Allred, D.R. Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b // Infect. Immun. - 1994. - 62, 4594-4601.
15. Molloy JB, Bowles PM, Knowles DP, et al. Comparison of a competitive inhibition ELISA and the card agglutination test for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in cattle // Aust Vet J. - 1999. - 77. - 245-249.
16. Montenegro-James S, Guillen AT, Ma SJ, et al. Use of the dot enzyme-linked immunosorbent assay with isolated *Anaplasma marginale* initial bodies for serodiagnosis of anaplasmosis in cattle // Am J Vet Res. - 1990. - 51. - 1518-1521.
17. Oberle SM, Palmer GH, Barbet AF, McGuire TC. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale* // Infect Immun. - 1988. - 56(6). - 1567-1573.
18. Palmer GH, Barbet AF, Cantor GH, McGuire TC. Immunization of cattle with the MSP-1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate // Infect Immun. - 1989. - 57(11). - 3666-3669.
19. Palmer GH, McElwain TF. // Vet Parasitol. - 1995. - 57(1-3). - 233-53.
20. Palmer, G.H., Waghela, S.D., Barbet, A.F., Davis, W.C., McGuire, T.C. Characterization of a neutralization-sensitive epitope on the Am 105 surface protein of *Anaplasma marginale* // Int. J. Parasitol. 1987. - 17. - 1279-1285.
21. Reinbold JB1, Coetzee JF, Sirigireddy KR, Ganta RR. 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.
22. Scoles GA, Goff WL, Lysyk TJ, et al.: 2008, Validation of an *Anaplasma marginale* cELISA for use in the diagnosis of *A. ovis* infections in domestic sheep and *Anaplasma* spp. in wild ungulates. Vet Microbiol 130. - :184-190.
23. Strik NI, Alleman AR, Barbet AF, Sorenson HL, Wamsley HL, Gaschen FP, Luckschander N, Wong S, Chu F, Foley JE, Bjoersdorff A, Stuen S, Knowles DP. 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.
24. Tebele N, McGuire TC, Palmer GH. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes // Infect Immun. - 1991. - 59(9). - 3199-3204.
25. Vidotto MC, Ven?ncio EJ, Vidotto O. Cloning, sequencing and antigenic characterization of rVirB9 of *Anaplasma marginale* isolated from Parana State, Brazil // Genet Mol Res. - 2008. - 7(2). - 460-466.