

РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *ANAPLASMA MARGINALE* У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

А.С. Островский, М.Е. Кадырова, Н.Е. Турсунбай, А.Б. Шевцов, А.Е. Даулетов, А.М. Касен, Е.С. Шевцова, К.К. Муканов

Национальный центр биотехнологии, Республика Казахстан, 000010, г. Астана, Кургальжинское шоссе 13/5

e.mail: aleksadr141000@gmail.com

Anaplasma marginale – это грамотрицательная облигатная внутриклеточная бактерия, поражающая крупный рогатый скот, буйволов, оленей и антилоп, приводя к значительным экономическим потерям. Разработка молекулярно-генетических методов диагностики кровепаразитарных заболеваний является актуальным для принятия эффективных мер по предотвращению распространения клещевых инфекций. Недостаточная чувствительность и специфичность применяемых микроскопических и иммунологических методов диагностики, а также тенденция резкого увеличения численности популяции кровососущих клещей усугубляет эпизоотологическую обстановку.

В рамках настоящих исследований разработана ПЦР тест-система в режиме реального времени (qPCR) для идентификации *Anaplasma marginale*. Разработаны видоспецифичные праймеры и флуоресцентно-меченный зонд TaqMan к высоко консервативному гену белка семейства теплового шока *groEL*. Результаты выравнивания последовательностей *groEL* гена в программном обеспечении BioEdit позволили выявить высококонсервативную область для *A. marginale*. Подобраны следующие праймеры и зонд: A. marg-U 5'-gatgagattgcacaggttgct-3', A. marg-R 5'-tcctcaaccgttattaccccg-3', An. marg-PF FAM-tgccaactcccttacgcactgtgc-BHQ1. Оценка внутривидовой специфичности проводилась на 32 образцах *A. marginale*, 24 образцах *A. centrale* и 24 образцах *A. ovis*, идентифицированных секвенированием по Сенгеру. При определении межвидовой специфичности в качестве положительного контроля использованы 3 образца *A. marginale*, 3 отрицательных контроля и 90 видов различных бактерий из коллекции лаборатории. Определение чувствительности реакции прово-

дилось разведением плазмидной ДНК с исходной концентрацией 1,845 ng/ μ l, содержащей $4,96 \times 10^8$ копий целевого гена. Для постановки qPCR на реакцию использовалось по 5 μ l ДНК, предварительно разведенной сначала до $4,19 \times 10^6$ копий на 1 μ l для первого ряда лунок в 3 повторностях с последующими четырехкратными разведениями до 16 копий, а после двукратными разведениями до 1 копии. ПЦР тест-система показала высокую чувствительность, позволяющая обнаруживать ген *groEL A. marginale* в количестве 8 копий в реакции. Разработанная ПЦР тест-система в режиме реального времени для идентификации *A. marginale* обладает высокой специфичностью и позволяет дифференцировать от других видов *Anaplasma spp.* ПЦР в режиме реального времени для идентификации *Anaplasma spp.* ранее не применялась в Казахстане, ее преимуществом является скорость проведения анализа, исключение дополнительных стадий детекции, а также возможность определения статуса носителя инфицированного животного. qPCR требует меньше трудозатрат и значительно упрощает диагностику по сравнению с традиционными методами идентификации *Anaplasma marginale*, а одновременная детекция во время термоциклирования значительно ускоряет процесс по сравнению со стандартной PCR. Разработанная нами тест-система qPCR на основе гена *groEL* показала высокую чувствительность и специфичность, не уступающие аналогичным разработкам и может быть использована для эффективного мониторинга в эпизоотически неблагополучных регионах Казахстана. Выявление носителей инфекции позволит обеспечить контроль распространения *A. marginale* среди крупного рогатого скота и своевременное проведение профилактических мер.