

4. Flavonoids, cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of *Evaxpygmae* / A. Khalfallah, D. Berrehal, C. Bensouici [et al.] // *Pharmaceutical Biology*. – 2017. – Vol. 55, issue 1. – P. 2292–2296. – Doi: 10.1080/13880209.2017.1405997
5. Antioxidant and antioxidant flavonoid derivatives from the fruits of *Metaplexis japonica* / L. Wei, M. Yang, L. Huang [et al.] // *Food Chemistry*. – 2019. – № 15. – R. 308–312. – Doi: 10.1016/j.foodchem.2019.03.070.
6. Flavonoids from *Morus alba* L. Leaves: Optimization of Extraction by Response Surface Methodology and Comprehensive Evaluation of Their Antioxidant, Antimicrobial, and Inhibition of α -Amylase Activities through Analytical Hierarchy Process / H. Cui, T. Lu, M. Wang [et al.] // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, issue 13 : 2398. – Doi: 10.3390/molecules24132398.
7. Doza i vremya vvedeniya L-argenina, vyzyvayushchego ostryj pankreatit u myshej / Van Sin'sin', CHen' Czylyu, In' Sin [i dr.] // *Kitajskij zhurnal o veterinarnoj medicine*. – 2021. – № 57 (07). – S. 56–59.
8. Ismail, O. Z. Lipase or amylase for the diagnosis of acute pancreatitis? / O. Z. Ismail, V. Bhayana // *Clinical Biochemistry*. – 2017. – № 50 (18). – R. 1275–1280. – Doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.07.003.
9. Ikei, S. Blood concentrations of polymorphonuclear leucocyte elastase and interleukin-6 are indicators for the occurrence of multiple organ failures at the early stage of acute pancreatitis / S. Ikei, M. Ogawa, Y. Yamaguchi // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. – 1998. – № 13 (12). – R. 1274–1283.
10. Research Progress on the Relationship Between Acute Pancreatitis and Calcium Overload in Acinar Cells / S. Feng, Q. Wei, Q. Hu [et al.] // *Digestive Diseases and Sciences*. – 2019. – № 64 (1). – R. 25–38. – Doi: 10.1007/s10620-018-5297-8.
11. Protective effects of flavonoids from *Coreopsis tinctoria* Nutt. on experimental acute pancreatitis via Nrf-2/ARE-mediated antioxidant pathways / D. Du, L. Yao, R. Zhang [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2018. – Vol. 224, issue 5. – P. 261–272. – Doi: 10.1016/j.jep.2018.06.003.
12. Qing-Yi Decoction in the Treatment of Acute Pancreatitis: An Integrated Approach Based on Chemical Profile, Network Pharmacology, Molecular Docking and Experimental Evaluation / T. F. Wei, L. Zhao, P. Huang [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2021. – Vol. 29, issue 12 : 590994. – Doi: 10.3389/fphar.2021.590994.
13. Psidiumguajava Flavonoids Prevent NLRP3 Inflammasome Activation and Alleviate the Pancreatic Fibrosis in a Chronic Pancreatitis Mouse Model / G. Zhang, L. Tang, H. Liu [et al.] // *The American Journal of Chinese Medicine*. – 2021. – Vol. 49, issue 8. – P. 2001–2015. – Doi: 10.1142/S0192415X21500944.
14. Effekt peonola na okislitel'noe povrezhdenie ostrym pankreatitom u myshej, vyzvannogo L-argininom / CHzhan Pen, Li YUjfu, Vu SHancze [i dr.] // *Vestnik zhivotnovodstva i veterinarii*. – 2021. – № 52 (07). – S. 83–90.

Поступила в редакцию 07.05.2026.

DOI 10.52368/2078-0109-2026-62-3-86-90

УДК 619.616-095:636.2.034

РАЗРАБОТКА ВИДОСПЕЦИФИЧНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *ANAPLASMA MARGINALE*

Шангараев Р.И. ORCID ID 0000-0003-3689-1442, Усольцев К.В. ORCID ID 0000-0001-5279-9836, Горбунова М.Е. ORCID ID 0000-0002-0707-2117, Хаертынов К.С. ORCID ID 0000-0003-4764-560X, Додонova Е.А. ORCID ID 0000-0002-6919-4064, Сальманова Г.Р. ORCID ID 0000-0003-2356-133X
ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»,
г. Казань, Российская Федерация

В данной работе представлен результат конструирования видоспецифичных праймеров к генам *mtp4* и *mtp5* возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота *Anaplasma marginale*. По результатам биоинформационного анализа 65 нуклеотидных последовательностей гена *mtp4* и 6 - гена *mtp5* были установлены консервативные локусы в позиции от 680 до 830 п.н. – для гена *mtp4*; и от 400 до 560 – для гена *mtp5*. На указанные выше участки генов-интереса разработаны олигонуклеотидные затравки, описаны их основные характеристики. Полученные последовательности олигонуклеотидных комбинаций можно использовать в качестве специфических компонентов при создании новых современных тест-систем для ПЦР-диагностики возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота, а также в случаях затруднений по идентификации данного вида. **Ключевые слова:** анаплазмоз, биоинформационный анализ, генетический маркер, диагностика, олигонуклеотидные праймеры.

DEVELOPMENT OF SPECIES-SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS FOR IDENTIFICATION OF *ANAPLASMA MARGINALE*

Shangaraev R.I., Usoltsev K.V., Gorbunova M.E., Khaertynov K.S., Dodonova E.A., Salmanova G.R.
FSBSI "Federal Center for Toxicological, Radiation, and Biological Safety", Kazan, Russian Federation

This paper presents the results of constructing species-specific primers for the *mtp4* and *mtp5* genes of the bovine anaplasma pathogen, *Anaplasma marginale*. Bioinformatic analysis of 65 nucleotide sequences of the *mtp4* gene and 6 of the *mtp5* gene revealed conserved loci in positions from 680 to 830 base pairs (bp) for the *mtp4* gene and from 400 to 560 base pairs (bp) for the *mtp5* gene. Oligonucleotide primers were developed for the above-mentioned sites of the genes of interest, and their main characteristics are described. The resulting oligonucleotide combinations can be used as specific components in the development of new, modern test systems for PCR

diagnostics of the bovine anaplasma pathogen, as well as in cases of difficulty in identifying this species. Keywords: anaplasmosis, bioinformatics analysis, genetic marker, diagnostics, oligonucleotide primers

Введение. Анаплазмоз крупного рогатого скота представляет собой кровепаразитарную болезнь, которая клинически проявляется лихорадкой постоянного типа, анемией, кахексией, снижением продуктивности, абортами, у молодняка – высокой летальностью. Экономический ущерб от болезни обусловлен потерей продуктивности животных, недополучением приплода, гибелью молодняка и затратами на проведение противопаразитарных мероприятий [1].

В Российской Федерации случаи анаплазмоза зарегистрированы в субъектах Северо-западного (Калининградская область), Центрального (Брянская, Владимирская, Калужская, Московская, Рязанская, Смоленская области), Приволжского (Нижегородская, Кировская, Ульяновская области), Сибирского (Тюменская область, Красноярский, Алтайский край) федеральных округов [2].

Возбудители анаплазмоза крупного рогатого скота относятся к порядку *Rickettsiales* и семейству *Anaplasmataceae*. Анаплазмы являются грамотрицательными бактериями, переносчиками данных возбудителей в широтах с умеренным климатом служат иксодовые клещи из рода *Dermacentor*. Также переносчиками анаплазм могут быть кровососущие насекомые, не исключается и ятрогенный путь передачи через инфицированные иглы, инструменты [3].

Ведущую роль в предотвращении распространения анаплазмоза играет своевременная и достоверная диагностика. Микроскопия мазков крови, которая считается «золотым стандартом» для индикации анаплазм имеет недостатки: на ранних стадиях заболевания и при тяжелых анемиях чувствительность метода низкая, процент ложноотрицательных результатов высокий. Полимеразная цепная реакция (ПЦР), благодаря высокой чувствительности, специфичности и оперативности, с успехом применяется для лабораторной диагностики анаплазмоза крупного рогатого скота [4]. ПЦР дает возможность обнаруживать специфические фрагменты генома различных возбудителей на ранних стадиях болезни [5, 6], также с помощью ПЦР можно провести дифференциацию анаплазмоза от других болезней инфекционной, инвазионной и незаразной этиологии [7].

Цель исследований – поиск специфичных для вида *A. marginale* локусов и разработка олигонуклеотидных праймеров для его ПЦР-индикации.

Материалы и методы исследований. Анализом литературных данных [8, 9] для молекулярно-генетической индикации *A. marginale* были выбраны гены *msh4*, кодирующий трансмембранный иммунодоминантный белок, участвующий в адгезии возбудителя клеткам макроорганизма; *msh5*, продуктом которого является основной поверхностный белок с молекулярной массой 19 кДа [10]. Для биоинформационного анализа генов *msh4* и *msh5* *A. marginale* были использованы 65 и 6, доступные в базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) нуклеотидных последовательностей GenBank ID: AY7S6994.1, ON209411.1, MH939155.1, MH3SS472.1, KU497715.1, JN564652.1, JN564650.1, JN56464S.1, JN564647.1, JN564645.1, EU677383.1, MF771080.1, MF771077.1, MF771073.1, MF771066.1, MF771056.1, MF771052.1, EU1060S2.1, AY127073.1, AY127069.1, D0000621.1, MW939373.1, MZ098220.1, MKS093S9.1, MKS093S6.1, MKS093S2.1, MH191396.1, KX781293.1, KY305594.1, KY305585.1, AY851150.1, KJ512172.1, HM063430.1, KX7S1293.1, KY305594.1, KY3055S5.1, AYS51150.1, K3512172.1, HM063430.1, AY666010.1, AY666005.1, AY2S3193.1, EU2S3S46.1, P051S366.1, P051 S359.1, LCS7196S.1, LCS71961.1, LCS71946.1, PV626510.1, P04SSS73.1, P04SSS67.1, OP749972.1, OP142724.1, OK663651.1, MT173610.1, MH02020S.1, MG67645S.1, EF19050S.1, KF739429.1, L019S7.1, MK140732.1, MK164541.1, EF053267.1, AY191S27.1, AF42S0S6.1 (*msh4*); EF546443.1, KR047044.1, KR047043.1, KR047042.1, KR047041.1, M93392.1 (*msh5*). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проведено в программе Unipro Ugene V53.0 («Унипро», Россия). Для дизайна олигонуклеотидных праймеров и TaqMan зондов использована программа Vector NTI 9.1 (Invitrogen Corporation, Карлсбад, США).

Результаты исследований. Ведущую роль в предотвращении распространения анаплазмоза крупного рогатого скота играет своевременная и достоверная диагностика. Метод ПЦР благодаря высокой чувствительности и специфичности дает возможность идентифицировать специфические локусы генома возбудителя в патологическом материале. Важным этапом ПЦР-диагностики является поиск высокоспецифичных ДНК-локусов, дизайн олигонуклеотидных праймеров и TaqMan-зондов, позволяющих провести реакцию в режиме реального времени. Множественным выравниванием были установлены локусы генов *msh4* и *msh5* с минимальным полиморфизмом в позиции 680-830 и 400-560 (рисунок 1), на которые были сконструированы олигонуклеотидные праймеры флуоресцентные зонды.

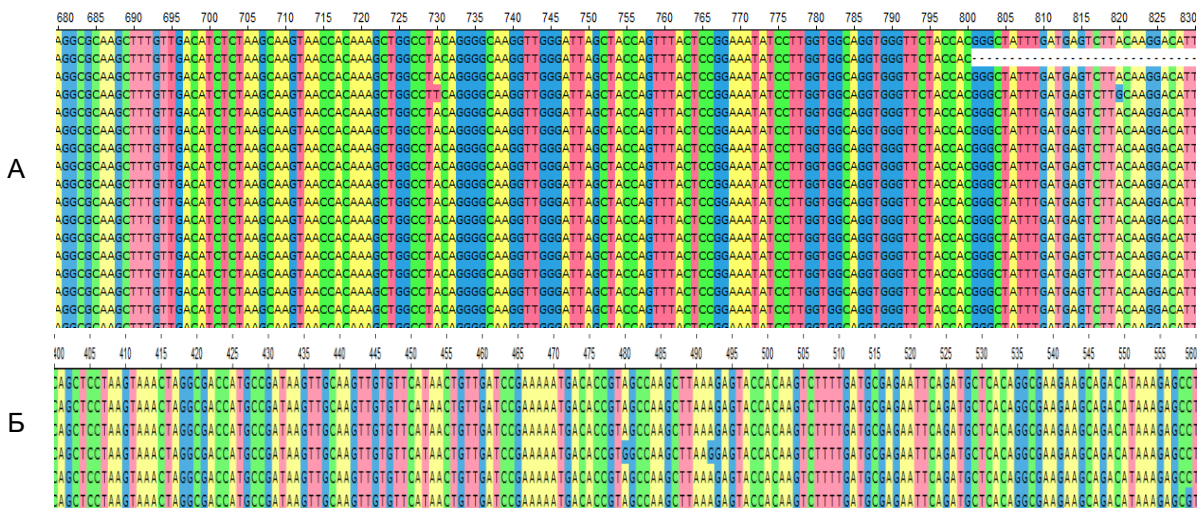


Рисунок 1 – Сравнение нуклеотидных последовательностей маркерных участков генов *msp4* (А) и *msp5* (Б), выбранных для индикации *A. marginale* (Интерфейс программы Ugene Unipro V53.0)

Краткая характеристика разработанных праймеров и зондов представлена в таблице 1.

Прямой праймер FPmsp4 имеет длину 27 нуклеотидов, олиго-анализом установлено отсутствие образования вторичных структур данным олигонуклеотидом.

Длина зонда Pmsp4 равна 25 нуклеотидов. Зонд образует четыре димера со свободной энергией Гиббса 1,1 и 2,4 ккал /моль и одну шпильку (4,1 ккал /моль). На 5' и 3' - концах зонд имеет флуоресцентную метку ROX (карбокси-Х-родамин) и гаситель флуоресценции BHQ2 («black hole quencher»).

Обратный праймер RPmsp4 имеет длину 21 нуклеотидов, образует два димера со свободной энергией Гиббса 0,6 ккал / моль и одну шпильку (3,0 ккал / моль).

Праймеры для амплификации участка гена *msp5* имели следующие характеристики: прямой праймер FPmsp5 имеет длину 22 нуклеотидов, данный олигонуклеотид не образует вторичные структуры (димеры и шпильки).

Олигонуклеотидный зонд Pmsp5 имеет длину 29 нуклеотидов, на 5'-конце зонд помечен флуоресцентным красителем R6G (родамин 6G), на 3'-конце – гасителем флуоресценции RTQ1. Зонд Pmsp5 образует четыре димера, длина и свободная энергия Гиббса которых не превышают 3 п.н. и 1,1 ккал / моль соответственно. Также данный олигонуклеотид образует две шпильки со свободной энергией Гиббса 4,1 и 0,2 ккал/моль.

Таблица 1 – Краткая характеристика разработанных олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов для индикации *A. marginale* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ)

Ген	Название праймера	Позиция в целевой последовательности (относительно штамма TWN1 <i>A. marginale</i> GenBank ID: EU677383.1 (<i>msp4</i>); и изолята GenBank ID: M93392.1 (<i>msp5</i>))	Температура плавления Tm, °C	ГЦ-состав, %	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'
<i>msp4</i>	FPmsp4	610-637	54,1	40,7	gacatctctaagcaagtaaccacaag
	Pmsp4	642-667	61,8	56,0	ROX- ctacaggggcaagggtgggattagc- BHQ2
	RPmsp4	703-724	53,8	52,4	aaatagcccgtggtagaacc
<i>msp5</i>	FPmsp5	405-427	56,5	54,5	cagatgctcacaggcgaagaag
	Pmsp5	434-463	60,9	41,4	R6G - taaagagcgtggtgtaaaactacaagggtg- RTQ1
	RPmsp5	524-547	56,8	47,8	gacatacctgccttcccattga

Обратный праймер на ген *msp4* длиной 23 нуклеотидов, не образует вторичные структуры (димеры и шпильки).

Разработанные олигонуклеотиды имели оптимальные характеристики: не образовали палиндромы, величина температуры плавления находилась в диапазоне 50,0-70,0°C, разница в температурах плавления между прямым и обратным праймером не превышала 1,0 °C, процентное содержание гуанин-цитозиновых нуклеотидов составило не ниже 40,0 и не выше 60,0%.

На рисунках 2 и 3 представлены места гибридизации разработанных праймеров и зондов в целевых нуклеотидных последовательностях штамма TWN1 (GenBank ID: EU677383.1) и изолята GenBank ID: M93392.1 *A. marginale*.

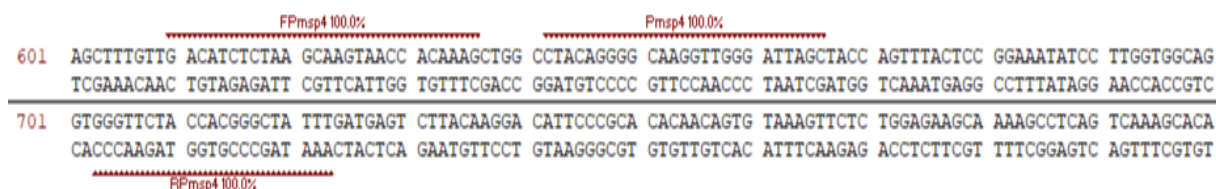


Рисунок 2 – Места гибридизации прямого, обратного праймеров и флуоресцентного зонда в целевой нуклеотидной последовательности гена *msp4* штамма TWN1 *A. marginale* (GenBank ID: EU677383.1)

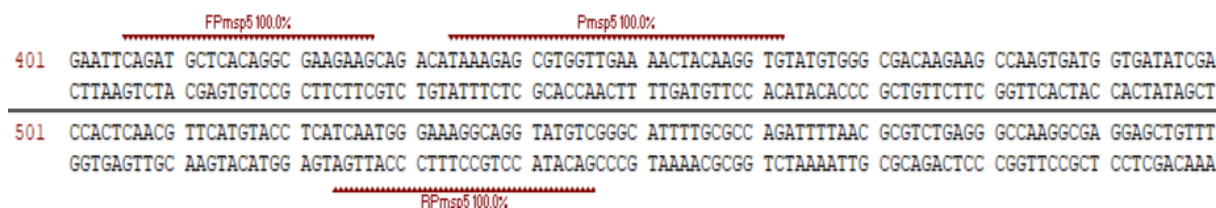


Рисунок 3 – Места гибридизации прямого, обратного праймеров и флуоресцентного зонда в целевой нуклеотидной последовательности гена *msp5* изолята *A. marginale* (GenBank ID: M93392.1)

Длина амплифицируемого фрагмента гена *msp4* составила 115 пар нуклеотидов (п.н.), BLASTn-анализом было установлено отсутствие гомологичных нуклеотидных последовательностей в базе данных NCBI.

Участок гена *msp5*, ограниченный разработанными олигонуклеотидами, имел длину 141 п.н. BLASTn-анализ амплифицируемого фрагмента гена *msp5* *A. marginale* показал отсутствие гомологичных нуклеотидных последовательностей в базе данных NCBI.

Заключение. Проведен биоинформационный анализ генов *msp4* и *msp5* различных штаммов *A. marginale*, в результате чего были выявлены высокоспецифичные локусы данных генов в позициях 680-830 (*msp4*) и 400-560 (*msp5*). На эти локусы генов *msp4* и *msp5* разработаны олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченные зонды, определены их основные характеристики. BLASTn-анализ амплифицируемых участков генов *msp4* и *msp5* показал отсутствие в базе данных NCBI гомологичных к данным фрагментам нуклеотидных последовательностей. Таким образом, разработанные олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентные зонды могут служить специфическим компонентом при конструировании ПЦР-РВ тест-систем для индикации ДНК *A. marginale*.

Conclusion. A bioinformatic analysis of the *msp4* and *msp5* genes from various *A. marginale* strains was conducted, revealing highly specific loci for these genes at positions 680-830 (*msp4*) and 400-560 (*msp5*). Oligonucleotide primers and fluorescently labeled probes were developed for these *msp4* and *msp5* gene loci, and their main characteristics were determined. BLASTn analysis of the amplified sites of the *msp4* and *msp5* genes revealed the absence of nucleotide sequences homologous to these fragments in the NCBI database. Thus, the developed oligonucleotide primers and fluorescent probes can serve as a specific component in the construction of real-time PCR test systems for detecting *A. marginale* DNA.

Список литературы.

1. Экспериментальное изучение роли клещей в передаче возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота / А. П. Красиков, Н. В. Рудаков, К. К. Бейсембаев, И. Е. Самойленко // Ветеринарная патология. – 2007. – № 3 (22). – С. 95–102.
2. Распространение анаплазмоза крупного рогатого скота на территории Российской Федерации / А. Л. Архипова, А. А. Тагмазян, Н. А. Куреев [и др.] // Ветеринария и кормление. – 2019. – № 2. – С. 23–25.

3. *Simultaneous molecular detection of Anaplasma marginale and Theileria annulata in cattle blood samples collected from Pakistan-Afghanistan boarder region* / S. Jamil, C. C. Chiou, H. Muqaddas [et al.] // PLoS. One. – 2023. – Vol. 18 (7), e0288050. – Doi: 10.1371/journal.pone.0288050.

4. Разработка метода выявления *Anaplasma marginale* с использованием ПЦР в реальном времени / С. Н. Ковальчук, Г. Ю. Косовский, А. В. Архипов [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50, № 6. – С. 825–831.

5. Разработка способа индикации патогенных лептоспир методом гнездовой полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / К. В. Усольцев, Р. И. Шангараев, Е. В. Панкова [и др.] // Ветеринарный врач. – 2025. – № 3. – С. 84–90. – Doi 10.33632/1998-698X_2025_3_84.

6. Подбор генетических маркеров для ПЦР-РВ индикации возбудителя babesиоза крупного рогатого скота / Р. И. Шангараев, К. В. Усольцев, М. Е. Горбунова [и др.] // Ветеринарный врач. – 2026. – № 1. – С. 87–93. – Doi 10.33632/1998-698X_2026_1_87.

7. Щемелева, Н. Ю. Современные методы диагностики анаплазмоза крупного рогатого скота (обзор) / Н. Ю. Щемелева, Е. П. Цвиль // Экология и животный мир. – 2020. – № 2. – С. 6–9.

8. Ierardi, R. A. A review of bovine anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) with emphasis on epidemiology and diagnostic testing / R. A. Ierardi // J. Vet. Diagn. Invest. – 2025. – Vol. 37, № 4. – P. 517–538. – Doi: 10.1177/10406387251324180.

9. Ковальчук, С. Н. Молекулярно-генетическая диагностика анаплазмоза крупного рогатого скота / С. Н. Ковальчук // Ветеринария и кормление. – 2020. – № 6. – С. 29–31. – Doi: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2020-6-8.

10. The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species / E. S. Visser, T. C. McGuire, G. H. Palmer [et al.] // Infect. Immun. – 1992. – Vol. 60, № 12. – P. 5139–44. – Doi: 10.1128/iai.60.12.5139-5144.

References.

1. Eksperimental'noe izuchenie roli kleshchej v peredache возбуdivatelya anaplazmoza krupnogo rogatogo skota / A. P. Krasikov, N. V. Rudakov, K. K. Bejsembaev, I. E. Samojlenko // Veterinarnaya patologiya. – 2007. – № 3 (22). – S. 95–102.

2. Rasprostranenie anaplazmoza krupnogo rogatogo skota na territorii Rossijskoj Federacii / A. L. Arhipova, A. A. Tagmazyan, N. A. Kureev [i dr.] // Veterinariya i kormlenie. – 2019. – № 2. – S. 23–25.

3. *Simultaneous molecular detection of Anaplasma marginale and Theileria annulata in cattle blood samples collected from Pakistan-Afghanistan boarder region* / S. Jamil, C. C. Chiou, H. Muqaddas [et al.] // PLoS. One. – 2023. – Vol. 18 (7), e0288050. – Doi: 10.1371/journal.pone.0288050.

4. Razrabotka metoda vyavleniya *Anaplasma marginale* s ispol'zovaniem PCR v real'nom vremeni / S. N. Koval'chuk, G. YU. Kosovskij, A. V. Arhipov [i dr.] // Sel'skoxozyajstvennaya biologiya. – 2015. – T. 50, № 6. – S. 825–831.

5. Razrabotka sposoba indikacii patogennyh leptospirov metodom gnezdovoj polimeraznoj cepnoj reakcii v rezhime real'nogo vremeni / K. V. Usol'cev, R. I. SHangaraev, E. V. Pankova [i dr.] // Veterinarnyj vrach. – 2025. – № 3. – S. 84–90. – Doi 10.33632/1998-698X_2025_3_84.

6. Podbor geneticheskikh markerov dlya PCR-RV indikacii возбуdivatelya babezioza krupnogo rogatogo skota / R. I. SHangaraev, K. V. Usol'cev, M. E. Gorbunova [i dr.] // Veterinarnyj vrach. – 2026. – № 1. – S. 87–93. – Doi 10.33632/1998-698X_2026_1_87.

7. SHCHemeleva, N. YU. Sovremennye metody diagnostiki anaplazmoza krupnogo rogatogo skota (obzor) / N. YU. SHCHemeleva, E. P. Cvil' // Ekologiya i zhivotnyj mir. – 2020. – № 2. – S. 6–9.

8. Ierardi, R. A. A review of bovine anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) with emphasis on epidemiology and diagnostic testing / R. A. Ierardi // J. Vet. Diagn. Invest. – 2025. – Vol. 37, № 4. – R. 517–538. – Doi: 10.1177/10406387251324180.

9. Koval'chuk, S. N. Molekulyarno-geneticheskaya diagnostika anaplazmoza krupnogo rogatogo skota / S. N. Koval'chuk // Veterinariya i kormlenie. – 2020. – № 6. – S. 29–31. – Doi: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2020-6-8.

10. The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species / E. S. Visser, T. C. McGuire, G. H. Palmer [et al.] // Infect. Immun. – 1992. – Vol. 60, № 12. – P. 5139–44. – Doi: 10.1128/iai.60.12.5139-5144.

Поступила в редакцию 10.07.2026.