

УДК 636.093

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТЕЙЛЕРИОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

© 2021 г. С. А. Бурсаков*

Институт инновационных биотехнологий в животноводстве (ИИБЖ) –
филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный исследовательский центр животноводства –
ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста» (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста),
ул. Костякова, д. 12, стр. 4, Москва, 127422 Россия
*e-mail: sergeymoscu@gmail.com

Поступила в редакцию 01.10.2020 г.

После доработки 30.10.2020 г.

Принята к печати 02.11.2020 г.

В данной работе представлены современные подходы для молекулярной диагностики *Theileria* spp. Обнаружение и лечение тейлериоза – заболевания, вызываемого этими простейшими, являются необходимым инструментом для его контроля. Важность точной идентификации возбудителя для эпидемиологических исследований и диагностических целей определяется тяжестью заболевания и разной восприимчивостью к лекарственным препаратам. Эти работы должны вестись с учетом видоспецифических свойств и широкого разнообразия видов *Theileria*, а также особенностей их позвоночных хозяев и членистоногих векторов. Пополнение баз данных сиквенсами новых *Theileria* является стимулом для создания ПЦР тест-систем, которые дают возможность определять одновременно несколько видов и регистрировать коинфекцию. Современные средства контроля за выявлением и распространением заболевания не всегда позволяют вовремя распознать его на ранних стадиях, что при высокой скоротечности болезни может приводить к потерям в животноводстве. Отсюда возникает интерес к быстрым и чувствительным методам обнаружения на ранних стадиях развития заболевания.

Ключевые слова: *Theileria*, тейлериоз, крупный рогатый скот, молекулярная диагностика

DOI: 10.31857/S0031184721010038

Тейлериоз крупного рогатого скота (КРС) является трансмиссивным заболеванием, вызываемым тейлериями – облигатными простейшими паразитами, относящимися к типу Apicomplexa, порядку Piroplasmida, семейству Theileriidae, род *Theileria*. Вследствие потерь молочной и мясной продуктивности и гибели скота - это кровепаразитарное заболевание может наносить значительный экономический ущерб животноводству.

Возбудители *Theileria* spp. специфичны для разных видов и поражают как диких, так и домашних животных. Идентифицировано несколько видов *Theileria* spp., паразитирующих у крупного рогатого скота (КРС): *Theileria parva*, *T. annulata*, *T. buffeli/orientalis*, *T. mutans*, *T. velifera*, *T. sergenti*, *T. taurotragi* и *T. orientalis*. Наиболее пато-

генными являются *T. parva* и *T. annulata*, которые отличаются высокой летальностью и индуцируют трансформацию инфицированных клеток лимфоцитов или макрофагов / моноцитов (Nene, 2016). Другие виды тейлерий не вызывают неконтролируемой пролиферации инфицированных лейкоцитов, а вместо этого размножаются преимущественно в инфицированных эритроцитах.

Наиболее патогенными возбудителями заболевания мелких жвачных животных, имеющими экономическое значение, являются *Theileria lestoquardi* (*T. hirci*), которая вызывает злокачественный тейлериоз овец, а также *Theileria uilenbergi* и *Theileria luwenshuni*. Помимо пород КРС и мелкого рогатого скота, к этому заболеванию восприимчивы также буйволы.

Источником инвазии являются больные животные и тейлерионосители. Состояние носительства для пироплазмиды характеризуют как долгосрочное сохранение паразита в его хозяине. Возможность передачи другим хозяевам через векторную инфекцию для поддержания цикла передачи также является его неотъемлемой частью. Долгосрочная устойчивость подразумевает, что паразит может поддерживаться и распространяться в позвоночном хозяине, избегая иммунной системы. Считается, что после заражения животные могут пожизненно оставаться носителями тейлереии (de Waal, 1992).

Тейлериоз выявлен во многих странах Западной Европы, Азии, Африки, в странах Средней Азии. Территория Российской Федерации считается благополучной по тейлериозу, и соответственно данные по распространению этого заболевания у КРС на территории РФ ограничены. Очаги распространения расположены в основном на юге России. Однако вспышки тейлериоза фиксировали во многих регионах Российской Федерации, в Ростовской области, Дагестане, на Дальнем востоке, в Московской области и др. (Самойловская и др., 2015; Bursakov, Kovalchuk, 2019). Поэтому оценка степени распространения и своевременная диагностика играют решающую роль в предотвращении случаев заболеваемости, особенно в связи с увеличением и изменением ареала распространения клещей, которые переносят, в частности, возбудителей данной болезни.

Тейлерия на территории РФ передается различными видами клещей, в том числе иксодовыми клещами *Dermacentor reticulatus*, *D. marginatus*, *Boophilus annulatus*, *Hyalomma anatolicum*, *H. detritum*, *Haemaphysalis punctate* и *H. sulcate* (Зубаринова и др., 2017; Новак и др., 2019; Florin-Christensen et al., 2009), нападающими на животных во всех активных фазах развития. Биотопами этих насекомых являются степные и предгорные целинные пастбища. Поскольку клещи перезимовывают в помещениях, то не исключена возможность заболевания скота тейлериозом не только в пастбищный, но и в стойловый период. Сезонность и динамика тейлериоза определяются видовым составом и биологическими особенностями переносчиков, а также погодными условиями. Максимальное количество больных животных регистрируют обычно в июне-июле, что связано с высокой активностью имаго клещей-переносчиков.

В связи с меняющимися условиями климата и повышением среднегодовой температуры на Земле ареал распространения клещей смещается ближе к северу, что в свою очередь может ухудшать в этих регионах эпизоотологическую обстановку по тейлериозу КРС (Tokarevich et al., 2017).

Описаны только 91 генотип и ~ 40 видов *Theileria* spp. среди ~6000 известных видов *Apicomplexa*, составляющих лишь 0.1% от предполагаемого числа присутствующих на Земле видов *Apicomplexa* (1.2–10 млн.) (Morrison, 2009). В связи с таким обширным генетическим разнообразием *Theileria* spp. в природных популяциях необходима разра-

ботка специфичных анализов или зондов для географически разнообразных популяций (Gubbels et al., 2000; Chaisi et al., 2013; Perera et al., 2015). Соответственно, для совершенствования методов молекулярной диагностики с использованием универсальных праймеров и/или зондов, совершенно необходимо пополнение базы данных *Theileria* и *Apicomplexa* новыми видами.

Поэтому в данном обзоре представлены молекулярные методы, используемые в практике идентификации тейлериоза.

Диагностика тейлериоза

Традиционный метод выявления возбудителей у инфицированных животных микроскопическое исследование мазков крови, окрашенных по Гимзе, по-прежнему является самыми дешевым и быстрым методом, используемым для идентификации паразитов *Theileria*. Метод подходит для выявления острых инфекций, но не для обнаружения животных-носителей, у которых паразитемия может быть низкой, поскольку их чувствительность и специфичность ограничены (Altaу et al., 2008).

Однако, помимо прямого микроскопического исследования, тейлериоз может быть диагностирован путем идентификации инфекционного возбудителя с помощью серологических тестов с использованием флуоресцентных антител, культуры *in vitro* и инокуляции животных, а также с помощью молекулярно-диагностических анализов на базе нуклеиновых кислот (Mans, 2015; Lampereur et al., 2017; Sivajothi, Reddy, 2018; Gebrekidan et al., 2020).

Серологические методы диагностики – реакция связывания комплимента (РСК), реакция длительного связывания комплимента (РДСК), реакция иммунофлуоресценции (РИФ) с антигеном, приготовленным из «гранатных тел» или эритроцитарных форм тейлерий, – используют для ранней диагностики субклинических инфекций в эпидемиологических исследованиях и установления тейлерионосительства. Они помогают обнаружить антитела к *Theileria* у выздоровевших животных или животных, прошедших вакцинацию, используя антигены шизонта, приготовленные в культуре клеток печени экспериментально зараженного животного (BurrIDGE et al., 1974). Перекрестные реакции генетически близких видов или ослабление специфических иммунных ответов приводят к появлению ложноположительных и ложноотрицательных результатов, уменьшающих использование непрямого стандартного метода флуоресцирующих антител (нМФА). Разработка антиген-специфических анализов не решает эту проблему, так как близкородственные виды могут иметь аналогичные антигены. Тем не менее лишенные высокой специфичности серологические анализы остаются важной составляющей в эпидемиологических исследованиях за счет своей экспрессности и простоты (Li et al., 2020). Поэтому продолжают разрабатываться новые иммунологические методы, предлагающие более быстрые, более чувствительные и более специфичные варианты, чем традиционные методы, хотя прямая иммунологическая диагностика паразитарных антигенов в ткани хозяина все еще отсутствует.

Молекулярная диагностика тейлериоза

Методы обнаружения *Theileria* spp. на основе идентификации нуклеиновых кислот и их амплификации являются наиболее чувствительными, специфичными, надежными и доступными в настоящее время. Эти методы быстры, свободны от иммунокомпетентности и позволяют различать морфологически сходных паразитов. Молекулярные методы с улучшенной чувствительностью и специфичностью, например анализ гибридизации

ДНК, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ее модификаций, обеспечивают детекцию инфекции в скрытой фазе заболевания. Количество таких диагностических анализов, целью которых является выявление специфических генов и видов, экспоненциально возрастает (Criado-Fornelio, 2007). Для большинства экономически важных *Theileiria* spp., таких как *T. annulata*, *T. equi*, *T. lestoquardi*, *T. parva*, *T. uilenbergi* и других, менее опасных видов существует широкий спектр диагностических тестов, чему способствовало секвенирование геномов представителей ряда возбудителей: *T. orientalis* Shintoku (Hayashida et al., 2012), *T. equi* WA (Kappmeyer et al., 2012), *T. annulata* Ankara (Pain et al., 2005) и *T. parva* Muguga (Gardner et al., 2005) (данные геномов доступны в банке данных пироплазм, который является частью Eukaryotic Pathogen Bioinformatic Resource (EuPathDB) <http://eupathdb.org>).

Для обнаружения *Theileria* spp. у позвоночных и клещей-хозяев описано несколько вариантов анализов ПЦР и ПЦР в реальном времени, которые более чувствительны, чем микроскопический метод и в зависимости от мишени и размера гена могут позволить выполнить идентификацию на уровне рода или вида. Тест-системы для *Theileria* spp. на базе ДНК основаны на следующих методах: классическая, или традиционная ПЦР с последующим электрофоретическим анализом агарозного геля (Bishop et al., 1992; Pienaar et al., 2011; Wang et al., 2018), вложенная-PCR (Odongo et al., 2010), мультиплексная ПЦР (Kundave et al., 2018); ПЦР в реальном времени (Jeong et al., 2003; Kim et al., 2008; Sibeko et al., 2008; Pienaar et al., 2011b, 2014); ПЦР-анализ в реальном времени с использованием SYBR green (Pienaar et al., 2013); ПЦР-полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДФ) (Bishop et al., 1992; Geysen et al., 1999; Heidarpour Vami et al., 2009; Zaeemi et al., 2011); ПЦР с последующим точечным блоттингом, капиллярным или слот-блоттингом и гибридизацией с использованием радиоизотопно-меченых зондов (Bishop et al., 1992; Allsopp et al., 1993; Collins et al., 2002; Skilton et al., 2002) или хемилюминесценцией (гибридизация методом обратного блоттинга ПЦР-RLB) (Gubbels et al., 1999; Schnittger et al., 2004); петлевая изотермическая амплификация (Loop mediated isothermal amplification, LAMP) (Alhassan et al., 2007; Thekiso et al., 2010; Wang et al., 2010; Salih et al., 2012; El-Ashker et al., 2015; Shirozu et al., 2020); анализы на основе резонансной передачи энергии Форстера (Förster resonance energy transfer - FRET) (Chaisi et al., 2013; Perera et al., 2015; Yang et al., 2014) и анализ кривых плавления с высоким разрешением (HRM-анализ, High Resolution Melting) (Salim et al., 2013; Wang et al. 2020).

Молекулярные методы выявляют геномный материал паразитов (указывают на присутствие их живых форм у животного в момент отбора проб) являются эффективным инструментом наблюдения за здоровьем животных и выявления различных заболеваний. Методы, начиная от традиционной ПЦР до вложенной-ПЦР и до ПЦР в реальном времени, позволяют улучшить чувствительность, достоверность количественной оценки и повысить скорость обнаружения. При этом такие методы как RLB, анализы с использованием резонансной передачи энергии пан-Форстера и анализ плавления с высоким разрешением гарантируют выявление множества видов или генотипов одновременно.

Комплексные подходы для детектирования, например, нескольких видов *Theileria* spp. или *Babesia* spp. одновременно в одном анализе (Allsopp et al., 1993) интересны тем, что позволяют обходиться без проведения независимых реакций ПЦР для каждого возбудителя заболевания. Метод RLB, например, объединяет родоспецифичную ПЦР с гибридизацией с мембраносвязанным видоспецифичным олигонуклеотидом для дифференциального обнаружения известных видов *Theileria* spp. и *Babesia* spp. на основе их различий в последовательностях гена 18S субъединицы рРНК (Gubbels et al., 1999).

ПЦР анализ на основе профилей в реальном времени имеет преимущество в том, что изменение зонда может быть установлено по различиям в профилях плавления, которые могут быть связаны с генотипическими или видовыми различиями. Кроме того, ПЦР в реальном времени позволяет дать количественную оценку ДНК, указывая долю каждого рода или вида в данном образце (Bott et al., 2009).

Метод петлевой изотермической амплификации LAMP для работы в изотермических условиях (в диапазоне температур от 60 до 65 °С) и без использования специализированного оборудования может быть применен в полевых условиях (Notomi et al., 2000). Технология LAMP позволяет визуально обнаруживать продукты амплификации путем добавления флуоресцентных красителей, таких как SYBR Green, и измерения мутности. LAMP примерно в десять раз более чувствителен по сравнению с традиционной ПЦР. Кроме того, реакцию можно проводить без необходимости выделения ДНК.

В табл. 1 приведены праймеры, использованные для определения и идентификации *Theileria* spp., специфичных для рода и видов. Молекулярные мишени включают ген 18S rRNA, CoxIII, Tams1, ITS, GAPDH, ama1, hp1, MPSP. Благодаря консервативной природе и повторяющемуся расположению в геноме, ген ядерной рибосомной 18S рРНК, обеспечивает достаточное количество матричной ДНК для ПЦР и часто используются для идентификации видов (Chae et al., 1998; Katzer et al., 1998). Он является наиболее часто используемым геном-мишенью. Несмотря на высокую степень межвидовой консервативности гена 18S рРНК *Theileria* spp., особенно при работе с новыми организмами, его необходимо амплифицировать и секвенировать полностью (Herwaldt et al. 2003), чтобы идентифицировать все генетические вариации.

Видоспецифичные молекулярные методы используются для диагностических целей, а также при проведении эпидемиологических исследований распространения конкретных видов *Theileria* spp. В случае подозрения на присутствие этих видов, когда видоспецифичные анализы не дают результатов либо пироплазма не может быть идентифицирована, целесообразно проведение анализов, специфичных для всего рода. Примером может служить диагностика *T. annulata* по гену Tams1, кодирующему основной полипептид на поверхности мембраны пироплазмы на стадии мерозоиота. Из-за высокого уровня внутригенной вариабельности, праймеры на Tams1 могут не обнаруживать все генотипы *T. annulata*, что может привести к недооценке распространенности этого патогена (Kirvar et al., 2000; Katzer et al., 2006, Santos et al., 2013). В таких случаях обычно используют полный анализ последовательности гена 18S рРНК.

ПЦР в реальном времени способствовала более широкому распространению ПЦР из-за ее повышенной скорости, чувствительности, воспроизводимости и снижения риска загрязнения. Примером может служить количественный анализ ПЦР в реальном времени на основе гена cox III с использованием анализа кривой плавления при смешанных инфекциях (Chaisi et al., 2013), позволяющий обнаруживать и идентифицировать одновременно многие виды *Theileria* (*T. parva*, *T. taurotragi*, *T. buffeli*, *T. mutans*, *T. velifera*). Анализ Cox III специфичен для детекции инфекций *T. parva* у КРС и буйволов и выявляет больше положительных образцов этих возбудителей, чем анализ RLB и анализ 18S рРНК. Однако низкий уровень выявления гена cox III объясняется наличием обширных межвидовых и внутривидовых вариаций в областях последовательностей присоединения зондов. Другим примером может служить метод ПЦР в реальном времени, для диагностики и количественного определения *T. sergenti* с использованием специфического праймера для гена 33 кДа (Jeong et al., 2003). FRET-qPCR пан-*Theileria* позволяет обнаружить все известные *Theileria* spp. жвачных животных в одной реакции (Yang et al., 2014).

Таблица 1. Дизайн праймеров ПЦР для детектирования *Apicomplexa*, *Theileria* / *Babesia* и *Theileria* spp.
Table 1. Design of PCR primers for the detection of *Apicomplexa*, *Theileria* / *Babesia* and *Theileria* spp.

Организм	Ген-мишень, метод ПЦР	Размер ампликона (пн)	Праймеры (5'-3')	Источник
<i>Apicomplexa</i>	18S rRNA, традиционный	1700	КриптоF: AACCTGGTTGATCCTGCCAGT КриптоR: GCTTGATCCTTTCGCAGGTTCACTAC	Herwaldt et al., 2003
<i>Theileria</i> / <i>Babesia</i> spp.	18S rRNA, традиционный	1700	Nbab 1F: AAGCCATGCATGTCTAAAGTATAAGCTTTT TB18S-Rev: CCTCTCCGGAATCGAACC	Oosthuizen et al., 2008
<i>Theileria</i> spp./ <i>Babesia</i> spp.	18S rRNA, RLB-ПЦР	460-520	RLB-F: GAGGTAGTGACAAGAAATAACAATA RLB-R: biotin-5'-TCTTCGATCCCTAACTTTC	Gubbels et al., 1999
<i>Theileria</i> / <i>Babesia</i> spp.	18S rRNA, вложенный RLB	389-426	RLB-F: GACAAGAATAACAATACRGGGC CCTAACTTTCGTTCTTGATTA	Schnittger et al., 2004
<i>Theileria</i> spp.	18S rRNA, традиционный	1100	F: AGTTTCTGACCTATCAG R: TTGCCTTAAACTTCCTTG	Allsopp et al., 1993
<i>Theileria</i> spp.	18S rRNA, традиционный; ПЦР в реальном времени	230	F: GGTAATCCAGTCCAAATAG R: ACCAACAATAAGAACCAAGTC anchor: AGAAAATTAGAGTGCTCAAAGCAG GCTTT-FL sensor: LCRed705-GCC TTGAATA GTTTAGCATGGAAT-PR	Sibeko et al., 2008
<i>Theileria</i> spp.	<i>cox III</i> ; вложенный ПЦР в реальном времени	980	F3Cox: AAGATGAATCCGATTTTGATGA MJCoxF3: AAATGGACTATGTAAAGTTAAACCTAT FCox: CAACATTTTAAAGCTATCCAA nRCox: TTATAGTACAGGATTAAGATAC	Chaisi et al., 2013
<i>Theileria</i> spp.	18S rRNA, FRET-ПЦР в реальном времени	680	Anchor probe: Cox1-6FAM ATTGGaigacattATtTctatatttaaCaGGAc Sensor probe: Cox1-Cy5-AttaCgTatgtCggaag capital letters is locked nucleic acids F: TAGTGACAAAGAAATAACAATACGGGGCT R: CAGCAGAAAATCAAACCTACGAGCTTTTAACT	Yang et al., 2014
			Anchor probe: CCAATTGATACTTGGAAAGAGGTTT-(6-FAM) Reporter probe: (LCRred640)-AATTCCCATCATTCCAATTACAAGAC-phosphate	

Таблица 1. Продолжение
Table 1. Continuation

Организм	Ген-мишень, метод ПЦР	Размер ампликона (пн)	Праймеры (5'-3')	Источник
<i>Theileria</i> spp.	18S rRNA, TaqMan-ПЦР в реальном времени	147	F: ATTGTTGCAGTTAAAAAGTCTCGTA R: GCAAAAAGCCTGCTTTGAGCAC TaqMan probe L1: FAM-TTCGGACGGAGTTCGGC+T+TG-BBQ	Papli et al., 2011
<i>T. annulata</i>	Tams1, традиционный	430	F: CCAGGACSSCCSTCSAAGTTC R: GCATCTAGTTCSTTGGCGGA	Kundave et al., 2015
<i>T. annulata</i>	ITS, традиционный	637 (623-643)	F: TTATTCGGACCGTGAATG R: CATCCACCCTGAAAAGT	Zhou et al., 2016
<i>T. annulata</i>	Tams1-1, вложенный ПЦР	721 453	F: GTAACCTTTAAAAACCGT R: GTTACGAAACATGGGTTT nF: CACCTCAAAAACATACSSCC nR: TGACSSCACTTATCGTCC	Martin-Sanchez et al., 1999
<i>T. annulata</i>	Tams1, традиционный; ПЦР в реальном времени	319	Tams1F: CCAATTCGAGACCTACTACGATG Tams1R: CCACTTRTCGTCCTTAAGCTCG	Santos et al., 2013
<i>T. annulata</i>	18S rRNA, ПЦР в реальном времени	99	F: TTCGATGGTAGTCGGCTGTGC R: TTGGATGTGGTAGCCCGTTTCT	Zhao et al., 2016
<i>T. annulata</i>	ПЦР в реальном времени GAPDH;	100	F: GATGGTGAAGGTCCGGAGTGAAC R: GTCATTGATGGCGACCGATGT	Zhao et al., 2016
<i>T. parva</i>	ПЦР в реальном времени ama1,	2089	F: GGAGCTAACTCTGACCCCTTCG R: CCAAAAGTAGGCCAAATACGGC	Gotia et al., 2016
<i>T. parva</i>	традиционный hprt1,	1221	F: CCAGCCGGCTACGTTATGG R: CACCAGAAATGATCTGAACAAGCA	Gotia et al., 2016

<i>T. parva</i>	ama1, ПЦР в реальном времени	127	F: GCCCTTACAAGCCTTAGCTC R: GTTCGGGTGGCTTCTGGTC	Gotia et al., 2016
<i>T. parva</i>	hprt1, ПЦР в реальном времени	101	F: GTTCTGTGGCCAGCTGCTTA R: AGAGTTCGGGAAATGCAGCAA	Gotia et al., 2016
<i>T. parva</i>	18S rRNA, ПЦР в реальном времени	167	F: CTGCACTCGCTGTGTCCTTT R: ACCAACAAAATAGAACCCAAAAGTC anchor: GGGTCTCTGCATGTGGCTTAT-FL sensor: LCRed640-TCG GAC GGA GTTCGGCT-PH Cox F: CAACATTTGTTAAAAGCTATCCAA Cox R: ATCGGAAAACAGCGTACAATCATA Cox nR: TTATAGTACAGGATTAGATAACCC F: CTTTGCCTAGGATACTTCCT R: ACGGCAAGTGGTGAGAACT Ts-I: AAGGATCCGTCTCTGCTACCGCCGC Ts-R: TGTGAGACTCAAATGCCGCTA	Sibeko et al., 2008
<i>T. parva</i>	CoxIII, ПЦР-ПДРФ	776		Sibeko et al., 2008
<i>T. orientalis</i>	MPSP, традиционный	826		Ota et al., 2009
<i>T. orientalis</i>	Икеда-specific, традиционный	273	Th.ori-F: TCCTTGTTCCTCGCTCTGCT Th.ori-R: AGGCAGGCTCTTTTTCGGCTGΔ (подчеркнутые базы имеют полиморфизм)	Kubota et al., 1996; Kamau et al. 2011
<i>T. orientalis</i>	HRM ПЦР в реальном времени	200	p33F: GTAAGACTYGACTACTTCT p33R: AGCGGATGAGRAMAGCGCTGAG F3: GTAAGACTYGACTACTTCT B3: AGCGGATGAGRAMAGCGCTGAG FIP:	Wang et al., 2010
<i>T. orientalis</i>	MPSP p33, традиционный	Множе- ственные полосы	GCCTCGCTCTCAAGCTTTTGTAGAGATTCAAGGAGGTTTACTTC BIP: TGAACAATGCTTGGCCTTTGTTTACGGCAAGTGGTGAGAACTT	Wang et al., 2010
<i>T. orientalis</i>	MPSP p33, LAMP	240	F: CAGTACCTCGATGAAAGTTGTA R: CGAGTCTTACGACTTTCTTCT Probe: (6-Fam)CTCGACGCATCCAAAGTTCGCA G(Tamra) (Phosphate)	Choi et al., 1997; Jeong et al., 2003

Специфичность молекулярных исследований

Большинство молекулярных анализов зависит от праймеров и/или зондов, нацеленных на небольшие, консервативные области генов, характерных для всех членов вида или рода. В случае с генами, кодирующими белки, вырожденный характер генетического кода затрудняет разработку конкретных праймеров или зондов, снижая их чувствительность по сравнению с более консервативными рибосомальными генами (Pienaar et al., 2011a, 2013). Однако гены белков могут обеспечить большую специфичность за счет отдаленности ортологичных отношений (Odongo et al., 2010; Pienaar et al., 2011a). В условиях ограниченной информации о разнообразии гена или ограничения доступности общей информации о геноме, задача разработки конкретных методов анализа заключается в идентификации уникальных регионов в генах или геноме. Примером этому могут служить праймеры RLB для одновременного обнаружения *Theileria* и *Babesia*. Они нацелены на районы 18S рРНК, с заключенной между ними областью гиперпеременной V4 и остаются на сегодняшний день характеристичными для всех членов этих родов (Gubbels et al., 1999). Особо следует отметить, что этот метод был разработан для оценки разнообразия 18S рРНК у домашних животных и в дикой природе задолго до того, как стала доступна обширная геномная информация для рода *Theileria* (Gubbels et al., 1999). Зонды, используемые в методе RLB, являются видоспецифичными, основанными на последовательностях генов рибосомной РНК (Allsopp et al., 1993; Bishop et al., 1995). Они могут обнаруживать всех членов вида, согласно постулированию сохранности области гиперпеременной 18S в пределах видов. Чувствительность ДНК-зондов значительно увеличивается благодаря ПЦР амплификации минимальных количеств ДНК возбудителя заболевания, присутствующих в крови животных (Allsopp et al., 1989). Видоспецифичные ДНК-зонды были разработаны для *T. parva* (Allsopp and Allsopp, 1988; Conrad et al., 1987; Morzaria et al., 1999), *T. mutans* (Morzaria, 1989) и *T. annulata* (d'Oliveira et al., 1995).

Чувствительность молекулярных методов исследований и диапазоны паразитемии

Большинство молекулярных анализов нацелено на обнаружение геномной ДНК и, следовательно, их чувствительность зависит от эффективности ее извлечения, т. е. выхода, количества копий генов в геноме, количестве паразитов (геномных копий) на выборку клеток и уровня паразитемии (т.е. процента инфицированных эритроцитов). Образцами, наиболее подходящими для молекулярной детекции *Theileria* spp. у позвоночных хозяев, являются кровь и селезенка. После отбора они должны быть охлаждены до + 4 ° С. Однако, если образцы не используются в течение ближайших 72 часов, их следует хранить при -20 ° С. Образцы крови в полевых условиях можно сушить на бумажных носителях (картах ФТА), что упрощает транспортировку и долгое хранение (Rahikainen et al., 2016).

Большинство молекулярных анализов, основанных на традиционной технологии ПЦР или ПЦР в режиме реального времени, соответствует необходимому уровню требований в отношении аналитической чувствительности (>400000 паразитов/литр крови животного). Согласно естественному распределению паразитемии у животных-носителей, эти анализы позволяют обнаруживать большинство инфицированных особей в эндемических условиях. Однако потенциал ложноотрицательных результатов возможно оценить только в пределах биологической модели, когда паразит находится

внутри его позвоночного хозяина, т.е. паразитемии в переносчике, которое будет поддерживать заражение вектора и последующую передачу (Mans et al., 2015).

Конкретный диапазон паразитемии вида может определять его практический предел детектирования. Поскольку большинство видов *Theileria* spp. обычно имеют более высокие диапазоны паразитемии в состоянии носительства (Mans et al., 2015), можно сделать вывод, что анализы ПЦР в реальном времени должны позволять выявлять большинство инфицированных животных в стаде. Однако, в случаях колебания паразитемии ниже пределов обнаружения, необходимо применение нескольких раундов тестирования (Ueti et al., 2012).

Коинфекции

Наиболее сложными для диагностики представляются случаи, когда чувствительность анализа зависит от наличия смешанных инфекций. Действительно, клещи-переносчики могут быть коинфицированы множеством разнообразных патогенов и непатогенных симбионтов, которые могут мешать поддержанию и передаче патогенов или могут способствовать их сохранению (Moutailler et al., 2016; Lempereur et al., 2017). Количество сопутствующих инфекций КРС может варьировать от двух до шести или более различных патогенов, передаваемых клещами (Hailemariam et al., 2017; Ringo et al., 2018), хотя большинство смешанных инфекций встречаются как двойные инфекции (Hailemariam et al., 2017). Котрансмиссия нескольких патогенов может привести к коинфекции, которая увеличивает тяжесть и продолжительность заболевания, риски передачи (Vaumourin et al., 2015) или давать развитие атипичных симптомов, что создает диагностические трудности (Moutailler et al., 2016).

В случае коинфекции чувствительность молекулярных методов, например метода RLB, в значительной степени зависит от использования универсальных праймеров, поскольку они в ходе ПЦР истощаются преобладающими видами, присутствующими в образце, одновременно давая слабый сигнал от менее распространенной матрицы (Pienaar et al., 2011a). Решением этой проблемы может быть разработка более специфичных праймеров и соответствующих условий проведения ПЦР, уменьшающих описанное выше явление, за счет небольшого снижения аналитической чувствительности, но с повышением общей эффективности для полевых образцов (Pienaar et al., 2011b).

Для решения аналогичной проблемы, подавления чувствительности при использовании универсальных праймеров для анализа *cox III*, была предложена стратегия вложенного ПЦР (Chaisi et al., 2013), повышающего общую чувствительность (Schnittger et al., 2004; Odongo et al., 2010; Ueti et al., 2012). Однако метод требует осторожности в связи с проблемами лабораторного загрязнения или не достаточной специфичности праймеров, что приводит к подавлению ПЦР наиболее доминирующими генотипами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, несмотря на наличие обширных ресурсов для диагностики *Theileria* spp., для их уверенной диагностики необходимо сочетание методов идентификации возбудителя заболевания, применяемых на одном и том же образце, поскольку многие из доступных анализов ограничены по специфичности и чувствительности. Поэтому положительный диагноз в ряде случаев возможен только как результат по крайней мере двух независимых методов или нескольких анализов. Лучшее понимание биологических характеристик многих «новых» видов паразита, а также накопление информации о новых сиквенсах в базах данных позволит в будущем улучшить диагностические возможности, что положительно скажется на эпидемиологии болезни.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования выполнены в рамках Государственного задания Минобрнауки России № 0445-2021-0016.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Зубайрова М.М., Газимагомедов М.Г., Атаев А.М., Абдулмагомедов С.Ш. 2017. Эпизоотология смешанных инвазий пироплазмидов крупного рогатого скота в Терско-Сулакской низменности. Ветеринария и кормление 5: 28–30. [Zubairova M.M., Gazimagomedov M.G., Ataev A.M., Abdulmagomedov S.Sh. 2017. The epizootology of mixed invasions of piroplasmosis of cattle in Terek-Sulak lowland. Veterinaria i kormlenie 5: 28–30. (in Russian)]
- Новак М.Д., Енгашев С.В., Филимонов Д.Н. 2019. Анаплазмоз и бабезиоз крупного рогатого скота в Центральном районе Российской Федерации. Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 20: 421–427. [Novak M.D., Engashev S.V., Filimonov D.N. Anaplasmosis and babesiosis of cattle in Central region of Russian federation. Theory and Practice of Struggle Against Parasitic Diseases 20: 421–427. (in Russian)] DOI: 10.31016/978-5-9902340-8-6.2019.20.421-427
- Самойловская Н.А., Успенский А.В., Новосад Е.В., Гулюкин Е.А., Малышева Н.С., Буренок А.С., Орлова И.И., Белоусова И.Н. 2015. Гемоспоридиозы сельскохозяйственных, домашних и диких животных на территории российской федерации. Российский паразитологический журнал. 3: 37–44. [Samoylovskaya N.A., Uspensky A.V., Novosad E.V., Gulyukin E.A., Malysheva N.S., Buryonok A.S., Orlova I.I., Belousova I.N. Hemosporidiosis of farm, domestic and wild animals on the territory of Russian federation. Russian Journal of Parasitology 3: 37–44. (in Russian)] DOI:10.12737/13267
- Alhassan A., Govind Y., Tam N.T., Thekiso O.M.M., Yokoyama N., Inoue N., Igarashi I. 2007. Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piroplasmosis. Parasitology Research 100 (5): 1165–1168. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0430-6>
- Allsopp B.A., Allsopp M.T.E.P. 1988. *Theileria parva*: genomic DNA studies reveal intra-specific sequence diversity. Molecular and Biochemical Parasitology 28 (1): 77–83. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(88\)90183-1](https://doi.org/10.1016/0166-6851(88)90183-1)
- Allsopp B.A., Baylis H.A., Allsoppi M.T.E.P., Cavalier-Smith T., Bishop R.P., Carrington D.M., Sohanpal B., Spooner, P. 1993. Discrimination between six species of *Theileria* using oligonucleotide probes which detect small subunit ribosomal RNA sequences. Parasitology 107 (2): 157–165. <https://doi.org/10.1017/S0031182000067263>
- Allsopp B., Carrington M., Baylis H., Sohal S., Dolan T., Iams K. 1989. Improved characterization of *Theileria parva* isolates using the polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. Molecular and Biochemical Parasitology 35 (2):137–147. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(89\)90116-3](https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90116-3)
- Altay K., Aydin F.M., Dumanli N., Aktas M. 2008. Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. Veterinary Parasitology 158 (4): 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.025>
- Bishop R., Allsopp B., Spooner P., Sohanpal B., Morzaria S., Gobright E. 1995. *Theileria*: improved species discrimination using oligonucleotides derived from large subunit ribosomal RNA sequences. Experimental Parasitology 80 (1): 107–115. <https://doi.org/10.1006/expr.1995.1012>
- Bishop R., Sohanpal B., Kariuki D.P., Young A.S., Nene V., Baylis H., Allsopp B.A., Spooner P.R., Dolan T.T., Morzaria S.P. 1992. Detection of a carrier state in *Theileria parva*-infected cattle by the polymerase chain reaction. Parasitology 104 (2): 215–232. <https://doi.org/10.1017/S0031182000061655>
- Bott N.J., Campbell B.E., Beveridge I., Chilton N.B., Rees D., Hunt P.W., Gasser R.B. 2009. A combined microscopic-molecular method for the diagnosis of strongylid infections in sheep. International Journal for Parasitology 39 (11): 1277–1287. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.03.002>
- Burridge M.J., Brown C.G.D., Kimber C.D. 1974. *Theileria annulata*: Cross-reactions between a cell culture schizont antigen and antigens of East African species in the indirect fluorescent antibody test. Experimental Parasitology 35 (3): 374–380. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(74\)90043-5](https://doi.org/10.1016/0014-4894(74)90043-5)
- Bursakov S.A., Kovalchuk S.N. 2019. Co-infection with tick-borne disease agents in cattle in Russia. Ticks and Tick-borne Diseases 10 (3): 709–713. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.03.004>
- Chae J.-s., Lee J.-m., Kwon O.-d., Holman P.J., Waghela S.D., Wagner G.G. 1998. Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene variable (V4) region among and within geographic isolates of *Theileria* from cattle, elk and white-tailed deer. Veterinary Parasitology 75 (1): 41–52. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00183-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00183-0)
- Chaisi M.E., Janssens M.E., Vermeiren L., Oosthuizen M.C., Collins N.E., Geysen D. 2013. Evaluation of a real-time PCR test for the detection and discrimination of *Theileria* species in the African buffalo (*Syncerus caffer*). PLoS ONE 8 (10): e75827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075827>

- Choi E.J., Kang S.W., Kweon C.H., Jeong W.S., Yoon Y.D., Song H.J. 1997. Rapid detection of *Theileria sergenti* by polymerase chain reaction. *Korean Journal of Parasitology* 35 (2): 111–117. <http://dx.doi.org/10.3347/kjp.1997.35.2.111>
- Collins N.E., Allsopp M.T.E.P., Allsopp B.A. 2002. Molecular diagnosis of theileriosis and heartwater in bovines in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96 (S1): S217–S224. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90079-9](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90079-9)
- Conrad P.A., Stagg D.A., Grootenhuis J.G., Irvin A.D., Newson J., Njamungeh R.E., Rossiter P.B., Young A.S. 1987. Isolation of *Theileria* parasites from African buffalo (*Syncerus caffer*) and characterization with anti-schizont monoclonal antibodies. *Parasitology* 94 (3): 413–423. <https://doi.org/10.1017/S0031182000055761>
- Criado-Fornelio A. 2007. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for *Babesia* and *Theileria*, with emphasis on bovine piroplasmids. *Parassitologia* 49 (S1): 39–44. https://www.researchgate.net/profile/Monica_Florin-Christensen/publication/6147199_Taking_advantage_of_the_polymorphism_of_the_MSA-2_family_for_Babesia_bovis_strain_characterization/links/548df9710cf225bf66a5f7ae/Taking-advantage-of-the-polymorphism-of-the-MSA-2-family-for-Babesia-bovis-strain-characterization.pdf#page=39
- de Waal D.T. 1992. Equine piroplasmids: A review. *British Veterinary Journal* 148 (1): 6–14. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(92\)90061-5](https://doi.org/10.1016/0007-1935(92)90061-5)
- d'Oliveira C., van der Weide M., Habela M.A., Jacquet P., Jongejan F. 1995. Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (10): 2665–2669. <https://jcm.asm.org/content/jcm/33/10/2665.full.pdf>
- El-Ashker M., Hotzel H., Gwida M., El-Beskawy M., Silaghi C., Tomaso H. 2015. Molecular biological identification of *Babesia*, *Theileria*, and *Anaplasma* species in cattle in Egypt using PCR assays, gene sequence analysis and a novel DNA microarray. *Veterinary Parasitology* 207 (3–4): 329–334. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.025>
- Florin-Christensen M., Schnittger L. 2009. Piroplasmids and ticks: a long-lasting intimate relationship. *Frontiers in Bioscience* 14: 3064–3073. DOI: 10.2741/3435
- Gardner M.J., Bishop R., Shah T., de Villiers E.P., Carlton J.M., Hall N., Ren Q., Paulsen I.T., Pain A., Berriman M., Wilson R.J.M., Sato S., Ralph S.A., Mann D.J., Xiong Z., Shallom S.J., Weidman J., Jiang L., Lynn J., Weaver B., Shoaibi A., Domingo A.R., Wasawo D., Crabtree J., Wortman J.R., Haas B., Angiuoli S.V., Creasy T.H., Lu C., Suh B., Silva J.C., Utterback T.R., Feldblyum T.V., Perlea M., Allen J., Nierman W.C., Taracha E.L.N., Salzberg S.L., White O.W., Fitzhugh H.A., Morzaria S., Venter J.C., Fraser C.M., Nene V. 2005. Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes. *Science* 309 (5731): 134–137. <https://doi.org/10.1126/science.1110439>
- Gebrekidan H., Perera P.K., Ghafar A., Abbas T., Gasser R.B., Jabbar A. 2020. An appraisal of oriental theileriosis and the *Theileria orientalis* complex, with an emphasis on diagnosis and genetic characterisation. *Parasitology Research* 119 (1): 11–22. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06557-7>
- Geysen D., Bishop R., Skilton R., Dolan T.T., Morzaria S. 1999. Molecular epidemiology of *Theileria parva* in the field. *Tropical Medicine and International Health* 4 (9): A21–A27. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1999.00447.x>
- Gotia H.T., Munro J.B., Knowles D.P., Daubenberger C.A., Bishop R.P., Silva J.C. 2016. Absolute quantification of the host-to-parasite DNA ratio in *Theileria parva*-infected lymphocyte cell lines. *PLoS ONE* 11 (3): e0150401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150401>
- Gubbels J.M., de Vos A.P., van der Weide M., Viseras J., Schouls L.M., de Vries E., Jongejan F. 1999. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (6): 1782–1789. DOI: 10.1128/JCM.37.6.1782-1789.1999
- Gubbels M.J., Hong Y., van der Weide M., Qi B., Nijman I.J., Guangyuan L., Jongejan F. 2000. Molecular characterisation of the *Theileria buffeli/orientalis* group. *International Journal for Parasitology* 30 (8): 943–952. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00074-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00074-6)
- Hailemariam Z., Krücken J., Baumann M., Ahmed J.S., Clausen P.-H., Nijhof A.M. 2017. Molecular detection of tick-borne pathogens in cattle from Southwestern Ethiopia. *PLoS ONE* 12(11): e0188248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188248>
- Hayashida K., Hara Y., Abe T., Yamasaki C., Toyoda A., Kosuge T., Suzuki Y., Sato Y., Kawashima S., Katayama T., Wakaguri H., Inoue N., Homma K., Tada-Umezaki M., Yagi Y., Fujii Y., Habara T., Kanehisa M., Watanabe H., Ito K., Gojobori T., Sugawara H., Imanishi T., Weir W., Gardner M., Pain A., Shiels B., Hattori M., Nene V., Sugimoto C. 2012. Comparative genome analysis of three eukaryotic parasites with differing abilities to transform leukocytes reveals key mediators of *Theileria*-induced leukocyte transformation. *mBio* 3 (5): e00204-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00204-12>
- Heidarpour Bami M., Haddadzadeh H.R., Kazemi B., Khazraiiina P., Bandehpour M., Aktas M. 2009. Molecular identification of ovine *Theileria* species by a new PCR-RFLP method. *Veterinary Parasitology* 161 (3–4): 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.035>

- Herwaldt B.L., Cacciò S., Gherlinzoni F., Aspöck H., Slemenda S.B., Piccaluga P., Martinelli G., Edelhofer R., Hollenstein U., Poletti G., Pampiglione S., Löschenberger K., Tura S., Pieniżak N.J. 2003. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerging Infectious Diseases* 9 (8): 942–948. <https://doi.org/10.3201/eid0908.020748>
- Jeong W., Kweon C.H., Kang S.W., Paik S.G. 2003. Diagnosis and quantification of *Theileria sergenti* using Taq-Man PCR. *Veterinary Parasitology* 111 (4): 287–295. [https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-22](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)0Kamau J., de Vos A.J., Playford M., Salim B., Kinyanjui P., Sugimoto C. 2011. Emergence of new types of <i>Theileria orientalis</i> in Australian cattle and possible cause of theileriosis outbreaks. <i>Parasites and Vectors</i> 4: 22. <a href=)
- Kappmeyer L.S., Thiagarajan M., Herndon D.R., Ramsay J.D., Caler E., Djikeng A., Gillespie, J.J., Lau, A.O.T, Roalson, E.H., Silva J.C., Silva M.G., Suarez C.E., Ueti V.W., Nene V.M., Mealey R.H., Knowles D.P., Brayton K.A. 2012. Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. *BMC Genomics* 13: 603. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-603>
- Katzer F., McKellar S., Ben Miled L., D’Oliveira C., Shiels B. 1998. Selection for antigenic diversity of Tams1, the major merozoite antigen of *Theileria annulata*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 849 (1): 96–108. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb11039.x>
- Katzer F., Ngugi D., Oura C., Bishop R.P., Taracha E.L.N., Walker A.R., McKeever D.J. 2006. Extensive genotypic diversity in a recombining population of the apicomplexan parasite *Theileria parva*. *Infection and Immunity* 74 (10): 5456–5464. <https://doi.org/10.1128/IAI.00472-06>
- Kim C.M., Blanco L.B.C., Alhassan A., Iseki H., Yokoyama N., Xuan X., Igarashi I. 2008. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. *Veterinary Parasitology* 151 (2-4): 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.10.023>
- Kirvar E., Ilhan T., Katzer F., Hooshmand-Rad P., Zweggarth E., Gerstenberg C., Phipps P., Brown C.G.D. 2000. Detection of *Theileria annulata* in cattle and vector ticks by PCR using the Tams1 gene sequences. *Parasitology* 120 (3): 245–254. <https://doi.org/10.1017/S0031182099005466>
- Kubota S., Sugimoto C., Kakuda T., Onuma M. 1996. Analysis of immunodominant piroplasm surface antigen alleles in mixed populations of *Theileria sergenti* and *T. buffeli*. *International Journal of Parasitology* 26 (7): 741–747. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(96\)00047-1](https://doi.org/10.1016/0020-7519(96)00047-1)
- Kundave V.R., Patel A.K., Patel P.V., Hasnani J.J., Joshi C.G. 2015. Detection of theileriosis in cattle and buffaloes by polymerase chain reaction. *Journal of Parasitic Diseases* 39 (3): 508–513. <https://doi.org/10.1007/s12639-013-0386-2>
- Kundave V.R., Ram H., Banerjee P.S., Garg R., Mahendran K., Ravikuma G.V.P.P.S., Tiwari A.K. 2018. Development of multiplex PCR assay for concurrent detection of tick borne haemoparasitic infections in bovines. *Acta Parasitologica* 63 (4): 759–765. <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0090>
- Lempereur L., Beck R., Fonseca I., Marques C., Duarte A., Santos M., Zúquete S., Gomes J., Walder G., Domingos A., Antunes S., Baneth G., Silaghi C., Holman P., Zint A. 2017. Guidelines for the detection of *Babesia* and *Theileria* parasites. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 17 (1): 51–65. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1955>
- Li Z., Liu J., Ma Q., Xu J., Wang J., Liu A., Li Y., Guan G., Luo J., Yin H. 2020. Development and evaluation of a chemiluminescence immunoassay for detecting tropical theileriosis. *Acta Tropica* 202: 105245. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105245>
- Mans B.J., Pienaar R., Latif A.A. 2015. A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 4 (1): 104–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.12.006>
- Martin-Sanchez J., Viseras J., Adroher F.J., García-Fernández P. 1999. Nested polymerase chain reaction for detection of *Theileria annulata* and comparison with conventional diagnostic techniques: its use in epidemiology studies. *Parasitology Research* 85 (3): 243–245. <https://doi.org/10.1007/s004360050541>
- Morrison D.A. 2009. Evolution of the Apicomplexa: where are we now? *Trends in Parasitology* 25 (8): 375–382. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.05.010>
- Morzaria S.P. 1989. Identification of *Theileria* species and characterization of *Theileria parva* stocks. In: Dolan T.T. (eds) *Theileriosis in Eastern, Central and Southern Africa: Proceeding Workshop on East Coast Fever Immunization, Lilongwe, Malawi, 20–22 September, 1988*. Nairobi, Kenya. ILRAD. 102–110.
- Morzaria S.P., Katende J., Musoke A., Nene V., Skilton R., Bishop R. 1999. Development of sero-diagnostic and molecular tools for the control of important tick-borne pathogens of cattle in Africa. *Parasitologia* 41 (S1): 73–80.
- Moutailler S., Moro C.V., Vaumourin E., Michelet L., Tran F.H., Devillers E., Cosson J.-F., Gasqui P., Van V.T., Mavingui P., Voure’h G., Vayssier-Taussat M. 2016. Co-infection of Ticks: The Rule Rather Than the Exception. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 10 (3): e0004539. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004539>

- Nene V., Morrison W.I. 2016. Approaches to vaccination against *Theileria parva* and *Theileria annulata*. *Parasite Immunology* 38 (12): 724–734. <https://doi.org/10.1111/pim.12388>
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 28 (12): e63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- Odongo D.O., Sunter J.D., Kiara H.K., Skilton R.A., Bishop R.P. 2010. A nested PCR assay exhibits enhanced sensitivity for detection of *Theileria parva* infections in bovine blood samples from carrier animals. *Parasitology Research* 106 (2): 357–365. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1670-z>
- Oosthuizen M.C., Zwegarth E., Collins N.E., Troskie M., Penzhorn B.L. 2008. Identification of a novel *Babesia* sp. from a sable antelope (*Hippotragus niger* Harris, 1838). *Journal of Clinical Microbiology* 46 (7): 2247–2251. DOI: 10.1128/JCM.00167-08
- Ota N., Mizuno D., Kuboki N., Igarashi I., Nakamura Y., Yamashina H., Hanzaike T., Fujii K., Onoe S., Hata H., Kondo S., Matsui S., Koga M., Matsumoto K., Inokuma H., Yokoyama N. 2009. Epidemiological survey of *Theileria orientalis* infection in grazing cattle in the eastern part of Hokkaido, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 71(7): 937–944. <https://doi.org/10.1292/jvms.71.937>
- Pain A., Renauld H., Berriman M., Murphy L., Yeats C.A., Weir W., Kerhornou A., Aslett M., Bishop R., Bouchier C., Cochet M., Coulson R.M.R., Cronin A., de Villiers E.P., Fraser A., Fosker N., Gardner M., Goble A., Griffiths-Jones S., Harris D.E., Katzer F., Larke N., Lord A., Maser P., McKellar S., Mooney P., Morton F., Nene V., O'Neil S., Price C., Quail M.A., Rabinowitz E.I., Rawlings N.D., Rutter S., Saunders D., Seeger K., Shah T., Squares R., Squares S., Tivey A., Walker A.R., Woodward J., Dobbelaere D.A.E., Langsley G., Rajandream M.A., McKeever D., Shiels B., Tait A., Barrell B., Hall N. 2005. Genome of the host-cell transforming parasite *Theileria annulata* compared with *T. parva*. *Science*. 309 (5731): 131–133. <https://doi.org/10.1126/science.1110418>
- Papli N.E., Landt O., Fleischer C., Koekemoer J.O., Mans B.J., Pienaar R., Josemans A., Zwegarth E., Potgieter F., Latif A.A. 2011. Evaluation of a TaqMan real-time PCR for the detection of *Theileria parva* in buffalo and cattle. *Veterinary Parasitology* 175 (3-4): 356–359. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.038>
- Perera P.K., Gasser R.B., Firestone S.M., Smith L., Roeber F., Jabbar A. 2015. Semiquantitative multiplexed tandem PCR for the detection and differentiation of four *Theileria orientalis* genotypes in cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 53 (1): 79–87. DOI: 10.1128/JCM.02536-14
- Pienaar R., Latif A.A., Thekisoe O.M.M., Mans B.J. 2013. Protein gene candidates for the qualitative molecular detection of *Theileria parva* in African buffalo (*Syncerus caffer*) using the real-time SYBR green polymerase chain reaction. *Proceedings of the 1st Annual International Conference on Advances in Veterinary Science Research (VETSCI2013)*, Singapore.
- Pienaar R., Potgieter F.T., Latif A.A., Thekisoe O.M.M., Mans B.J. 2011a. Mixed *Theileria* infections in free-ranging buffalo herds: implications for diagnosing *Theileria parva* infections in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) *Parasitology* 138 (7): 884–895. <https://doi.org/10.1017/S0031182011000503>
- Pienaar R., Potgieter F.T., Latif A.A., Thekisoe O.M.M., Mans B.J. 2011b. The Hybrid II assay: a sensitive and specific real-time hybridization assay for the diagnosis of *Theileria parva* infection in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) and cattle. *Parasitology* 138 (14): 1935–1944. <https://doi.org/10.1017/S0031182011001454>
- Pienaar R., Potgieter F.T., Latif A.A., Thekisoe O.M.M., Mans B.J. 2014. Geographic distribution of *Theileria* sp. (buffalo) and *Theileria* sp. (bougasvlei) in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) in southern Africa: implications for speciation. *Parasitology* 141 (3): 411–424. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001728>
- Pulford D.J., Gias E, Bueno I.M., McFadden A.M.J. 2016. Developing high throughput quantitative PCR assays for diagnosing Ikeda and other *Theileria orientalis* types common to New Zealand in bovine blood samples. *New Zealand Veterinary Journal* 64 (1): 29–37. <https://doi.org/10.1080/00480169.2015.1089798>
- Rahikainen A.-L., Palo J.U., Leeuw W., Budowle B., Sajantila A. 2016. DNA quality and quantity from up to 16 years old post-mortem blood stored on FTA cards. *Forensic Science International* 261: 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.02.014>
- Ringo A.E., Moumouni P.F.A., Lee S.-H., Liu M., Khamis Y.H., Gao Y., Guo H., Zheng W., Efstratiou A., Galon E.M., Li J., Tiwananthagorn S., Inoue N., Suzuki H., Thekisoe O., Xuan X. 2018. Molecular detection and characterization of tick-borne protozoan and rickettsial pathogens isolated from cattle on Pemba Island, Tanzania. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. 9 (6): 1437–1445. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.06.014>
- Salih D.A., Ali A.M., Liu Z., Bakheit M.A., Taha K.M., El Imam A.H., Kullmann B., El Hussein A.M., Ahmed J.S. Seitzer U. 2012. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Theileria lestoquardi*. *Parasitology Research* 110 (2): 533–538. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2518-x>
- Salim B., Bakheit M.A., Sugimoto C. 2013. Rapid detection and identification of *Theileria equi* and *Babesia caballi* by high-resolution melting (HRM) analysis. *Parasitology Research* 112 (11): 3883–3886. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3581-2>

- Santos M., Soares R., Costa P., Amaro A., Inácio J., Gomes J. 2013. Revisiting the Tams1-encoding gene as a species-specific target for the molecular detection of *Theileria annulata* in bovine blood samples. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 4 (1-2): 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.07.006>
- Schnittger L., Yin H., Qi B., Gubbels M.J., Beyer D., Niemann S. 2004. Simultaneous detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasites infecting small ruminants by reverse line blotting. *Parasitology Research* 92 (3): 189–196. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0980-9>
- Shirozu T., Badolo A., Soga A., Yoshimura A., Morishita Y.K., Koketsu M., Shirafuji R.U., Inokuma H., Yokoyama N., Fukumoto S. 2020. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method targeting *Theileria* parasites infecting Yezo sika deer. *Parasitology International* 77: 102130. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102130>
- Sibeko K.P., Oosthuizen M.C., Collins N.E., Geysen D., Rambritch N.E., Latif A.A., Groeneveld H.T., Potgieter F.T., Coetzer J.A. 2008. Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction test for the detection of *Theileria parva* infections in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) and cattle. *Veterinary Parasitology* 155 (1-2): 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.vetpa.2009.07.004>
- Sivajothi S., Reddy B.S. 2018. Molecular Diagnosis of Parasitic Diseases in Sheep – A Review. *International Journal of Livestock Research* 8 (2): 14–24. <https://doi.org/10.5455/ijlr.20170922043628>
- Skilton R.A., Bishop R.P., Katende J.M., Mwaura S., Morzaria S.P. 2002. The persistence of *Theileria parva* infection in cattle immunized using two stocks, which differ in their ability to induce a carrier state: analysis using a novel blood spot PCR assay. *Parasitology* 124 (3): 265–276. <https://doi.org/10.1017/S0031182001001196>
- Thekisoe O.M., Rambritch N.E., Nakao R., Bazie R.S., Mbatia P., Namangala B., Malele I., Skilton R.A., Jongejan F., Sugimoto C., Kawazu S., Inoue N. 2010. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection of *Theileria parva* infections targeting the PIM and p150 genes. *International Journal of Parasitology* 40 (1): 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.07.004>
- Tokarevich N., Tronin A., Gnativ B., Revich B., Blinova O., Evengard B. 2017. Impact of air temperature variation on the ixodid ticks habitat and tick-borne encephalitis incidence in the Russian Arctic: The case of the Komi Republic. *International Journal Circumpolar Health*. 76 (1): 1298882. <https://doi.org/10.1080/2423982.2017.1298882>
- Ueti M.W., Mealey R.H., Kappmeyer L.S., White S.N., Kumpula-McWhirter N., Pelzel A.M., Graue J.F., Bunn T.O., Schwartz A., Traub-Dargatz J.L., Hendrickson A., Espy B., Guthrie A.J., Fowler W.K., Knowles D.P. 2012. Re-emergence of the apicomplexan *Theileria equi* in the United States: elimination of persistent infection and transmission risk. *PLoS ONE* 7 (9): e44713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044713>
- Vaumourin E., Voure'h G., Gasqui P., and Vayssier-Taussat M. 2015. The importance of multiparasitism: examining the consequences of co-infections for human and animal health. *Parasites and Vectors* 8 (1): 545. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1167-9>
- Wang J., Yang J., Gao S., Liu A., Rashid M., Li Y., Liu Z., Liu J., Liu G., Luo J., Guan G., Yin H. 2020. Rapid detection and differentiation of *Theileria annulata*, *T. orientalis* and *T. sinensis* using high-resolution melting analysis. *Ticks and Tick-Borne Disease*. 11 (1): 101312. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101312>
- Wang J., Yang J., Liu J., Wang X., Xu J., Liu A., Li Y., Liu Z., Ren Q., Luo J., Guan G., Yin H. 2018. Molecular detection and genetic diversity of *Theileria orientalis* in cattle in China. *Parasitology Research* 117 (12): 3689–3694. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6023-3>
- Wang L.X., He L., Fang R., Song Q.Q., Tu P., Jenkins A., Zhou Y.Q., Zhao J.L. 2010. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Theileria sergenti* infection targeting the p33 gene. *Veterinary Parasitology* 171 (1-2): 159–162. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.046>
- Yang Y., Mao Y., Kelly P., Yang Z., Luan L., Zhang J., Li J., El-Mahallawy H.S., Wang C. 2014. A pan-*Theileria* FRET-qPCR survey for *Theileria* spp. in ruminants from nine provinces of China. *Parasites and Vectors* 7: 413. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-413>
- Zaemi M., Haddadzadeh H., Khazraiiina P., Kazemi B., Bandehpour M. 2011. Identification of different *Theileria* species (*Theileria lestoquardi*, *Theileria ovis*, and *Theileria annulata*) in naturally infected sheep using nested PCR-RFLP. *Parasitology Research* 108 (4): 837–843. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2119-0>
- Zhao H., Liu J., Li Y., Yang C., Zhao S., Liu J., Liu A., Liu G., Yin H., Guan G., Luo J. 2016. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine PBMCs transformed and non-transformed by *Theileria annulata*. *Korean Journal of Parasitology* 54 (1): 39–46. doi: 10.3347/kjp.2016.54.1.39
- Zhou M., Cao S., Sevinc F., Sevinc M., Ceylan O., Moumouni P.F., Jira-pattharasate C., Liu M., Wang G., Iguchi A., Vudriko P., Suzuki H., Xuan X. 2016. Molecular detection and genetic identification of *Babesia bigemina*, *Theileria annulata*, *Theileria orientalis* and *Anaplasma marginale* in Turkey. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 7 (1): 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.09.008>

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF CATTLE THEILERIOSIS

S. A. Bursakov

Keywords: *Theileria*, theileriosis, cattle, molecular diagnostics

SUMMARY

Detection and treatment of theileriosis is an important tool for controlling this disease. Wide range of *Theileria* spp. species, their species-specific characteristics, disease severity, and drug susceptibility determine the importance of accurate identification of the pathogen for epidemiological research and diagnostic purposes, taking into account the characteristics of their vertebrate hosts and arthropod vectors. The presence of many varieties of *Theileria* is an incentive for the creation of PCR test systems with an ability to identify different species, as well as to register coinfection. Modern methods of control detection and spreading of the disease do not always allow recognizing early stages; this fact, taking in account high transience of the disease, can contribute to losses in animal husbandry. Hence, the development of rapid and sensitive detection methods in the early stages of the disease causes interest. The present paper presents modern approaches to the molecular diagnostics of *Theileria* spp.