

РАЗДЕЛ 3.4.

БЫЧЬИ

ГЛАВА 3.4.1.

АНАПЛАЗМОЗ КРС

РЕЗЮМЕ

Определение болезни: Анаплазмоз КРС возникает по причине инфекции *Anaplasma marginale*. Вторым видом, *A. centrale*, является давно признанным и обычно вызывает инфекции в легкой форме. Почти все вспышки клинической болезни возникают по причине *Anaplasma marginale*. *Anaplasma phagocytophilum* и *A. bovis*, которые инфицируют КРС, недавно были включены в род, однако не сообщалось, что они вызывают клиническую болезнь. Организм относится к роду *Anaplasma*, принадлежащему семейству *Anaplasmataceae* отряда *Rickettsiales*.

Описание болезни: Характерными признаками анаплазмоза являются анемия и желтуха внезапная смерть. Другие признаки включают быстрое снижение удоя и потерю веса, однако клиническую болезнь можно подтвердить только после идентификации организма. Однажды заразившись данной болезнью, КРС может оставаться носителем в течение всей жизни, и идентификация таких животных зависит от обнаружения специфических антител с помощью серологических методов, или риккетсиозных ДНК с помощью методов амплификации. Данная болезнь обычно переносится клещами, однако также возможна передача механическим путем жалающими насекомыми.

Идентификация возбудителя: Наиболее общепринятым способом идентификации *Anaplasma* у клинически пораженных животных является изучение под микроскопом мазков крови или органов, окрашенных красителем Гимза. В этих мазках *A. marginale* представляет собой густое скопление округлых внутриэритроцитных тел, диаметром примерно 0,3-1,0 мкм, при этом большинство тел расположено на границе эритроцита или рядом с ней. *Anaplasma centrale* похожа по внешнему виду, но большая часть организмов находится ближе к центру эритроцита. Сложно отличить *A. marginale* от *A. centrale* по окрашенному мазку, особенно если уровень риккетсиоза низкий. В некоторых странах доступны коммерческие красители, которые быстро окрашивают *Anaplasma*.

Примечательно, что Anaplasma phagocytophilum и A. Bovis инфицируют только гранулоциты, в основном нейтрофильные.

Важно, чтобы мазки были хорошо приготовлены и свободны от инородных тел. Мазки от живых особей КРС лучше готовить из крови, взятой из яремной вены или другого крупного сосуда. Для патологоанатомического диагностирования мазки должны быть приготовлены из внутренних органов (включая печень, почки, сердце и легкие) и из крови, взятой из периферических сосудов. Последнее особенно желательно при значительном разложении туши.

Серологические тесты: *Было доказано, что конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ (К-ИФА) обладает хорошей чувствительностью при обнаружении животных-носителей. Вторым наиболее часто используемым тестом является реакция агглютинации на карточках. По причине вариабельной чувствительности реакция связывания комплемента больше не считается надежным тестом для сертификации болезни у отдельных особей. Перекрестная реактивность между Anaplasma spp может усложнить интерпретацию серологических тестов. В целом, конкурентный ИФА обладает самой высокой специфичностью, при этом описывается перекрестная реактивность между A. marginale, A. centrale, A. phagocytophilum и Ehrlichia spp. В качестве альтернативы непрямой ИФА с использованием реакции связывания комплемента с модификациями также является надежным тестом, который проводится во многих лабораториях, и который можно приготовить самостоятельно для рутинной диагностики анаплазмоза.*

Тестирование на основе нуклеиновых кислот *проводят экспериментально. С помощью него можно обнаружить наличие инфекции низкого уровня у КРС-носителей и клещей-векторов. Гнездовая реакция с использованием традиционной полимеразной цепной реакции (ПЦР) необходима для идентификации носителей инфекции низкого уровня, но может возникнуть неспецифическая амплификация. Недавно были описаны ПЦР в реальном времени, аналитическая чувствительность которых была такой же, как у традиционной гнездовой ПЦР.*

Требования к вакцинам и диагностическим биопрепаратам: *Живые вакцины используются в нескольких странах для защиты КРС от инфекции A. marginale. Наиболее широко используется вакцина, которая состоит из живого A. centrale. Она обеспечивает частичную защиту против контрольного заражения вирулентным A. marginale.*

Вакцина против *Anaplasma centrale* существует в двух формах: охлажденной и замороженной. Контроль качества очень важен, поскольку у КРС-доноров могут присутствовать другие возбудители, передающиеся с кровью, которые могут контаминировать вакцину и широко распространиться. По этой причине рекомендуется использовать замороженную вакцину, поскольку она позволяет проведение тщательного контроля качества после производства, который снижает риск заражения другими патогенами.

Вакцина против *Anaplasma centrale* не является полностью безопасной. В связи с этим рекомендуется применять вакцину, по мере возможности, только по отношению к телятам, у которых неспецифический иммунитет минимизирует риск реакции на вакцину, которые требуют лечения тетрациклином или имидокарбом. После однократной вакцинации частичный иммунитет вырабатывается через 6-8 недель и продолжается в течение нескольких лет. В странах, где *A. centrale* является экзотическим, его использование в качестве вакцины против *A. marginale* запрещено.

А. ВВЕДЕНИЕ

Вспышки анаплазмоза КРС возникают по причине инфекции *Anaplasma marginale*. *Anaplasma centrale* способна продуцировать умеренную степень анемии, но клинические вспышки в полевых условиях возникают чрезвычайно редко. Новые виды *Anaplasma*, *A. phagocytophilum* и *A. bovis* (Dumler *et al.*, 2001), первоначальным резервуаром которых являются грызуны, инфицируют КРС, но не вызывают клинической болезни (Dreher *et al.*, 2005; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2004).

Наиболее выраженными клиническими признаками анаплазмоза являются анемия и желтуха, последнее возникает на поздней стадии болезни. Гемоглобинемия и гемоглобинурия отсутствуют, что помогает в проведении дифференциальной диагностики анаплазмоза от бабезиоза, который зачастую является эндемичным в некоторых регионах. Тем не менее, болезнь можно подтвердить только с помощью идентификации организма.

Anaplasma marginale возникает в большинстве тропических, субтропических стран и в некоторых более умеренных регионах. *Anaplasma centrale* впервые описали в Южной Африке. С тех пор организмы импортируют из других стран, включая Австралию и некоторые страны Южной Америки, юго-восточной Азии и Ближнего Востока, для использования в качестве вакцин против *A. marginale*.

Виды *Anaplasma* изначально относили к простейшим паразитам, но более позднее исследование показало, что они не обладают необходимыми характеристиками, чтобы

попасть под это определение. С момента последней редакции таксономии, принятой в 2001 году (Dumler *et al.*, 2001), семейство *Anaplasmataceae* (отряд *Rickettsiales*) в настоящее время состоит из четырех родов: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* и *Wolbachia*. Род *Aegyptianella* остался в семействе *Anaplasmataceae* как род *incertae sedis*. Род *Anaplasma* включает сейчас *Anaplasma marginale* как типовой вид, *A. phagocytophilum* – возбудитель гранулоцитарного эрлихиоза человека (ранее *Ehrlichia phagocytophila*, *E. Equi*), *A. platys* и *A. bovis*. В настоящее время считается, что *Haemobartonella* и *Eperythrozoon* наиболее близкородственны микоплазмам.

Виды *Anaplasma* передаются либо механическим, либо биологическим путем членистоногими переносчиками. Обзоры на основе тщательного изучения экспериментов по передаче дают список, включающий до 19 различных клещей, способных в передавать *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2004). Среди них: *Argas persicus*, *Ornithodoros lahorensis*, *Dermacentor albipictus*, *D. andersoni*, *D. hunteri*, *D. occidentalis*, *D. variabilis*, *Hyalomma excavatum*, *H. rufipes*, *Ixodes ricinus*, *I. scapularis*, *Rhipicephalus annulatus* (ранее известный как *Boophilus annulatus*), *R. bursa*, *R. calcaratus*, *R. decoloratus*, *R. evertsi*, *R. microplus*, *R. sanguineus* и *R. simus*. Однако классификация нескольких клещей в данных отчетах является спорной. Обычно передача происходит интрастадиально или трансстадиально, даже у имеющего одного хозяина вида *Rhipicephalus*. Клещи мужского пола имеют особенную важность как векторы; они могут становиться персистентно инфицированными и служить резервуаром инфекции. Экспериментальное подтверждение способности вектора не обязательно указывает на его роль в передаче в полевых условиях. Тем не менее, вид *Rhipicephalus* является важным вектором анаплазмоза в таких странах, как Австралия и странах Африки, а некоторые виды *Dermacentor* являются эффективными векторами в Соединенных Штатах Америки (США).

Различные другие жалящие членистоногие считались механическими векторами, особенно в США. Передача в ходе эксперимента состоялась с участием ряда видов *Tabanus* (слепеней) и комаров рода *Psorophora* (Kocan *et al.*, 2004). Степень важности участия жалящих насекомых в естественной передаче анаплазмоза сильно варьирует от региона к региону. *Anaplasma marginale* может легко передаваться во время вакцинации против другой болезни, если для введения вакцины животным используются старые или нестерилизованные иглы. Был описан подобный случай передачи нестерилизованными хирургическими инструментами (Reinbold *et al.*, 2010a).

Основными биологическими векторами *A. centrale* являются клещи, у которых много хозяев, которые характерны для Африки, включая *R. simus*. Было доказано, что обычный

кольчатый клещ (*R. microplus*) не является вектором. Это важно, поскольку *A. centrale* используют в качестве вакцины в зараженных *R. microplus* регионах.

О случаях заражения человека *Anaplasma marginale* не сообщалось. Таким образом, нет никакого риска передачи болезни рабочим в полевых или лабораторных условиях, а лаборатории, работающие с *A. marginale*, могут быть самого низкого уровня биобезопасности, который эквивалентен BSL1.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Методы исследования для диагностики анаплазмоза
KPC и их цель

| Метод | Цель | | | | | |
|--|-------------------------------|---|---------------------------------|--|----------------------------------|---|
| | Свобода популяции от инфекции | Свобода отдельного животного от инфекции перед его перемещением | Вклад в политику по искоренению | Подтверждение клинических случаев у животных | Превалентность инфекции - надзор | Иммунный статус отдельных животных или популяции и после вакцинации |
| Исследование под микроскопом | - | + | - | +++ | - | - |
| Идентификация возбудителя¹ | | | | | | |
| ПЦР | - | +++ | - | +++ | - | - |
| Обнаружение иммунного ответа | | | | | | |
| РА на карточках | - | - | - | - | +- | + |
| ИФА | +++ | + | +++ | - | +++ | +++ |
| Непрямой ИФА | + | - | - | - | ++ | ++ |
| РСК | - | - | - | - | + | - |

Разъяснение: +++ = рекомендуемый метод; ++ = подходящий метод; + = может быть использован в некоторых случаях, однако стоимость, надежность или другие факторы значительно ограничивают его применение; - = не подходит для данной цели.

Несмотря на то, что не все тесты в категории +++ или ++ прошли формальную валидацию, их рутинная природа и тот факт, что их широко используют, а результаты не вызывают сомнений, делает их допустимыми.

РА на карточках = реакция агглютинации на карточках; РСК = реакция связывания комплемента; ИФА = иммуноферментный анализ; непрямой ИФА = непрямой иммуноферментный анализ; ПЦР = полимеразная цепная реакция.

¹ Рекомендуется использование нескольких методов идентификации возбудителя с использованием одного и того же клинического образца.

1. Идентификация возбудителя

1.1. Исследование под микроскопом

Образцы от живого скота должны включать тонкие мазки крови и кровь, собранную в антикоагулянт. Высушенные на воздухе тонкие мазки крови остаются в нормальном состоянии при комнатной температуре, как минимум, в течение 1 недели. Образцы крови в антикоагулянте следует хранить и перевозить при температуре 4°C в случае, если они не попадут в лабораторию в течение нескольких часов. Эти образцы используются для приготовления свежих мазков, если представленные образцы не отвечают требованиям. Кроме того, низкий средноклеточный объем и/или небольшое количество эритроцитов может доказать вовлеченность *A. marginale*, когда в мазках обнаружено лишь незначительное число паразитов, которое, например, может возникнуть на стадии выздоровления.

По сравнению с *Babesia bovis*, *A. marginale* не накапливается в капиллярах, поэтому кровь, взятая из яремных вен или других крупных сосудов, удовлетворительна. По причине нетипичной морфологии *Anaplasma*, необходимо, чтобы мазки были хорошо приготовлены и не содержали посторонних включений, таких как частицы дебриса, которые могут помешать диагностике. Толстые капли крови, как те, которые используются для диагностики бабезиоза, не подходят для диагностики анаплазмоза, так как *Anaplasma* сложно идентифицировать после того, как они отделяются от эритроцитов.

Образцы от павших животных должны включать высушенные на воздухе тонкие мазки печени, почек, сердца и легких, а также крови из периферических кровеносных сосудов. Последнее особенно рекомендуется сделать, когда патологоанатомическое исследование проходит с задержкой, поскольку в таком случае бактериальная контаминация мазков органов часто приводит к неоднозначности идентификации *Anaplasma*. Мазки головного мозга, которые необходимы для диагностики некоторых форм бабезиоза, не представляют никакой ценности при диагностике анаплазмоза, но должны быть включены для дифференциальной диагностики, в случае необходимости.

Для приготовления мазков необходима скорее кровь из органов, чем из тканей органов *per se*, поскольку целью является исследование с помощью микроскопа интактных эритроцитов на наличие *Anaplasma*. Полученные из органов мазки крови хорошо хранятся при комнатной температуре в течение нескольких дней.

И мазки крови, и мазки органов можно окрасить, поместив в 10% краситель Гимзы примерно на 30 минут, после фиксации в абсолютизированном метаноле в течение 1

минуты. После окрашивания мазки необходимо промыть три или четыре раза водопроводной водой, чтобы удалить лишнюю краску, и затем просушить на воздухе. Условия для окрашивания красителем Гимзы варьируют в зависимости от лаборатории, однако не рекомендуется использование дистиллированной воды для разведения красителя Гимза. Для наилучшего растворения красителя вода должна иметь pH 7.2-7.4. В некоторых странах доступны коммерческие красители, которые быстро окрашивают *Anaplasma*. Мазки исследуют под масляной иммерсионной линзой при $\times 700-1000$ увеличении.

Anaplasma marginale представляет собой плотно расположенные, округлые и сильно окрашенные интраэритроцитарные тельца, диаметр которых составляет примерно 0,3-1,0 μm . Большинство из этих телец расположено либо на, либо рядом с границей эритроцита. Данная черта отличает *A. marginale* от *A. centrale*, так как в последнем случае большинство организмов занимает более центральное положение в эритроците. Однако, особенно при низких уровнях риккетсиоза, дифференциация этих двух видов по мазкам может оказаться затруднительной. У некоторых изолятов *A. marginale* были описаны отростки, ассоциированные с тельцами *Anaplasma* (Kreier и Ristic, 1963; Stich *et al.*, 2004).

Процент инфицированных эритроцитов варьирует в зависимости от стадии и степени тяжести болезни. При *A. marginale* может возникнуть максимальный риккетсиоз, превышающий 50%. Множественное заражение отдельных эритроцитов обычно происходит при высоком уровне риккетсиоза.

Инфекцию можно увидеть под микроскопом через 2-6 недель после передачи. В ходе клинической болезни риккетсиоз примерно удваивается с каждым днем, что происходит до десяти дней, а потом снижается на таком же уровне. Тяжелая форма анемии может персистировать в течение нескольких недель после того, как паразитов становится практически невозможно обнаружить в мазках крови. После выздоровления от первоначальной инфекции, скот остается латентно инфицированными в течение всей жизни.

1.2. Полимеразная цепная реакция

Для обнаружения инфекции *A. marginale* у КРС-носителей были разработаны тесты на основе нуклеиновых кислот, однако они не до конца валидированы. Аналитическую чувствительность методов, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР), оценили на 0,0001% инфицированных эритроцитах, но на этом уровне можно обнаружить только долю КРС, который является носителем. Для идентификации КРС - носителей *A.*

marginale проводят вложенную ПЦР, с помощью которой можно идентифицировать 30 инфицированных эритроцитов на мл крови, что значительно ниже уровней у носителей. Однако, проведение вложенной ПЦР проблематично в плане специфичности и контроля качества для рутинного использования (Torioni De Echaide *et al.*, 1998). ПЦР в реальном времени также была описана для идентификации *A. marginale* (Carelli *et al.*, 2007; Decaro *et al.*, 2008; Reinbold *et al.*, 2010), и вместо вложенной ПЦР лучше использовать ее. У этого метода, при котором используется одна закрытая трубка для амплификации и анализа, есть два преимущества: низкая вероятность заражения ампликона и результат полуколичественного анализа. Оборудование, необходимое для проведения ПЦР в реальном времени дорогое, требует проведения планового технического обслуживания и ремонта, и у некоторых лабораторий может не быть возможности на его приобретение и обслуживание. ПЦР в реальном времени может быть нацелена на один из нескольких генов (Carelli *et al.* 2007; Decaro *et al.*, 2008), или на 16S рРНК (Reinbold *et al.*, 2010b) и достигать при этом уровня аналитической чувствительности, равной вложенной традиционной ПЦР (Carelli *et al.*, 2007; Decaro *et al.*, 2008; Reinbold *et al.*, 2010b).

2. Серологические тесты

В целом, если лечение животных не проводилось, или они находятся на ранней стадии болезни (< 14 дней), серология, с использованием конкурентного твердофазного иммуносорбентного анализа (К-ИФА), непрямого ИФА или реакции агглютинации на карточках (САТ) (см. ниже), может быть наиболее оптимальным способом идентификации инфицированных животных для большинства лабораторий. Инфекции *Anaplasma* обычно персистируют в течение всей жизни животного. Однако, за исключением редкого небольшого обострения, *Anaplasma* непросто обнаружить в мазках крови после тяжелой формы риккетсиоза и даже с помощью ПЦР с детекцией по «конечной точке» можно не обнаружить наличие *Anaplasma* в образцах крови асимптоматических носителей. Таким образом, с целью обнаружения персистентно инфицированных животных был разработан ряд серологических тестов.

Характерной чертой серологической диагностики анаплазмоза является высокая вариабельность результатов, как в отношении чувствительности, так и в отношении специфичности, о которых сообщали после проведения многочисленных тестов в разных лабораториях. Это происходит, как минимум, по причине неадекватной оценки тестов с использованием большого количества известных положительных и отрицательных животных. Важно отметить, что способность нескольких исследований обнаружить известные длительные инфекции была неадекватно рассмотрена. Исключение составляет К-ИФА (см. ниже), который валидировали, используя действительно положительных и

отрицательных животных, которых определили с помощью вложенной ПЦР (Torioni De Echaide *et al.*, 1998), и реакции агглютинации на карточках, для которой оценили относительную чувствительность и специфичность по сравнению с К-ИФА (Molloy *et al.*, 1999). Таким образом, в то время как большинство из описанных в данном разделе тестов используют для получения всеобъемлющих эпизоотологических данных, необходимо осторожно подходить к их выбору для сертификации болезни. К-ИФА, непрямой ИФА и реакция агглютинации на карточках подробно описаны ниже.

Следует отметить, что при проведении серологических тестов высока степень перекрестной реактивности между *A. marginale* и *A. centrale*, а также перекрестной реактивности с *A. phagocytophilum* и *Ehrlichia spp.* (Al-Adhami *et al.*, 2011; Dreher *et al.*, 2005). Несмотря на то, что инфицирующие виды иногда можно идентифицировать, используя антигены от гомологичных и гетерологичных видов, во многих случаях полученные результаты являются неоднозначными.

2.1. Конкурентный твердофазный иммуносорбентный анализ

Доказано, что К-ИФА с использованием рекомбинантного антигена rMSP5 и MSP-5-специфического моноклонального антитела (MAb) очень чувствителен и специфичен для обнаружения животных, зараженных *Anaplasma* (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2004; Reinbold *et al.*, 2010b; Strik *et al.*, 2007). Все протестированные штаммы *A. marginale* вместе с *A. ovis* и *A. centrale* экспрессируют антиген MSP5 и индуцируют антитела против иммунодоминантного эпитопа, который распознается MSP5-специфическим моноклональным антителом. В недавнем отчете говорится о том, результаты К-ИФА на антитела от КРС, экспериментально зараженного *A. phagocytophilum*, будут положительными (Dreher *et al.*, 2005). Однако в другом тесте перекрестная реактивность не наблюдалась, и моноклональное антитело, использованное для анализа прямого связывания, не вступило в реакцию с MSP5 *A. phagocytophilum* (Strik *et al.*, 2007). Недавно наблюдали перекрестную реактивность между *A. marginale* и *Ehrlichia spp.* как у естественно, так и у экспериментально зараженных животных (Al-Adhami *et al.*, 2011). Более ранние исследования показали, что К-ИФА является на 100% специфичным, при этом использовали 261 известную отрицательную сыворотку из не эндемичного региона, обнаружив экспериментально зараженного клещом или кровью скота всего через 16 дней. Также с помощью К-ИФА смогли обнаружить КРС, который экспериментально инфицировали 6 лет назад (Knowles *et al.*, 1996). При обнаружении в регионе, где анаплазмоз является эндемической болезнью, персистентно инфицированного скота, который определили как истинно положительный или отрицательный с помощью

вложенной ПЦР, чувствительность К-ИФА к rMSP5 составляла 96%, а специфичность 95% (Torioni De Echaide *et al.*, 1998).

Результаты теста К-ИФА к rMSP5 доступны менее чем через 2,5 часа. Набор для тестирования имеется в продаже и содержит специфические инструкции. В целом, исследование проводят следующим образом.

2.1.1. Реагенты в наборе

Микротитровальный планшет с 96 лунками, покрытыми антигеном rMSP5,
Покрытый 96-луночный планшет для адсорбции/ перемещения для адсорбции сыворотки и сокращения фоновой связки,
100×МАб/конъюгат пероксидазы,
10×отмывающий раствор и готовый к использованию разбавляющий буфер для конъюгата,
Готовые к использованию субстрат и стоп-реагенты,
Положительные и отрицательные контроли

2.1.2. Процедура тестирования

- i) 70μл неразбавленного образца сыворотки добавляют в покрытый планшет для адсорбции/перемещения и инкубируют при комнатной температуре в течение 30 минут.
- ii) На каждую лунку в планшет, покрытый rMSP5 перемещают по 50 μл адсорбированной сыворотки, и инкубируют при комнатной температуре в течение 60 минут.
- iii) Сыворотку сливают и дважды промывают планшет разбавленным отмывочным раствором.
- iv) На каждую лунку добавляют по 50 μл 1×разбавленного конъюгата МАб/пероксидазы и инкубируют при комнатной температуре в течение 20 минут.
- v) 1×разбавленный конъюгат МАб/пероксидазы сливают и промывают планшет четыре раза разбавленным отмывочным раствором.
- vi) В каждую лунку добавляют по 50 μл раствора субстрата, покрывают планшет фольгой и инкубируют при комнатной температуре в течение 20 минут.
- vii) В каждую лунку с раствором субстрата добавляют по 50 μл стоп-реагента, слегка постукивая по стенкам планшета, чтобы содержимое лунок перемешалось.

viii) Быстро считывают результаты в планшет-ридере при 620 нм.

2.1.3. Валидация теста

Средняя оптическая плотность (ОП) отрицательного контроля должна быть в пределах от 0,40 до 2,10. Процент ингибирования положительного контроля должен быть $\geq 30\%$.

2.1.4. Интерпретация результатов

Процент ингибирования рассчитывается следующим образом:

$$100 - \frac{\text{ОП:образца} \times 100}{\text{Среднее: значение: ОП: отрицательного: контроля}} = \text{Процент: ингибирования}$$

Образцы, у которых процент ингибирования $< 30\%$, являются отрицательными. Образцы, у которых процент ингибирования $\geq 30\%$, являются положительными.

Специфичность К-ИФА к MSP5 можно повысить, используя пороговое значение с более высоким процентом ингибирования (Bradway *et al.*, 2001); однако, влияние данного изменения на чувствительность не было в достаточной степени оценено.

Недавно разработали более совершенный К-ИФА к MSP5 путем замещения rMBP-MSP5 rGST-MSP5 в дополнение к усовершенствованному методу покрытия антигеном с использованием специфической системы захвата. Новый К-ИФА к r MSP5-GST оказался быстрее, проще, обладает более высокой специфичностью и повышенным разрешением по сравнению с К-ИФА к rMBP-MSP5 с помощью адсорбции MBP (Chung *et al.*, 2014).

2.2. Непрямой иммуноферментный анализ

Непрямой иммуноферментный анализ был впервые разработан с использованием антигена для реакции агглютинации на карточках (см. ниже), и его можно проводить в случае, когда конкурентный ИФА недоступен. В отличие от конкурентного ИФА большинство реагентов, таких как буферы и готовые к растворению субстраты, имеются в продаже в большинстве стран. В любой лаборатории можно приготовить антиген с использованием местных штаммов *A. marginale*. При непрямом ИФА используются небольшие количества сыворотки и антигена, а чувствительность и специфичность теста, стандартизированного с помощью положительных и отрицательных сывороток, является такой же высокой, как и у конкурентного ИФА. Поскольку его можно провести в любой лаборатории, здесь приводится лишь общая процедура (Barry *et al.*, 1986). Что касается коммерческих наборов, необходимо следовать инструкции производителя. В случае проведения собственного непрямого ИФА, необходимо обратиться к Barry *et al.*, 1986.

Первичные организмы и мембраны получают так же, как и для реакции связывания комплемента (Rogers et al., 1964). Данный антиген обрабатывают 0,15-м додецилсульфатом натрия в течение 30 минут перед фиксацией антигена на титровальном микропланшете. Специфическое количество антигена для получения наиболее эффективного считывания при наименьших финансовых затратах определяется каждой лабораторией самостоятельно.

Результаты непрямого ИФА доступны через 4-5 часов. Исследование проводят следующим образом:

2.2.1. Реагенты

96-луночный титровальный микропланшет, сенсibilизированный неочищенным антигеном *A. marginale*,

Фосфатно-солевой буферный раствор /Твин буфер (ФБР 0,1 М; рН 7,2; Твин 20 0,05%),

Блокирующий реагент (например, коммерческое сухое обезжиренное молоко),

Трис-буфер 0,1 М; MgCl₂ 0,1 М; NaCl 0,05 М; рН 9,8

Субстрат п-нитрофенилфосфата динатриевой соли

Положительные и отрицательные контроли.

2.2.2. Процедура тестирования (данный тест проводится в трех повторностях)

- i) Планшеты можно подготовить заранее и хранить в герметичных условиях при температуре -20°C.
- ii) С планшетов перед их использованием аккуратно удаляют пластиковую упаковку, не касаясь при этом их дна, так как это может исказить считывание оптической плотности.
- iii) Снимают крышку и помещают по 200 μ л фосфатно-солевого буферного раствора с Твин 20 в каждую лунку, инкубируют при комнатной температуре в течение 5 минут.
- iv) Для одного планшета растворяют 1,1 г обезжиренного молока (блокирующего агента) в 22 мл фосфатно-солевого буферного раствора с Твин 20
- v) Содержимое планшета удаляют, в каждую лунку помещают по 200 μ л блокирующего раствора, накрывают крышкой и инкубируют при температуре 37°C в течение 60 минут.
- vi) Планшет промывают фосфатно-солевым буферным раствором с Твин 20 три раза в течение 5 минут.
- vii) Образцы сыворотки, включая контрольные, разводят 1/100 в фосфатно-солевом буферном растворе с Твин 20.

- viii) Содержимое планшета удаляют, в каждую из трех лунок для каждого разведения добавляют по 200 μ л разведенной сыворотки, начиная с положительного, отрицательного и пустого контроля.
- ix) Покрытый планшет инкубируют при температуре 37 °С в течение 60 минут.
- x) Промывают три раза, как описано в подразделе vi.
- xi) Анти-IgG конъюгат щелочной фосфатазы (бычьей) разводят 1/1000 в фосфатно-солевом буферном растворе с Твин 20; в каждую лунку добавляют по 200 μ л разбавленного конъюгата; Покрытый планшет инкубируют при температуре 37°С в течение 60 минут.
- xii) Снимают крышку и трижды промывают фосфатно-солевым буферным раствором с Твин 20.
- xiii) Содержимое планшета удаляют, в Трис-буфер добавляют 195 μ л 0,075% п-нитрофенилфосфата динатриевой соли и инкубируют при температуре 37°С в течение 60 минут.
- xiv) Реакцию количественно оценивают с помощью спектрофотометра для считывания микропланшетов, настроенного на длину волны 405 нм. Данные выражают в виде оптической плотности.

2.2.3. Анализ данных

При анализе данных следует учитывать следующие параметры:

- i) Среднее значение пустых лунок.
- ii) Среднее значение положительных лунок с соответствующими для них стандартными отклонениями.
- iii) Среднее значение отрицательных лунок с соответствующими для них стандартными отклонениями.
- iv) Среднее значение пустых лунок вычитается из среднего значения всех остальных образцов, если ИФА ридер не делает этого автоматически.
- v) Проводится титрование контрольных сывороток для получения оптической плотности в диапазоне от 0,90 до 1,50 для положительного контроля и от 0,15 до 0,30 для отрицательного контроля

Положительными считаются те значения, которые выше рассчитанной точки разделения, которая представляет собой сумму среднего значения отрицательного контроля и удвоенного стандартного отклонения.

В целях оценки стабильности тестового оператора необходимо также оценить погрешность “Е”; она рассчитывается путем определения процента, представленного отношением стандартного отклонения любого значения к их среднему значению сыворотки.

2.3. Реакция агглютинации на карточках

Преимущества реакции агглютинации на карточках заключаются в ее высокой чувствительности, в том, что ее можно проводить как в лабораторных, так и в полевых условиях, и в том, что она дает результаты в течение нескольких минут. Неспецифические реакции могут представлять проблему, а субъективность при интерпретации результатов реакции может привести к вариабельности. Кроме того, сложным может оказаться приготовление антигена для реакции агглютинации на карточках, который представляет собой суспензию из частиц *A. marginale* и может варьировать от партии к партии, и от лаборатории к лаборатории. Спленэктомированных телят инфицируют путем внутривенного введения крови, содержащей зараженные *Anaplasma* эритроциты. Когда уровень риккетсиоза превышает 50%, животное обескровливают, инфицированные эритроциты промывают, лизируют, а "тень" эритроцита и частицы *Anaplasma* гранулируют. Гранулы разрушают ультразвуком, промывают и ресуспендируют в красящем растворе, чтобы приготовить антигенную суспензию.

Ниже представлена процедура тестирования, которая была слегка модифицирована, по сравнению с описанной изначально (Amerault и Roby, 1968; Amerault *et al.*, 1972), и которая проводится в контролируемых лабораторных условиях:

2.3.1. Процедура тестирования:

- i) Перед использованием всех компонентов, необходимых для проведения тестирования, необходимо убедиться в том, что их температура составляет 25-26°C (такая постоянная температура крайне важна для теста).
- ii) На каждый круг карточки для теста (чистой пластинки из перспекса/пластика или стекла с нанесенными кругами, диаметром 18 мм) помещают друг за другом, 10 мл сывороточный фактор КРС (BSF), 10 мл тестовой сыворотки и 5 мл антигена САТ² так, чтобы они не касались друг друга. На каждой карточке необходимо протестировать отрицательные и низко положительные контрольные сыворотки.

² В тестах, которые проводят в США и Мексике используют большие объемы реагентов: антиген (15 мл), сыворотка (30 мл), сывороточный фактор КРС (30 мл), время реакции 4 минуты (см. этап iv).

Сывороточный фактор КРС – это сыворотка, полученная от выбранных животных с известным высоким уровнем конглютина. Если уровень конглютина неизвестен, можно использовать свежую сыворотку от здорового животного, которое свободно от *Anaplasma*. Сывороточный фактор КРС необходимо хранить при температуре -70°C в маленьких аликвотах, и каждый раз при проведении теста необходимо использовать свежую аликвоту. Включение сывороточного фактора КРС повышает чувствительность теста.

- iii) Тщательно перемешивают с помощью стеклянной палочки для перемешивания. После перемешивания необходимо вытереть палочку чистой тканью, чтобы избежать перекрестной контаминации
- iv) Карточку для теста помещают во влажную камеру и встряхивают при 100-110 оборотах в минуту в течение 7 минут.
- v) Сразу же считывают результаты с использованием фоновой подсветки. Характерный клампинг антигенов (от +1 до +3) считается положительным результатом. Результат теста считается отрицательным, когда характерное скопление не наблюдается.

2.4. Реакция связывания комплемента

Реакция связывания комплемента широко применялась в течение многих лет; однако, она демонстрирует изменчивую чувствительность (в пределах от 20 до 60%), возможно отражая различия в техниках производства антигена, а также плохую воспроизводимость. Кроме того, было показано, что реакция связывания комплемента не может обнаружить значительную долю КРС, которые являются носителями (Bradway *et al.*, 2001). Также неизвестно точно, может ли реакция связывания комплемента идентифицировать антитела у животных с острой формой инфицирования до проведения других тестов (Coetzee *et al.*, 2007; Molloy *et al.*, 1999). Таким образом, не рекомендуется полагаться на реакцию связывания комплемента, поскольку она является ненадежной для обнаружения инфицированных животных.

2.5. Непрямая реакция флюоресцирующих антител

По причине того, что один оператор может проводить ограниченное число не прямых реакций флюоресцирующих антител (РИФ) предпочтение обычно отдают другим видам серологических тестов. РИФ проводят, как описано для бабезиоза КРС в Главе 2.4.2, за исключением того, что для подготовки антигенных мазков используют зараженную *A. marginale* кровь. Одной из серьезных проблем, связанных с тестом, считается

неспецифическая флуоресценция. Наиболее подходящим является антиген, полученный из крови, собранной сразу же после того, как риккетсиоз достиг должного уровня (5-10%). Неспецифическую флуоресценцию, вызванную прикреплением антигенов к инфицированным эритроцитам, можно уменьшить путем промывания эритроцитов в кислотном глициновом буфере перед приготовлением антигенных мазков. Инфицированные эритроциты промывают дважды в 0.1 М глициновом буфере (рН 3.0, центрифугированном при 1000 g в течение 15 минут при температуре 4°C), а потом еще раз в фосфатно-солевом буферном растворе, рН 7.4. Согласно недавно опубликованным данным, реакция флуоресцирующих антител, как и конкурентный ИФА может вступать в перекрестную реакцию с другими членами семейства *Anaplasmataceae* (Al-Adhami *et al.*, 2011).

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Вводная информация

В странах, где которых анаплазмоз является эндемичной болезнью, использовали несколько методов защиты КРС, но ни один из этих методов не является идеальным (McHardy, 1984). Был опубликован обзор антигенов и вакцин против *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2003). Использование менее патогенного *A. centrale*, который обеспечивает частичную перекрестную защиту от *A. marginale*, является наиболее общепринятым методом, хотя его не применяют в странах, где данная болезнь является экзотической, включая Северную Америку.

В этом разделе описывается производство живой вакцины из *A. centrale*. Производство включает инфицирование восприимчивого, спленэктомированного теленка и использование его крови в качестве вакцины. Доступно и более подробное описание процедуры производства вакцины, поэтому в отношении процедур, указанных здесь, необходимо сделать ссылки на публикации (Bock *et al.*, 2004; de Vos & Jorgensen, 1992; Ripano, 1995).

Указания по производству ветеринарных вакцин приведены в Главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Указания, представленные здесь и в Главе 1.1.8, носят общий характер и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями.

Вакцина против *Anaplasma centrale* может быть представлена либо в замороженном, либо в охлажденном виде, в зависимости от спроса, транспортных сетей, а также наличия жидкого азота или сухого льда. В большинстве случаев рекомендуется замораживать

вакцину, так как это позволяет оценить качество каждой серии после производства. Однако, ее производство требует больших затрат, и ее сложнее транспортировать, чем охлажденную вакцину. Риск заражения делает контроль продукции после производства обязательным, но может быть чрезвычайно дорогим.

2. План производства и минимальные требования к традиционным вакцинам

2.1. Характеристика посевного материала

2.1.1. Биологические характеристики

Anaplasma centrale был выделен в 1911 году в Южной Африке, и используется в качестве вакцины в Южной Америке, Австралии, Африке, на Ближнем Востоке и в Юго-восточной Азии. Она обеспечивает только частичную, но адекватную защиту в регионах, где проблемные штаммы являются умеренно вирулентными (например, в Австралии) (Bock & de Vos, 2001). Во влажных тропиках, где *A. marginale* представляет собой высоковирулентный риккетсиоз, защита, которую обеспечивает *A. centrale*, может быть недостаточной для предотвращения болезни у некоторых животных.

Anaplasma centrale обычно вызывает легкую форму инфекции, особенно если используется в отношении телят, возраст которых составляет до 9 месяцев. Сильные реакции после вакцинации отмечались после инокуляции взрослых особей КРС. Пригодность изолята *A. centrale* в качестве вакцины можно определить путем инокуляции восприимчивого КРС, наблюдения за последующими реакциями и затем путем контрольного заражения животных и восприимчивых контролей вирулентным местным штаммом *A. marginale*. По наличию риккетсиоза в окрашенных мазках крови, а также по подавлению объема осажденных эритроцитов у инокулированных особей КРС во время вакцинации и после контрольного заражения можно судить о безопасности и эффективности.

Инфекционный материал для приготовления вакцины хранится в виде замороженной консервированной инфицированной крови в жидком азоте или на сухом льду. В качестве криоконсервантов рекомендуется использовать диметилсульфоксид (DMSO) и поливинилпирролидон M.V. 40000 (Bock *et al.*, 2004), так как они допускают внутривенное введение после разморозки консервированной крови. Подробный отчет по технике заморозки с использованием диметилсульфоксида можно найти в другом источнике (Mellors *et al.*, 1982), вкратце она включает в себя следующее: отбирают инфицированную кровь, охлаждают до 4°C, и медленно, помешивая, добавляют криопротектор (4 М DMSO в ФБР) до соотношения готовой к применению крови к

уровню защиты 1:1, так что конечная концентрация составляет 2 М DMSO. Всю процедуру разведения проводят на ледяной бане, и разведенную кровь распределяют по подходящим контейнерам (например, в 5 мл криопробиркам) и замораживают как можно скорее в контейнере, содержащем жидкий азот в парообразном состоянии.

2. Критерии качества

Чистоту изолята *A. centrale* можно определить путем серологического тестирования парных сывороток, полученных от КРС, которые используются в тестировании на безопасность, чтобы проверить на возможное присутствие контаминантов (Bock *et al.*, 2004; Ripano, 1997). Телят-доноров, которых используют для наработки посевного материала с целью дальнейшего производства вакцины, необходимо проверить на все инфекции, передающиеся через кровь, включая *Babesia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Theileria* и *Trypanosoma*, которые преобладают в стране, где производится вакцина. Это можно сделать путем рутинной проверки окрашенных мазков крови после спленэктомии, и желательно также серологическими методами. Любой теленок, у которого проявляются признаки естественной инфекции одним из этих возбудителей, отбраковывается. Необходимо также подтвердить отсутствие других инфекционных агентов, например, возбудителей энзоотического лейкоза КРС, вирусной диареи, инфекционного ринотрахеита КРС, эфемерной лихорадки, болезни Акабане, блутанга, ящура и чумы КРС. Процедура тестирования будет зависеть от того, какая болезнь преобладает в стране и от доступности тестов, но она должна включать как минимум серологическое исследование парных сывороток и, в некоторых случаях, выделение вируса, обнаружение антигена или ДНК/РНК (Bock *et al.*, 2004; Ripano, 1981; 1997).

2.2. Метод производства

2.2.1. Процедура

i) Производство замороженной вакцины

Замороженную консервированную кровь (5-10 мл) размораживают путем погружения ампул в подогретую до 40°C воду. Размороженный материал хранят на льду и используют как можно скорее (в течение 30 минут) для инфицирования восприимчивого, спленэктомированного теленка путем внутривенного введения.

За риккетсиозом теленка-донора наблюдают ежедневно, проверяя окрашенные мазки крови, взятой из яремной вены. Кровь забирают для производства вакцины, когда риккетсиоз достигает необходимого уровня. Риккетсиоз 1×10^8 /мл (примерно 2%

риккетсиоз в крови из яремной вены) является минимальным для производства вакцины, поскольку именно это доза является оптимальной для вакцинации КРС. Если риккетсиоз не достигает необходимого уровня - может потребоваться проведение второго пассажа путем перевивки второго спленэктомированного теленка кровью в объеме 100-200 мл.

Кровь от донора отбирают, путем введения в яремную вену или сонную артерию обработанной асептическим средством канюли, используя при этом гепарин в качестве антикоагулянта (5 Международных Единиц [МЕ] гепарин/ мл крови). Использование устройств для крови, предназначенных для людей, также является уместным, гарантирует стерильность и избавляет от необходимости подготовки стеклянных флаконов, которая делает процедуру более трудоемкой.

В лаборатории инфицированную кровь смешивают в равных объемах с 3 М глицерола в фосфатно-солевом буферном растворе, в который добавили 5 мМ глюкозы при температуре 37°C (конечная концентрация глицерола 1.5 М). Смесь затем приводят в равновесие при температуре 37°C в течение 30 минут и распределяют по подходящим контейнерам (например, 5 мл криопробиркам). Криопробирки охлаждают примерно при 10°C/ мин в парообразной фазе жидкого азота и затем замораживают и хранят в жидкой фазе (Vock *et al.*, 2004).

Вместо глицерола в качестве криопротектора можно использовать диметилсульфоксид. Процедура в этом случае проводится так же, как указано для приготовления консервированного посевного материала (Mellors *et al.*, 1982; Pirano, 1981).

Если глицеролизованную вакцину необходимо развести, разбавитель должен состоять из ФБР с 1.5 М глицерола и 5 мМ глюкозы (Jorgensen *et al.*, 1989). Вакцину, криосохраненную с помощью диметилсульфоксида, необходимо разводить с помощью разбавителя, содержащего такую же концентрацию диметилсульфоксида, как и в оригинальной криосохраненной крови (Pirano *et al.*, 1986).

ii) Производство охлажденной вакцины

Инфекционный материал для охлажденной вакцины готовят так же, как и для замороженной вакцины, но его необходимо использовать как можно скорее после получения. Инфицированную кровь можно развести так чтобы получилось 1×10^7 паразитов на одну дозу вакцины. Подходящим разбавителем является 10% стерильная сыворотка КРС в растворе глюкозы/ сбалансированном солевом растворе, содержащем следующее количество компонентов на литр: NaCl (7,00 г), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,34 г), глюкоза (1,00 г), Na_2HPO_4 (2,52 г), KH_2PO_4 (0,90 г) и $NaHCO_3$ (0,52 г).

Если разбавитель недоступен, в качестве антикоагулянта для обеспечения глюкозы, необходимой для выживания организмов, необходимо использовать кислую цитрат декстрозу (20% [o/o]) или цитрат фосфат декстрозу (20% [o/o]).

iii) Использование вакцины

В случае с замороженными вакцинами, пробирки необходимо разморозить путем погружения в воду, предварительно подогретую до 37°C - 40°C, а содержимое смешать с подходящим разбавителем до требуемого разведения. Когда вакцина, подвергнутая глицеролизации, приготовлена, ее необходимо хранить в прохладном месте и использовать в течение 8 часов (Vock *et al.*, 2004). Если в качестве криопротектора используется диметилсульфоксид – приготовленную вакцину необходимо хранить на льду и ее нужно использовать в течение 15-30 минут (Pirano, 1981). Вакцину обычно вводят подкожно.

iv) Охлажденную вакцину необходимо хранить в холодильнике и использовать в течение 4-7 дней после приготовления.

Штамм *A. centrale*, используемый в вакцине, обладает пониженной вирулентностью, но он не является полностью безопасным. Таким образом, рекомендуется использовать вакцину только по отношению к телятам, у которых неспецифический иммунитет минимизирует риск реакции на вакцину. Когда необходимо вакцинировать взрослых особей КРС, существует риск возникновения острой реакции. Такие реакции возникают нечасто, но ценное племенное поголовье и стельные коровы заслуживают особого внимания, поэтому за ними необходимо наблюдать ежедневно в течение 3 недель после вакцинации. Животных, у которых присутствуют клинические признаки болезни, необходимо лечить окситетрациклином или имидокарбом в дозах, рекомендуемых производителем. Защитный иммунитет вырабатывается через 6-8 недель и, как правило, продолжается в течение нескольких лет.

Часто вакцины против анаплазмоза и бабезиоза используют параллельно, однако не рекомендуется использовать другие вакцины в это же время (Vock *et al.*, 2004).

2.2.2. Требования к субстратам и средам

Anaplasma centrale нельзя культивировать *in vitro*. При производстве вакцины не используются никакие субстраты или среды, кроме буферов и разбавителей. Диметилсульфоксид или глицерол следует покупать в проверенных компаниях.

2.2.3. Контроли в ходе производства

i) Источники и содержание доноров вакцины

Необходимо идентифицировать источник телят, свободных от *Anaplasma* и других болезней, переносимых клещами. Если подходящий источник недоступен – может понадобиться разведение телят в условиях свободы от клещей в целях производства вакцины.

Телят необходимо содержать в условиях, где они не будут подвержены инфекционным болезням, а также где нет клещей и других жалящих насекомых. При отсутствии подходящих помещений – необходимо оценить риск заражения агентами инфекционных болезней, которые есть в стране, а также рассмотреть целесообразность местного производства вакцины по отношению к возможным негативным последствиям распространения болезни (Bock *et al.*, 2004).

ii) Операция

У телят-доноров необходимо удалить селезенку, чтобы получить максимальный урожай организмов для производства вакцины. Лучше всего данную процедуру проводить на молодых телятах под общей анестезией.

iii) Осмотр вакцинных доноров перед инокуляцией

Что касается приготовления консервированного посевного материала, телят-доноров, предназначенных для производства вакцины, необходимо проверить на все инфекции, передающиеся с кровью, которые преобладают в стране, производящей вакцину, включая *Babesia*, *Anaplasma*, *Cowdria*, *Theileria* и *Trypanosoma*. Это делается путем рутинной проверки окрашенных мазков крови после спленоктомии, желательным, серологическим методом. Любой теленок, у которого есть признаки естественной инфекции любым из данных возбудителей, отбраковывается. Необходимо подтвердить также отсутствие других инфекционных возбудителей, например, возбудителей энзоотического лейкоза КРС, вирусной диареи КРС, инфекционного ринотрахеита КРС, эфемерной лихорадки, болезни Акабане, блутанга, ящура и чумы. Процедура тестирования будет зависеть от того, какая болезнь преобладает в стране и от доступности тестов, но она должна включать как минимум серологическое исследование парных сывороток и, в некоторых случаях, выделение вируса, обнаружение антигена или ДНК/РНК (Bock *et al.*, 2004; Ripano, 1981; 1997).

iv) Наблюдение риккетсиоза после прививки

Необходимо определить концентрацию риккетсии в крови, отобранной для вакцины. Концентрацию риккетсии можно оценить, подсчитав эритроциты и по риккетсиозу (проценту инфицированных эритроцитов).

v) Отбор крови для вакцины

Все оборудование необходимо простерилизовать перед использованием (например, автоклавированием). Как только риккетсиоз достигает необходимого уровня, кровь отбирают в пробирку с гепарином, строго соблюдая методы асептики. Данную процедуру лучше всего проводить после введения теленку седативного препарата и с помощью закрытой системы взятия крови.

У 6-ти месячного теленка можно забрать до 3 литров сильно инфицированной крови. Если необходимо сохранить теленку жизнь, проводится переливание аналогичного объема крови от подходящего донора. В качестве альтернативы теленка необходимо умертвить сразу же после отбора крови.

vi) Распределение вакцин

Все процедуры проводятся в подходящих условиях, таких как вытяжной шкаф с ламинарным потоком воздуха, соблюдая стерильность. Использование механического или магнитного перемешивающего устройства обеспечивает тщательное перемешивание крови и разбавителя в процессе распределения вакцины. Пенициллин (500000 МЕ/ литр) и стрептомицин (370000 мкг/ литр) добавляют в вакцину во время ее распределения.

2.2.4. Проверка серии конечного продукта

В случае с охлажденной вакциной невозможно провести проверку вакцины на иммуногенность, безопасность и стерильность, а спецификации для замороженных вакцин зависят от страны, в которой она производится. Ниже приведены спецификации для замороженной вакцины, произведенной в Австралии.

i) Стерильность и чистота

Стандартное испытание на стерильность проводят в отношении каждой серии вакцины и разбавителя (смотрите Главу 1.1.9 *Исследование биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации*).

Отсутствие контаминантов определяют путем проведения соответствующих серологических тестов в отношении теленка-донора, путем введения лимфоцитов донора овцам и затем наблюдая за ними на предмет вирусной инфекции, а также путем прививания КРС и проведения мониторинга с использованием серологических методов на наличие инфекционных агентов, которые могут контаминировать вакцину. Для этой цели подходит КРС, привитый в ходе тестирования на иммуногенность (смотрите Раздел С.2.2.4.iii). В зависимости от страны происхождения вакцины, данные возбудители могут включать организмы, вызывающие энзоотический лейкоз КРС, вирусную диарею КРС, инфекционный ринотрахеит КРС, эфемерную лихорадку, болезнь Акабане, Айно вирус, блутанг, парагрипп, ящур, нодулярный дерматит, бешенство, лихорадку долины Рифт, контагиозную плевропневмонию КРС, болезнь Джембрана, инфекционный гидроперикардит, патогенные *Theileria* и *Trypanosoma* spp., *Brucella abortus*, *Coxiella* и *Leptospira* (Bock *et al.*, 2004; Ripano, 1981; 1997). Другие патогены, которые необходимо учесть, включают возбудителей туберкулеза КРС и бруцеллеза, поскольку они могут распространиться с контаминированной кровью, используемой для производства вакцины. В отношении большинства данных возбудителей можно провести исследование с помощью специфической ПЦР; имеются публикации, в которых описаны праймеры и условия проведения исследований для каждой конкретной болезни.

ii) Безопасность

Необходимо следить за реакциями КРС, привитыми в ходе теста на иммуногенность (смотрите Раздел 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*) на вакцину путем измерения риккетсиоза и снижения объёма осажденных эритроцитов. Только партии с уровнем патогенности равным или ниже установленного стандарта допускаются к выпуску.

iii) Иммуногенность

Вакцину размораживают и разводят 1/5 подходящим разбавителем (Bock *et al.*, 2004). Разведенную вакцину затем инкубируют в течение 8 часов при температуре 4°C, и пяти особям КРС вводят подкожно дозы в объеме 2 мл. За привитыми телятами наблюдают на наличие инфекций путем исследования окрашенных мазков крови. Для того, чтобы партия была принята, необходимо чтобы все были заражены. Партия, инфекционность которой была подтверждена, рекомендуется к использованию в разведении 1/5 с изотоническим разбавителем.

2.3. Требования к авторизации

2.3.1. Безопасность

Штамм *A. centrale*, используемый в вакцине, обладает сниженной вирулентностью, но не является полностью безопасным. В связи с этим рекомендуется применять вакцину только по отношению к телятам, у которых неспецифический иммунитет минимизирует риск реакции на вакцину. Когда необходимо вакцинировать взрослых особей КРС, существует риск возникновения острой реакции. Такие реакции возникают нечасто, но ценное племенное поголовье и стельные коровы заслуживают особого внимания, поэтому за ними необходимо наблюдать ежедневно в течение 3 недель после вакцинации. Животных, у которых присутствуют клинические признаки болезни, необходимо лечить окситетрациклином или имидокарбом в дозах, рекомендуемых производителем.

Anaplasma centrale не является заразным по отношению к другим видам, и считается, что вакцина не оказывает отрицательных воздействий на окружающую среду. Вакцина не является заразной для людей. Когда продукт хранится в жидком азоте, необходимо соблюдать обычные меры предосторожности в отношении хранения и транспортировки материала глубокой заморозки.

2.3.2. Требования к эффективности

После однократного введения вырабатывается частичный, но длительный иммунитет. Нет никаких доказательств того, что повторная вакцинация имеет усиливающее действие. Вакцина используется для борьбы с клиническим анаплазмозом в областях, где данная болезнь является эндемичной. Она не обеспечивает стерильный иммунитет, и не должна использоваться для искоренения *A. marginale*.

2.3.3. Стабильность

В жидком азоте вакцину можно хранить в течение 5 лет. После разморозки она сразу же теряет свою иммуногенность. Размороженную вакцину нельзя повторно замораживать.

3. Вакцины, основанные на биотехнологиях

Против анаплазмоза не существует доступных вакцин, основанных на биотехнологиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

AL-ADHAMI B., SCANDRETT W.B., LOVANOV V.A. & GAJADHAR A.A. (2011). Serological cross reactivity between *Anaplasma marginale* and Ehrlichia species in naturally and experimentally infected cattle. J. Vet. Diagn. Invest., 23, 1181–1188.

AMERAULT T.E. & ROBY T.O. (1968). A rapid card agglutination test for bovine anaplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 153, 1828–1834.

AMERAULT T.E., ROSE J.E. & ROBY T.O. (1972). Modified card agglutination test for bovine anaplasmosis: evaluation with serum and plasma from experimental and natural cases of anaplasmosis. *Proc. U.S. Anim. Health Assoc.*, 76, 736–744.

BARRY D.N., PARKER R.J., DE VOS A.J., DUNSTER P. & RODWELL B.J. (1986). A microplate enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody to *Anaplasma marginale* in cattle serum. *Aust. Vet. J.*, 63, 76–79.

BOCK R., JACKSON L., DE VOSA. & JORGENSEN W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129, Suppl, S247–269.

BOCK R.E. & DE VOS A.J. (2001). Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust. Vet. J.*, 79, 832–839.

BRADWAY D.S., TORIONI DE ECHAIDE S., KNOWLES D.P., HENNAGER S.G. & MCELWAIN T.F. (2001). Sensitivity and specificity of the complement fixation test for detection of cattle persistently infected with *Anaplasma marginale*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 13, 79–81.

CARELLI G., DECARO N., LORUSSO A., ELIA G., LORUSSO E., MARI V., CECI L. & BUONAVOGLIA C. (2007). Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Vet. Microbiol.*, 124, 107–114.

COETZEE J.F., SCHMIDT P.L., APLEY M.D., REINBOLD J.B. & KOCAN K.M. (2007). Comparison of the complement fixation test and competitive ELISA for serodiagnosis of *Anaplasma marginale* infection in experimentally infected steers. *Am. J. Vet. Res.*, 68, 872–878.

CHUNG C., WILSON C., BANDARANAYAKA-MUDIYANSELAGE C.-B., KANG E., ADAMS D.S., KAPPMAYER L.S., KNOWLES D.P., MCELWAIN T.F., EVERMANN J.F., UETI M.W., SCOLES G.A., LEE S.S. & MCGUIRE T.C. (2014). Improved diagnostic performance of a commercial *Anaplasma* antibody competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5-glutathione S-transferase fusion protein as antigen. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 26, 61–71.

DECARO N., CARELLI G., LORUSSO E., LUCENTE M.S., GRECO G., LORUSSO A., RADOGNA A., CECI L. & BUONAVOGLIA C. (2008). Duplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection and quantification of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20, 606–611.

DE VOS A.J. & JORGENSEN W.K. (1992). Protection of cattle against babesiosis in tropical and subtropical countries with a live, frozen vaccine. In: *Tick Vector Biology, Medical and Veterinary Aspects*, Fivaz B.H., Petney T.N. & Horak I.G., eds. Springer Verlag, Berlin, Germany, 159–174.

DREHER U.M., DE LA FUENTE J., HOFMANN-LEHMANN R., MELI M.K., PUSTERIA N., KOCAN K.M., WOLDEHIWET A., REGULA G. & STAERK K.D.C. (2005). Serologic cross reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Vaccine. Immunol.*, 12, 1177–1183.

DUMLER J.S., BARBET A.F., BEKKER C.P., DASCH G.A., PALMER G.H., RAY S.C., RIKIHISA Y. & RURANGIRWA F.R. (2001). Reorganization of genera in the Families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*,

Cowdria with Ehrlichia, and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of five new species combinations and designation of Ehrlichia equi and „HGE agent“ as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 2145–2165.

JORGENSEN W.K., DE VOS A.J. & DALGLIESH R.J. (1989). Infectivity of cryopreserved Babesia bovis, Babesia bigemina and Anaplasma centrale for cattle after thawing, dilution and incubation at 30°C. *Vet. Parasitol.*, 31, 243–251.

KOCAN K.M., DE LA FUENTE J., BLOUIN E.F. & GARCIA-GARCIA J.C. (2004). Anaplasma marginale (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*, 129, S285–S300.

KOCAN K.M., DE LA FUENTE J., GUGLIELMONE A.A. & MELENDÉZ R.D. (2003). Antigens and alternatives for control of Anaplasma marginale infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16, 698–712.

KNOWLES D., TORIONI DE ECHAIDE S., PALMER G., MCGUIRE T., STILLER D. & MCELWAIN T. (1996). Antibody against an Anaplasma marginale MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 2225–2230.

KREIER J.P. & RISTIC M. (1963). Anaplasmosis. X Morphological characteristics of the parasites present in the blood of calves infected with the Oregon strain of Anaplasma marginale. *Am. J. Vet. Res.*, 24, 676–687.

HOFMANN-LEHMANN R., MELI M.L., DREHER U.M., GÖNCZI E., DEPLAZES P., BRAUN U., ENGELS M., SCHÜPBACH J., JÖRGER K., THOMA R., GRIOT C., STÄRCK D.C., WILLI B., SCHMIDT J., KOCAN K.M. & LUTZ H. (2004). Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal haemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 3775–3780.

MCHARDY N. (1984). Immunization against anaplasmosis: a review. *Prev. Vet. Med.*, 2, 135–146.

MELLORS L.T., DALGLIESH R.J., TIMMS P., RODWELL B.J. & CALLOW L.L. (1982). Preparation and laboratory testing of a frozen vaccine containing Babesia bovis, Babesia bigemina and Anaplasma centrale. *Res. Vet. Sci.*, 32, 194–197.

MOLLOY J.B., BOWLES P.M., KNOWLES D.P., MCELWAIN T.F., BOCK R.E., KINGSTON T.G., BLIGHT G.W. & DALGLIESH R.J. (1999). 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.*, 77, 245–249.

PIPANO E. (1981). Frozen vaccine against tick fevers of cattle. In: XI International Congress on Diseases of Cattle, Haifa, Israel. Mayer E., ed. Bregman Press, Haifa, Israel, 678–681.

PIPANO E. (1995). Live vaccines against hemoparasitic diseases in livestock. *Vet. Parasitol.*, 57, 213–231.

PIPANO E. (1997). Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance. *Trop. Anim. Health Prod.*, 29 (Suppl. 4), 86S–90S.

PIPANO E., KRIGEL Y., FRANK M., MARKOVICS A. & MAYER E. (1986). Frozen Anaplasma centrale vaccine against anaplasmosis in cattle. *Br. Vet. J.*, 142, 553–556.

REINBOLD J.B., COETZEE J.F., HOLLIS L.C., NICKELL J.S., RIEGEL C.M., CHRISTOPHER J.A. & GANTA R.R. (2010a). Comparison of iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in Holstein steers via needle and needle-free injection techniques. *Am. J. Vet. Res.*, 71, 1178–1188.

REINBOLD J.B., COETZEE J.F., SIRIGIREDDY K.R. & GANTA R.R. (2010b). Detection of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in bovine peripheral blood samples by duplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 48, 2424–2432.

ROGERS T.E., HIDALGO R.-J. & DIMOPOULLOS G.T. (1964). Immunology and serology of *Anaplasma marginale*. I. Fractionation of the complement-fixing antigen. *J. Bacteriol.*, 88, 81–86.

STICH R.W., OLAH G.A., BRAYTON K.A., BROWN W.C., FECHHEIMER M., GREEN-CHURCH K., JITTAPALAPONG S., KOCAN K.M., MCGUIRE T.C., RURANGIRWA F.R. & PALMER G.H. (2004). Identification of a novel *Anaplasma marginale* appendage-associated protein that localizes with actin filaments during intraerythrocytic infection. *Infect Immun.*, 72, 7257–7264.

STIK N.I., ALLEMAN A.R., BARBET A.F., SORENSON H.L., WANSLEY H.L., GASCHEN F.P., LUCKSCHANDER N., WONG S., CHU F., FOLEY J.E., BJOERSDORFF A., STUEN S. & KNOWLES D.P. (2007). Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* major surface protein 5 and the extent of its cross-reactivity with *A. marginale*. *Clin. Vaccine Immunol.*, 14, 262–268.

TORIONI DE ECHAIDE S., KNOWLES D.P., MCGUIRE T.C., PALMER G.H., SUAREZ C.E. & MCELWAIN T.F. (1998). Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 777–782.

*

* *

NB: Существует Справочная лаборатория МЭБ по *Anaplasma* sp.
(см. Таблицу в Части 4 Кодекса по наземным животным или веб-сайт МЭБ чтобы
получить самый последний <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Свяжитесь со Справочной лабораторией МЭБ для получения дополнительной информации по диагностическим тестам, реагентам и вакцинам против анаплазмоза КРС