

## ГЛАВА 3.4.15

### ТЕЙЛЕРИОЗ

---

*Паразиты Theileria, передаваемые клещом КРС, являются основным препятствием для улучшения животноводства в обширных регионах Старого Света<sup>1</sup> и Австралии. Theileria annulata и T. parva, наиболее экономически значимые виды, ответственные за смертность и снижение производительности. С тейлериозом КРС обычно борются посредством акарицидов, направленных на уничтожение клещей, но воздействие данного метода не является устойчивым. Акарициды дорогостоящи, они наносят ущерб окружающей среде, и со временем клещи развивают устойчивость к ним, что приводит к необходимости разработки новых акарицидов. Необходимы более продолжительные и надежные методы контроля тейлериоза, которые сочетают стратегический контроль клещей и вакцинацию. Однако их еще только предстоит успешно применить в больших масштабах в эндемичных регионах.*

**Идентификация возбудителя:** *Диагностика различных синдромов болезней, вызванных паразитами, основывается главным образом на клинических признаках, знании болезни и векторе ее распространения, а также на идентификации паразитов в окрашенных по Гимзу мазках крови и лимфатических узлов. Наличие многоядерных внутрицитоплазматических и свободных шизонтов в биопсийных мазках лимфатических узлов является характерной диагностической особенностью острых инфекций, вызываемых T. parva и T. annulata. Животные, инфицированные T. parva, демонстрируют увеличенные лимфатические узлы, начиная с околушных лимфатических узлов, лихорадку, постепенно увеличивающуюся частоту дыхания, одышку и периодическую диарею. Наблюдаемые после вскрытия повреждения - это отек легких с пеной в трахее, увеличение лимфатических узлов и селезенки, кровоизлияния во внутренние органы, аномальные эрозии, наличие пораженных паразитами лимфоцитов и лимфопролиферативных инфильтраций в висцеральных тканях. Макропатология, вызванная шизонтами T. annulata, сходна с макропатологией, вызванной T. parva, тогда как стадии пироплазмид также могут быть патогенными, вызывая анемию и желтуху. В случае T. annulata, первыми затронутыми лимфатическими узлами являются предбедренные узлы, которые притягивают векторных клещей.*

**Молекулярный тест:** *Кроме того, более новые молекулярные диагностические тесты, особенно те, которые основаны на полимеразной цепной реакции и обратной линейной блот-гибридизации, являются мощными инструментами для описания видов и полиморфизма паразитов, определяя генетику популяции и обеспечивая эпизоотологические данные.*

**Серологические тесты:** *Наиболее широко используемым диагностическим тестом для видов Theileria является реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ). Для проведения РНИФ оба антигена шизонта и пироплазмы могут быть приготовлены на предметных стеклах или в суспензии и должны храниться в замороженном виде при  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ , за исключением суспензии пироплазмы, которая хранится при  $4^{\circ}\text{C}$ . Исследуемые сыворотки разбавляют фосфатно-буферным солевым раствором и инкубируют в суспензии с антигеном, затем добавляют конъюгат анти-бычьего иммуноглобулина. При использовании*

---

<sup>1</sup> В этой главе под термином «Старый свет» следует понимать Европу, Африку и Азию.

описанного теста флуоресценция специфична для возбудителя. РНИФ чувствителен, довольно специфичен и обычно легко выполняем. Однако из-за проблем перекрестной реактивности некоторых видов *Theileria* тест имеет ограничения в отношении крупномасштабных исследований в регионах, где имеется перекрестное распространение видов. РНИФ *T. parva* не различает различные иммуногенные группы. Непрямой иммуноферментный анализ (ИФА) *T. parva* и *T. mutans*, основанный на рекомбинантных паразит-специфических антигенах, показал более высокую чувствительность и специфичность, но его коммерческое использование было прекращено.

**Требования к вакцинам:** Против *T. parva* и *T. annulata* разработаны надежные вакцины с установленной эффективностью. Вакцина против *T. annulata* готовится из зараженных шизонтом клеточных линий, которые были выделены от КРС и аттенуированы в культуре *in vitro*. Вакцина должна оставаться замороженной до момента введения. Вакцинация против *T. parva* основана на способе заражения и лечения, при котором КРС получает дозу спорозоитов клещевого происхождения подкожно и одновременное лечение препаратом тетрациклина длительного действия. Такое лечение вызывает реакцию в виде легкой или прерывистой восточно-береговой лихорадки с последующим выздоровлением. Выздоровевшие животные демонстрируют устойчивый иммунитет к гомологичной инфекции, который обычно сохраняется в течение жизни животного. В эндемичных регионах, характеризующихся высокой интенсивностью передачи, иммунизация животных вакциной (ами), создающей иммунитет широкого спектра действия, желательна для охвата ряда иммунологических штаммов *T. parva*, которые существуют на данной территории. Иммунизированные животные обычно становятся носителями иммунизирующего паразита. При подготовке и обращении с вакцинами против *T. parva* для защиты работников и предотвращения загрязнения законсервированных культур микроорганизмов должны быть приняты меры предосторожности. Следует также учитывать риск введения новых изолятов в регионах, где они впоследствии могут укорениться через стадию носительства.

## А. ВВЕДЕНИЕ

*Theileriae* являются облигатными внутриклеточными протозойными паразитами, которые заражают как диких, так и домашних *Bovidae* в большей части мира (некоторые виды также заражают мелких жвачных животных). Они передаются иксодными клещами и имеют сложные жизненные циклы как у позвоночных, так и у беспозвоночных хозяев. Существует ряд видов *Theileria spp.* которые поражают КРС; два наиболее патогенные и экономически значимые из них – *T. parva* и *T. annulata*. *Theileria parva* встречается в 13 странах Африки к югу от Сахары, вызывая восточно-береговую лихорадку (ECF), в то время как *T. annulata* (тропический/ средиземноморский тейлериоз) встречается в Южной Европе, а также в Северной Африке и Азии. Эндемичные регионы обитания *T. annulata* и *T. parva* не пересекаются. *Theileria annulata* встречается у КРС, яков, водных буйволов и верблюдов и передается клещами рода *Hyalomma*. Тропический тейлериоз более выражен у европейских пород со смертельным исходом в 40-90% случаях, тогда как смертность среди местных пород КРС из эндемичных регионов может достигать только 3%. В Испании инфекции *T. annulata* в основном ограничены южными и средиземноморскими районами, такими как остров Менорка, где присутствуют клещи (*Hyalomma sp.*). В Северной Испании свидетельства наличия клещей *Hyaloma* являются спорадическими, как и связанная с *T. annulata* инфекция. Однако распространение клещей может измениться в силу изменений климатических условий. *Theileria orientalis/ buffeli* широко распространена во всем мире. Инфекция обычно

субклиническая; однако заболевание может возникать у КРС в зависимости от ряда эпизоотологических факторов (включая предыдущую подверженность *Theileriae*, стрессу или состоянию здоровья, а также изменения патогенности видов, сообщения о которых недавно поступили из Австралии и Новой Зеландии). *Theileria lestoquardi*, также передаваемый клещами *Hyalomma*, является единственным видом, имеющим экономическую значимость и заражающим мелких жвачных животных, который также присутствует в Северной Африке, Средиземноморском бассейне и Азии. У овец и коз заболеваемость, вызванная *T. lestoquardi*, может достигать 100% при смертности 46-100% у наиболее восприимчивых пород.

*Theileria uilenbergi* и *T. luwenshuni* являются патогенными овечьими пироплазмами, описанными в северо-западном Китае (КНР), хотя паразиты *Theileria* с подобными последовательностями были обнаружены у овец в Северной Испании и Турции, но, по-видимому, они имели низкую патогенность.

*Theileria taurotragi* и *T. mutans* обычно не вызывают болезнь или приводят к болезни в легкой форме, а *T. velifera* непатогенна. Эти последние три паразита в основном встречаются в Африке, и их области распространения пересекаются, что усложняет эпизоотологию тейлериоза у КРС. Группа паразитов, называемая комплексом *T. buffeli/ T. orientalis*, в настоящее время состоит из двух видов - *T. orientalis*, встречается на Дальнем Востоке, и *T. buffeli*, имеет глобальное распространение (Gubbels *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2010)).

Большинство *T. parva* вызывают состояние носителя у выздоровевших сельскохозяйственных животных, а исследования с использованием ДНК-маркеров для штаммов паразитов показали, что животные-носители *T. parva* являются источниками инфекции, которая может естественным образом передаваться клещами в полевых условиях (Bishop *et al.*, 1992; Kariuki *et al.*, 1995; Marcotty *et al.*, 2002; Maritim *et al.*, 1989). Тяжесть ЕСФ может варьироваться в зависимости от таких факторов, как вирулентность штамма паразита, скорость заражения спороzoитами клещей и генетический фон инфицированных животных. Местный скот в регионах, эндемичных по ЕСФ, согласно наблюдениям, часто испытывает легкую форму заболевания или субклиническую инфекцию, в то время как у ввезенного местного или экзотического КРС обычно развивается тяжелая форма болезни.

Наиболее практичным и широко используемым методом контроля тейлериоза является химический контроль клещей акарицидами. Однако практика борьбы с клещами не всегда полностью эффективна по ряду причин, включая развитие резистентности к акарицидам, высокую стоимость акарицидов, неэффективное управление борьбой с клещами и незаконное перемещение КРС, практикуемого во многих странах. Вакцинация с использованием ослабленных шизот-инфицированных клеточных линий широко использовалась против *T. annulata*, тогда как в ряде стран восточной, центральной и южной части Африки реализуется контроль над заражением и лечением *T. parva* с использованием полученных от клещей спороzoитов и тетрациклинов.

Для лечения инфекций *T. parva* и *T. annulata* имеются химиотерапевтические средства, такие как парваквон, бупарваквон и галофугинон. Лечение этими средствами не полностью уничтожает тейлериозные инфекции, ведущие к развитию носительства у их хозяев.

Иммунный ответ на паразиты *theileriae* сложен. Считается, что клеточный иммунитет является наиболее важным защитным ответом в отношении *T. parva* и *T. annulata*. В отношении *T. parva* основные защитные реакции опосредуются с помощью цитотоксических Т-лимфоцитов класса I с основным гистосовместимым комплексом (МНС). Шизонты *Theileria annulata* населяют макрофаги и В-клетки. Врожденные и адаптивные иммунные

реакции совместно защищают КРС от *T. annulata theileriosis*. От клеточного иммунитета в основном страдают внутриклеточные паразиты. Инфекция лейкоцитов *T. annulata* активирует выделение цитокинов, инициирует иммунный ответ и помогает презентировать паразитный антиген Т-клеткам CD4+. Эти клетки продуцируют интерферон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), который активирует неинфицированные макрофаги для синтеза фактора некроза опухолей  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и оксида азота (NO), которые разрушают клетки, инфицированные шизонтами и пироплазмой. Недавно было показано, что Т-клетки CD8 + распознают антигены МНС-паразита и убивают инфицированные лейкоциты. В-клетки продуцируют антитело, которое наряду с NO убивает внеклеточные мерозоиты и внутриклеточные пироплазмы. С другой стороны, избыточное продуцирование цитокинов, в частности TNF- $\alpha$ , макрофагами создает многие клинические признаки и патологические поражения, которые характеризуют *m. annulata theileriosis*, а исход инфекции зависит от тонкого баланса между защитными и патологическими свойствами иммунной системы.

## В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Диагностика острого тейлериоза основана на клинических признаках, знаниях о заболевании и векторных переносчиках, а также на анализе окрашенных по Гимзе мазков лимфатических узлов и мазков-отпечатков тканей. *Theileria parva* и *T. annulata* диагностируются путем обнаружения шизонтов в лейкоцитах или пироплазмы в эритроцитах. Пироплазматическая стадия следует за стадией шизонта, и как у *T. parva*, так и у *T. annulata* она обычно менее патогенна и поэтому часто встречается в случаях выздоровления животных после болезни или в менее острых случаях. Имеется предположение, что комбинация иммуноферментного анализа (ИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ДНК-зондов значительно увеличит нашу нынешнюю способность идентифицировать инфицированных животных, тем самым сделав возможными точные исследования видов *Theileria*. Со временем, целью станет разработка этих технологии для диагностики всех переносимых заболеваний.

Таблица 1. Методы исследований для диагностики тейлериоза и их назначение

Метод	Назначение					
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных до перемещения	Содействие в стратегии искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции - эпиднадзор	Иммунный статус отдельных животных или поголовья после вакцинации
<b>Идентификация возбудителя<sup>2</sup></b>						
<b>Микроскопическое исследование</b>	-	+++	-	+++	-	-
<b>ПЦР</b>	+	++	++	+++	+	-
<b>Обнаружение иммунного ответа</b>						
<b>РИНФ</b>	+	+++	++	-	+++	-
<b>ИФА</b>	+	+	-	-	+	-

<sup>2</sup> Рекомендуется применять комбинацию методов идентификации возбудителей на одном и том же образце клинического материала.

Обозначения: +++ = рекомендуемый метод; ++ = подходящий метод; + = может использоваться в некоторых случаях, однако стоимость, надежность или иные факторы ограничивают его применение; - = не подходит для данной цели.

Несмотря на то, что не все тесты, включенные в категории +++ или ++ прошли официальную валидацию, но установившаяся практика и факт широкого применения при отсутствии сомнительных результатов, делает их приемлемыми.

ПЦР = полимеразная цепная реакция; РНИФ = реакция непрямой иммунофлуоресценции; ИФА = иммуноферментный анализ.

## 1. Идентификация возбудителя

### 1.1. Микроскопическое исследование

Многоядерные интралимфоцитарные и внеклеточные шизонты могут быть обнаружены в окрашенных по Гимзе биопсийных мазках лимфатических узлов и являются характерной диагностической особенностью острых инфекций *T. parva* и *T. annulata*. Могут быть обнаружены как внутриклеточные, так и свободные шизонты, причем последний тип был выделен из пораженных паразитами клеток во время подготовки мазков. Шизонты носят переходный характер в группах *T. mutans* и *T. orientalis/ buffeli*, в которых стадия пироплазмы может быть патогенной. Шизонтов *Theileria taurotragi* не обнаруживают в мазках крови, окрашенных по Гимзе. Оболочка со стороны пироплазмы может служить отличительной чертой *T. velifera*. Шизонты *T. mutans*, если они обнаружены, отличаются от *T. parva* более крупными, сплюснутыми ядерными частицами неодинаковой формы. Пироплазмы (внутриэритроцитарная стадия) *T. parva*, *T. annulata* и *T. mutans* одинаковы, но *T. annulata* и *T. mutans* обычно больше и могут делиться. Однако в практических целях шизонты и пироплазмы различных телерий очень трудно различить в окрашенных по Гимзе мазках.

Шизонт является патогенной стадией *T. parva* и *T. annulata*. Вначале он вызывает лимфопролиферативное, а затем лимфоструктурное заболевание. Зараженное животное имеет увеличенные лимфатические узлы, повышенную температуру, постепенное увеличение частоты дыхания, одышку и/ или диарею. После вскрытия наиболее распространенными характеристиками являются увеличенные лимфатические узлы, заметно увеличенная селезенка, отек легких, пена в трахее, эрозия и образование язвы в сычуге и энтерит с некрозом пейеровых бляшек. Лимфоидные ткани увеличиваются на начальных стадиях заболевания, но затем атрофируются, если животное выживает и приобретает хроническое заболевание. При гистологическом исследовании инфильтрация незрелых лимфоцитов присутствует в легких, почках, головном мозге, печени, селезенке и лимфатических узлах. Зараженные шизонтами клетки могут быть найдены в мазках-отпечатках всех тканей, однако мазки легких, селезенки, почек и лимфатических узлов особенно пригодны для выявления шизонтов. В более тяжелых случаях очаги лимфоцитарных инфильтратов в почках появляются как белые инфаркты. У животных, которые выздоравливают, могут возникать случайные рецидивы. Нервный синдром, называемая «вертячка», иногда наблюдается в регионах эндемичных *T. parva* и считается связанным с наличием внутрисосудистых и внесосудистых скоплений инфицированных шизонтами лимфоцитов, вызывающих тромбоз и ишемический некроз во всем мозге.

В случае *T. annulata* обе стадии шизонта и пироплазмы могут быть патогенными. Шизонты редко встречаются в периферической крови животных на острой стадии болезни, а их присутствие в мазках крови свидетельствует о плохом прогнозе. Однако шизонты можно легко обнаружить в мазках лимфатических узлов, селезенки и тканей печени, полученных посредством пункционной биопсии этих органов. Макропатология, вызванная шизонтами *T. annulata*, сходна с макропатологией, вызываемой *T. parva*, тогда как анемия и желтуха являются особенностями патологии шизонта и пироплазмы. Патогенные штаммы *T. mutans* также вызывают анемию, как и штаммы из Японии и Кореи, называемые *T. sergenti*.

У выздоровевших животных пироплазмы большинства видов *Theileria* могут сохраняться в течение месяцев или лет и могут время от времени выявляться при последующих обследованиях. Однако отрицательные результаты микроскопического исследования мазков крови не исключают скрытой инфекции. Рецидив паразитемии может быть вызван некоторыми видами *Theileria* при спленэктомии. Пироплазмы также видны в подготовленных мазках при аутопсии, но паразиты кажутся усохшими, а их цитоплазма едва заметна.

## 1.2. Молекулярные методы

Доступен ряд зондов для обнаружения всех видов *Theileria*, которые, как известно, заражают КРС, и они основаны на последовательностях генов рибосомной РНК (Allsopp *et al.*, 1993; Bishop *et al.*, 1995). Были также разработаны ДНК-зонды, специфичные для *T. parva* (Allsopp & Allsopp, 1988; Conrad *et al.*, 1987; Morzaria *et al.*, 1999a) и *T. mutans* (Morzaria *et al.*, 1989). Технология ПЦР доступна для амплификации значительного количества ДНК паразита в миллион раз, что значительно увеличивает чувствительность ДНК-зондов (Allsopp *et al.*, 1989). Была разработана специальная ПЦР для тестирования образцов цельной крови от представителей КРС - носителей *T. annulata*- (D'Oliveira *et al.*, 1995). Был внедрен обратный линейный блоттинг (RLB) на основе гибридизации ПЦР-продуктов к специфичным олигонуклеотидным зондам, иммобилизованным на мембране для одновременного обнаружения различных видов *Theileria* (Gubbels *et al.*, 1999).

Для специфической диагностики *T. parva* также были разработаны анализы в реальном времени, основанные на методах резонансного переноса энергии флуоресценции (ФРПЭ), (Sibeko *et al.*, 2008).

ПЦР-амплификация генов р33/ 34 комплекса *T. orientalis/ buffeli* с последующим анализом рестрикционных ферментов может быть использована для характеристики различных типов (Kawazu *et al.*, 1992; Kubota *et al.*, 1995). Для описания различных изолятов/ штаммов/ клонов *T. parva* разработаны несколько ПЦР-анализов с использованием специфичных генов или сателлитных последовательностей (Geysen *et al.*, 1999; Oura *et al.*, 2003; Patel *et al.*, 2011; Skilton *et al.*, 2002).

## 2. Серологические тесты

РНИФ надежен, прост в применении и обеспечивает адекватную чувствительность и специфичность для использования в полевых условиях для обнаружения предшествующей инфекции *T. parva* и *T. annulata* в экспериментальных ситуациях и в определенной

эпизоотологической среде, где присутствует только один вид *Theileria*. РНИФ имеет ограничения для крупномасштабных серологических исследований в силу его ограниченной специфичности в полевых условиях, где сосуществуют несколько видов *Theileria*. Существует необходимость в более специфичных тестах, которые легко интерпретируются и достаточно надежны для использования в полевых условиях.

## 2.1. Реакция непрямой иммунофлуоресценции

Реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) является наиболее широко используемым диагностическим тестом *Theileria* spp.

### 2.1.1. Получение антигена шизонта

#### i) Предметные стекла с антигеном шизонта

Антигены, используемые для РНИФ, являются внутрицитоплазматическими шизонтами, полученными из инфицированных лимфобластоидных клеточных линий для *T. parva* и из инфицированных линий макрофагов клеток для *T. annulata*.

Культуры объемом от 200 мл до 1 л шизонт-инфицированных клеток *T. parva* или *T. annulata*, содержащих 10<sup>6</sup> клеток/мл, из которых инфицированы по меньшей мере 90% клеток, центрифугируют при 200 g в течение 20 минут при 4°C. Надосадочную жидкость удаляют и осадок клеток ресуспендируют в 100 мл холодного (4°C) фосфатно-буферного солевого раствора (ФБР), pH 7,2-7,4 и центрифугируют, как и в предыдущем случае. Эту процедуру промывки повторяют три раза и после окончательной промывки клеточный осадок ресуспендируют в ФБР (приблизительно 20-100 мл) с получением конечной концентрации 10<sup>7</sup> клеток/мл.

Используя наконечник шаблона или пипетки, тонкие слои клеточной суспензии помещают на предметные стекла с окошками с тефлоновым покрытием или на обычные предметные стекла, используя лак для ногтей для разделения. Мазки должны демонстрировать от 50 до 80 интактных клеток на поле при осмотре через объектив с x40 увеличением. Антигены наносят на предметные стекла многоканальной или 100-миллилитровой пипеткой. При нанесении и немедленном всасывании суспензии шизонта в каждой лунке остается монослой шизонтов. Такие действия выполняются для каждого образца до тех пор, пока объем не будет исчерпан. С помощью этого метода можно получить приблизительно 600 высококачественных предметных стекол, содержащих в общей сложности 6000 отдельных точек антигена. Предметные стекла сушат на воздухе, фиксируют в ацетоне в течение 10 минут, отдельно упаковывают в салфетку, а затем партиями по пять заворачивают в алюминиевую фольгу и хранят в герметичных водонепроницаемых пластиковых контейнерах при температуре от -20°C до -70°C. Антигены могут храниться не менее 1 года при -20°C и дольше при -70°C.

#### ii) Антиген шизонта в суспензии

Во-первых, 500 мл инфицированных *T. parva* или *T. annulata* клеток, содержащих 10<sup>6</sup> клеток/мл, центрифугируют при 200 g в течение 10

минут при 4°C и полученный клеточный осадок дважды промывают в 100 мл холодного ФБР. Жизнеспособность клеток определяется эозином или трипановым синим (его доля должны составлять больше 90%). Клетки ресуспендируют в холодном ФБР в объеме 10<sup>7</sup>/мл. К этому объему по капле добавляют два объема холодного фиксирующего раствора, содержащего 80% ацетона и 0,1% формальдегида (0,25% формалина) в ФБР, в то время как клеточную суспензию осторожно и непрерывно перемешивают на ледяной бане. Клеточную суспензию хранят при температуре -20°C и оставляют для фиксации на 24 часа. Отсасывают около 2/3 объема, центрифугируют и фильтруют. Затем зафиксированные клетки промывают три раза в холодном солевом растворе и центрифугируют при 200-400 g в течение 20 минут при 4°C. После последней промывки клетки ресуспендируют в 5 мл ФБР + 0,2% БСА (бычий сывороточный альбумин) в объеме 10<sup>7</sup>/мл. Зафиксированные клетки распределяют на аликвоты по 0,5 мл. Антиген стабилен при 4°C с 0,2% азидом натрия в качестве консерванта в течение 2 недель и имеет неограниченный срок хранения при -20°C. Этот метод также может быть использован для приготовления антигена шизонта *T. taurotragi* (J. Katende, A. Musoke и S. Morzaria, неопубликованные данные).

### 2.1.2. Получение антигена пироплазмы

#### i) Предметные стекла с антигеном пироплазмы

Стадия пироплазмы *Theileria spp.* не может поддерживаться в культуре, поэтому антиген пироплазмы должен быть получен из крови инфицированных животных. Проводят экспериментальное инфицирование КРС спорозитами подкожно или с применением клещей, инфицированных *T. parva*, *T. annulata* или *T. taurotragi*. Инфекция *T. annulata* неизменно производится путем инокуляции крови, полученной от КРС с острым тейлериозом. Спленэктомия крупного рогатого скота-реципиента до заражения значительно увеличивает паразитемию пироплазмы в эритроцитах. Пиковые показатели паразитемии имеют короткую продолжительность, и, если животные выживают, в течение нескольких дней процент инфицированных эритроцитов значительно уменьшается. Инфицирование паразитами группы, включающей *T. orientalis/buffeli*, *T. mutans* или *T. velifera*, обычно проводят путем инокуляции крови животного-носителя или консервированной крови спленэктомированного КРС внутривенно или путем применения инфицированных клещей. Когда паразитемия пироплазмы составляет 10% или выше, 100 мл инфицированной крови собирают из яремной вены в гепаринизированный или обработанный этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) вакуумный контейнер с и осторожно смешивают с 2 литрами ФБР. Смесь центрифугируют при 500 g в течение 10 минут при 4°C; плазму и лейкоцитарную пленку удаляют, эритроциты снова ресуспендируют в 2 литрах ФБР и повторяют центрифугирование. После каждого промывания необходимо удалять лейкоцитарную пленку. Такую процедуру промывки повторяют четыре раза. После окончательной промывки аликвоту осажденных эритроцитов



используют получения двойных разведений с ФБР, и каплю 5 мкл каждого разведения помещают на предметные стекла. Высушенные капли фиксируют в метаноле и окрашивают красителем Гимза, а концентрацию эритроцитов исследуют с помощью светового микроскопа. Разбавление, дающее один слой равномерно распределенных по капле эритроцитов, отбирают для крупномасштабной подготовки предметных стекол с антигеном пироплазмы. Из 100 мл инфицированной крови можно приготовить около 10 000 предметных стекол с антигеном (100 000 капель антигена). Мазкам антигена дают высохнуть при комнатной температуре, затем фиксируют в холодном (4°C) ацетоне в течение 10 минут. Зафиксированные мазки могут храниться так же, как и предметные стекла с антигеном шизонта, и имеют аналогичные сроки годности.

ii) *Суспензия антигена пироплазм*

Существует альтернативный вышеописанному способ получения антигенов, который был протестирован в отношении *T. parva*. При использовании этой процедуры от животного с высокой паразитемией пироплазмы отбирают 100 мл крови и подготавливают, как описано выше, при этом объем осажденных эритроцитов доводят до 5% ФБР.

Один объем суспензии эритроцитов добавляют к двум объемам фиксатора (см. Раздел 2.1.1.ii выше) при постоянном помешивании. Клетки оставляют для фиксации при -20°C в течение 24 часов. Затем зафиксированные клетки промывают три раза с помощью ФБР и центрифугируют при 1000 g в течение 30 минут. Осадок ресуспендируют в ФБР, содержащем 0,2% азида натрия, до исходного объема крови, и распределяют на аликвоты по 0,5 мл.

Антиген пироплазмы стабилен при 4°C в течение не менее 3 лет при хранении с 0,2% азида натрия.

### 2.1.3. Стандартизация антигена

Суспензии антигена шизонта или пироплазмы смешивают в роторной мешалке и титруют в ФБР посредством двойных разведений, начиная от неразбавленного до 1/16. Для использования в этой партии антигена рекомендуется разбавление, обеспечивающее следующее распределение клеток: приблизительно 50-80 клеток, зараженных шизонтами, или 150-200 инфицированных эритроцитов на поле при исследовании через объектив с  $\times 40$  увеличением. Используя такое разведение, готовят тестовые мазки антигена на предметных стеклах. Эти мазки антигена и предварительно замороженные (и размороженные перед использованием) предметные стекла с антигеном тестируют в отношении ряда разведений панели установленных сильно-, средне- и слабоположительных и отрицательных контрольных сывороток. Если положительные контрольные сыворотки титруются до их известных титров, а отрицательные контрольные сыворотки не дают флуоресценции, антиген используют в стандартном РНИФ.

Оба типа препаратов антигена, зафиксированные ацетоном мазки, хранящиеся

при  $-20^{\circ}\text{C}$  или  $-70^{\circ}\text{C}$ , и антигены, зафиксированные в суспензии и хранящиеся при температуре от  $4^{\circ}\text{C}$  или  $-20^{\circ}\text{C}$ , обычно используются во многих лабораториях. Чувствительность обоих типов антигена сопоставима. В лабораториях, где имеются адекватные низкотемпературные хранилища и надежное снабжение электроэнергией, можно использовать предметные стекла с антигеном. Однако такие антигены можно транспортировать только на сухом льду или в жидком азоте. Антигены, закрепленные в суспензии, имеют преимущество перед предметными стеклами с антигеном, которое заключается в том, что первоначальный способ приготовления является более простым и быстрым. Большая партия этого антигена может храниться в одном контейнере, и при необходимости можно приготовить аликвоты, из которых готовят свежие мазки для РНИФ. Таким образом, исключается необходимость в большом хранилище. Антигены, зафиксированные в суспензии, также могут храниться при температуре  $4^{\circ}\text{C}$  и могут безопасно транспортироваться при комнатной температуре без потери антигенных свойств.

#### **2.1.3.1. Получение лизата лимфоцитов КРС**

Лизат лимфоцитов готовят способом, описанным Goddeeris *et al.* (1982), для использования в тестах с антигенами *T. parva* в суспензии. 3-месячного теленка спленэктомизируют и содержат в среде, свободной от клещей. Чтобы исключить возможность скрытых эпителиальных инфекций, мазки крови, окрашенные по Гимза, анализируют на наличие паразитов ежедневно в течение 4 недель. Животное, подвергнутое паразитарному заражению, умерщвляют, тимус и все доступные лимфатические узлы удаляют. Эти ткани разрезают на мелкие кусочки в холодном ФБР, содержащем 0,45% ЭДТА в качестве антикоагулянта. Из ткани выделяют клетки, отделяют от дебриса путем процеживания через марлю, и три раза промывают ФБР/ ЭДТА путем центрифугирования при 200 *g* в течение 20 минут при  $4^{\circ}\text{C}$ . Отмытые лимфоциты ресуспендируют в ФБР без ЭДТА до конечной концентрации  $5 \times 10^7$  клеток/ мл. Клетки разрушают ультразвуком в аликвотах по 100 мл на льду в течение 5 минут с использованием зонда 3/8. Обработанный ультразвуком материал центрифугируют при 1000 *g* в течение 30 минут при  $4^{\circ}\text{C}$  и супернатант, доведенный до 10 мг белка/ мл, хранят при  $-20^{\circ}\text{C}$  в аликвотах по 4 мл.

#### **2.1.3.2. Процедура исследования**

- i) С антигеном шизонта или пироплазмы
  - a) Предметные стекла с антигеном вынимают из морозильной камеры и размораживают в течение 30 минут при  $4^{\circ}\text{C}$  и затем в течение 30 минут при комнатной температуре.
  - b) Исследуемую сыворотку инактивируют в течение 30 минут на водяной бане при  $56^{\circ}\text{C}$ .
  - c) Предметные стекла распаковывают и пронумеровывают исследуемые сыворотки.
  - d) Готовят разведения исследуемых сывороток 1/40 и 1/80. В качестве

контроля в каждый тест включают валидированные положительные и отрицательные сыворотки. В дальнейшем можно сделать двойные разведения, если необходимо установить конечные концентрации антитела.

- e) 25 мкл каждого разведения сыворотки наносят на каплю антигена.
  - f) Инкубируют во влажной камере в течение 30 минут при комнатной температуре.
  - g) Образцы сыворотки удаляют из лунок с антигеном путем промывки в ФБР и промывают, последовательно погружая в два сосуда для окрашивания, содержащих ФБР, на 10 минут в каждый.
  - h) В каждую лунку вносят 20 мкл разбавленного флуоресцеин изотиоцианатом конъюгата анти-бычьего иммуноглобулина в соответствующем разведении (обычно подходят разведения, рекомендованные производителями, однако для достижения оптимальных результатов могут потребоваться небольшие корректировки). В качестве контрастного вещества в конъюгат включают синий Эванса в конечном разведении 1/10 000 и инкубируют во влажной камере в течение 30 минут при комнатной температуре.
  - i) Повторяют этап g и устанавливают покровное стекло на каплю ФБР/ глицерина (50% объема каждого).
  - j) Предметные стекла исследуют под флуоресцентным микроскопом, оснащенным подсветкой еrі-Коем (ртутная лампа мощностью 100 Вт), блоком УФ фильтра, окулярами с  $\times 6,3$  увеличением и масляной линзой Phaco FL 40/ 1.3.
- ii) С антигеном шизонта, хранящимся в суспензии
- a) Размораживают замороженный антиген при комнатной температуре.
  - b) Суспензию антигена распределяют в окошки предметных стекол с окошками, используя многоканальную или 100-миллилитровую пипетку. При распределении и немедленном всасывании суспензии в каждой лунке остается монослой инфицированных шизонтом клеток.
  - c) Слайды высушивают при комнатной температуре или при температуре 37°C.
  - d) Тестовые и контрольные сыворотки разводят 1/40 в лизате лимфоцитов (195 мкл лизата + 5 мкл сыворотки).
  - e) Производят действия, описанные для этапов e-j (Раздел 2.1.3.2.i).
- iii) С антигенами пироплазмы, хранящимися в суспензии
- a) Антиген пироплазмы (хранят при 4°C) ресуспендируют путем перемешивания и диспергируют эритроциты путем пропускания суспензии через 25 мм-иглу для разрушения скоплений.
  - b) Антиген разводят до ранее стандартизированных разведений (см. приготовление антигена пироплазмы).

- с) Предметные стекла высушивают при комнатной температуре или при температуре 37°C.
- д) Производят действия, описанные для этапов d и e (Раздел 2.1.3.2.ii).

#### 2.1.4. Характеристики реакции непрямой иммунофлуоресценции

Включение синего Эванса обеспечивает хороший контраст, позволяя проводить дифференциацию неинфицированных клеток от инфицированных под флуоресцентным микроскопом. Установка предметных стекол в 50% глицерин при рН 8,0 снижает скорость выцветания изотиоцианат флуоресцеина и делает возможной съемку препарата. После приготовления предметные стекла стабильны и могут быть прочитаны в течение 72 часов после приготовления, при условии их хранения при температуре 4°C в темном месте

Чувствительность РНИФ зависит от периода времени, прошедшего с момента начала заражения. После заражения спорозоитами антитела к *T. parva* и *T. annulata* впервые обнаруживаются между 10 и 14 днями с использованием антигена шизонта. Используя антиген пироплазмы, антитела впервые обнаруживаются между 15 и 21 днями. Продолжительность жизни антител после выздоровления варьируется в зависимости от таких факторов, как установление носительства, химиотерапевтическое вмешательство и наличие или отсутствие повторного заражения. После восстановления после инфицирования *T. parva* или *T. annulata*, высокие уровни антител обычно обнаруживаются в течение 30-60 дней. Уровни антител постепенно снижаются, и низкие титры антител все еще обнаруживаются через 4-6 месяцев после выздоровления. Позже, антитело может стать необнаружимым при разведении сыворотки 1/40, но может сохраняться более 1 года после единичного заражения. В ЕСФ эндемичных регионах серопревалентность в популяции КРС значительно колеблется в зависимости от уровня и регулярности заражения. В эндемичном регионе, где имеет место сезонный цикл передачи ЕСФ, РНИФ нечувствительна. Общая диагностическая чувствительность РНИФ оценивается как 55% при титре конечного разведения 1/40 и 28% при титре 1/160. Специфичность теста для двух конечных разведений составляла 86% и 95% соответственно (Billiouw *et al.*, 2005).

РНИФ полезна для идентификации стад, имеющих носителей *T. annulata*, но не всегда достаточно чувствителен для обнаружения всех инфицированных животных. Оба РНИФ антигена шизонта и мерозоиота (пироплазма) не обнаруживали антитела у некоторых животных, несмотря явное носительство инфекции пироплазмами (Darghouth *et al.*, 1996).

При инфекциях *T. mutans*, вызванных инокуляцией спорозоиота, антитела сначала обнаруживаются между 10 и 15 днями после появления пироплазмы. Низкие титры обнаруживаются в течение не менее 12-24 месяцев.

РНИФ *T. parva* очень чувствительна к обнаружению антител в эпизоотологических условиях, когда присутствует только один вид *Theileria*. Однако если тест используется для обнаружения антител в случаях, когда происходят смешанные инфекции *Theileria*, необходимо тщательно оценить

специфичность теста. Например, *T. annulata* и *T. parva* перекрестно реагируют, хотя данные перекрестные реакции в четыре-шесть раз ниже, чем при исследовании гомологичной сыворотки. Перекрестная реактивность двух видов имеет небольшое практическое значение, так как географическое распространение этих двух паразитов не пересекается. В РНИФ такая перекрестная реактивность не возникает между *T. parva* и *T. mutans* или между *T. annulata* и *T. mutans*. Существует низкий уровень перекрестной реактивности между *T. parva* и *T. taurotragi*, что снижает специфику этих двух тестов во многих частях Африки к югу от Сахары, где их распространение пересекается.

Создана панель моноклональных антител (МАт), обнаруживающих различные эпитопы на полиморфном иммунодоминантном антигене на стадии шизонта *T. parva*. Эта панель может применяться в РНИФ с использованием инфицированных шизонтом лимфобластоидных клеток (см. сноску 2) для выявления различий между некоторыми видами *T. parva* и между *T. parva* и другими видами *Theileria*. Этот тест был применен в качестве одного из нескольких описательных инструментов для дифференциации различных *T. parva* и контроля качества при приготовлении консервированного спорозоита (Bishop *et al.*, 1994).

## 2.2. Иммуноферментный анализ

Были разработаны серологические тесты на основе ИФА для обнаружения антител к *T. annulata* (Gray *et al.*, 1980). Тесты, используемые для *T. parva* и *T. mutans*, являются непрямые ИФА на основе паразит-специфических антигенов P1M и p32 соответственно. Эти ИФА обеспечивают более высокую (более 95%) чувствительность, чем РНИФ (Morzaria *et al.*, 1999a; Musoke *et al.*, 1994). Реагенты для ИФА доступны в Международном научно-исследовательском институте Ливерток, Найроби.

## С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

### С1. Клеточные культуральные живые вакцины против *Theileria annulata*

#### 1. Общие сведения

Вакцинация против *T. parva* и *T. annulata* предпринималась с тех пор, как в начале прошлого века были впервые обнаружены организмы-возбудители. Однако надежные живые вакцины с известной эффективностью являются более поздними разработками. Наиболее широко используются аттенуированные вакцины против *T. annulata*, изготовленные на основе шизонта, выращенного на культуре клеток. Описаны процедуры производства и испытания безопасности (Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций (ФАО) 1984 года, Hashemi-Fesharki, 1988; Ripano, 1989b), и эта вакцина используется в Израиле, Иране, Турции, Испании, Индии, Северной Африке, Центральной Азии и Китайской Народной Республике.

Несмотря на то, что вакцинация клеточной культуральной вакциной против *T. annulata* была доступна более трех десятилетий и доказала свою эффективность в полевых условиях, использование этой вакцины ограничено. Озабоченность возможностью заноса вакцинных паразитов в популяцию полевых клещей привела к тому, что отдельные страны разработали

вакцины из местных изолятов (Morisson & Mc Keever, 2006). Некоторые ослабленные клеточные линии утратили способность дифференциации эритроцитарных мерозоитов (пироплазм) при введении КРС, например, личинки *Hyalomma*, питавшиеся на вакцинированных животных, не заразились (Kachani *et al.*, 2004a). Однако в большинстве случаев потеря дифференциации основана на макроскопическом исследовании мазков крови вакцинбированного КРС. Этот недостаток, трудности стандартизации антигенного состава культивируемых паразитов и потребность в устойчивой цепочке распределения вакцины в полевых условиях являются ограничивающими факторами для коммерческого использования этой вакцины (Morisson & Mc Keever, 2006).

## **2. Структура производства и минимальные требования к вакцинам**

### **2.1. Характеристики посевного вируса**

#### **2.1.1. Биологические характеристики исходного посевного материала**

Первичные культуры клеток, инфицированных *T. annulata*, могут быть выделены из трипсинизированных лимфатических узлов, печени или селезенки, асептически отобранных от инфицированного животного после смерти или из лейкоцитарной пленки гепаринизированной периферической крови, отделенной на градиенте плотности (Ficoll Нураке), или лимфоцитами, собранными из биопсийного материала лимфатических узлов с использованием пластикового шприца (Brown, 1979; FAO, 1984).

Культуры посевного материала получают из криоконсервированных клеточных линий, которые были выделены от КРС и аттенуированы, как описано ниже. Вакцины должны быть получены из культуры посевного материала (исходного вакцинного материала), пассированного менее 30 раз, поскольку существует некоторая неопределенность в отношении иммуногенной стабильности этих культур при долгосрочном пассировании.

#### **2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, свобода от посторонних примесей)**

Испытания биологических материалов на стерильность и свободу от контаминантов можно найти в главе 1.1.9. Поскольку материал клеточной культуры получен из животных, обитающих в полевых условиях, их клетки могут быть потенциальными источниками контаминации вакцины посторонними патогенами. Потенциальные контаминанты включают лейкоз КРС, микоплазму, вирусную диарею КРС, губкообразную энцефалопатию КРС (ГЭКРС) и другие бактерии и вирусы.

Перекрестное загрязнение клеток в клеточных культурах является общей проблемой при культивировании и использовании клеток. Проблема может быть решена путем повышения осведомленности и путем регулярного контроля перекрестной контаминации клеток.

#### **2.1.3. Валидация в качестве вакцинного штамма**

Аттенуация шизонтов *T. annulata* достигается за счет длительного роста и пассирования на культуре (Pirano, 1989b). Потеря паразитарной вирулентности, по-видимому, обусловлена изменением экспрессивности гена паразита. Аттенуация оценивается путем инокуляции культуры восприимчивым телятам через каждые 20-30 пассажей. Образец культуры

необходимо подвергать криоконсервированию через каждые десять пассажей на случай случайной потери или контаминации. Полная аттенуация достигается, когда культуры не вызывают лихорадки, или у восприимчивого КРС не обнаруживаются шизонты и пироплазмы, что может потребовать до 300 пассажей. Аттенуированная культура будет достоверно заражать КРС в дозе  $10^5$  клеток и индуцировать серологическую реакцию, и не вызовет заболевания в дозе  $10^9$  клеток. Культуры могут быть криоконсервированы с использованием диметилсульфоксида (ДМСО), либо глицерина. Два метода хранения и доставки вакцины описаны ниже

## 2.2. Способ производства

### 2.2.1. Процедура

Инфицированные клетки культивируют сначала в минимальной основной среде (МОС) Игла или среде Лейбовица L15 с добавлением 20% телячьей сыворотки и содержащей пенициллин (100 единиц/ мл), стрептомицин (50 мкг/ мл) и микостатин (75 единиц/ мл) в 25-мл матрасах с завинчивающимися колпачками. Альтернативной средой является RPMI 1640 с 10% эмбриональной телячьей сывороткой, 2 мМ глутамином, пенициллином и стрептомицином, которая обычно используется со стабилизированными культурами. Среда пополняется каждые 3-4 дня. Наличие в среде ярких свободных преломляющих свет клеток (при исследовании с использованием фазоконтрастного или инвертированного микроскопа) указывает на рост инфицированных клеток. Культуры могут стабилизироваться в виде монослоя или в суспензии. Пассирование осуществляют, сливая среду, добавляя к монослойным культурам 0,025% ЭДТА (версен) на 15 минут, диспергируя клетки, и затем подсчитывая клетки и дозируя их в соответствии с размером матраса. Приблизительно  $10^6$  клеток вводят в матрас объемом 25 см<sup>2</sup>, а в больших матрасах используют такую же норму высева, 100-200 мл. Общая методика культивирования описана Брауном (1979).

Для поддержания этих культур необходима сыворотка, и ее получают от телят в возрасте до 6 месяцев, либо из коммерческих источников, и перед использованием проверяют на токсичность путем трех пассажей в стабилизированной клеточной линии.

### 2.2.2. Требования к ингредиентам

Перед началом производства вакцины необходим посевной материал с известными характеристиками (Pirano, 1997). Различают три типа посевного материала:

#### i) Исходный посевной материал

Шизонт-инфицированные клетки определенного пассажа, которые были отобраны и находятся на постоянном хранении, и на которых проводятся все остальные пассажи. Основной посевной материал должен состоять из единой однородной партии посевного материала, который была смешан и помещен в контейнеры в виде одной партии. Поскольку шизонт-инфицированные клетки *T. annulata* используются для производственного процесса, основной посевной материал также представляет собой

основной клеточный материал (см. Главу 1.1.8 «Принципы производства ветеринарной вакцины»). Для приготовления основного посевного материала шизонт-инфицированные клетки, которые являются безопасными для КРС, реплицируют до получения приблизительно  $5 \times 10^8$  клеток в одном культуральном клеточном пассаже. Клетки криоконсервируют в 100 криотпробирках, каждая из которых содержит  $5 \times 10^6$  клеток. Проверку жизнеспособности основного посевного материала выполняют путем восстановления содержимого одной из криопробирок после того, как основной посевной материал хранился в замороженном состоянии в течение не менее 24 часов.

ii) Рабочий посевной материал

Шизонт-инфицированные клетки на уровне пассажа между основным посевным материалом и производственным материалом. Для приготовления рабочего посевного материала содержимое одной криопробирки основного посевного материала переносят в 10-миллилитровую центрифужную пробирку, содержащую 8 мл полной среды. Пробирку центрифугируют при 600 g в течение 15 минут при 4°C и осадок переносят в матрас объемом 75 см<sup>2</sup>, содержащий 15-20 мл среды. Среду сменяют на следующий день, и через 4 дня клетки диспергируют и субкультивируют в более крупные сосуды. После 5-6 субкультиваций получают достаточное количество зараженных клеток для запуска производственного цикла.

iii) Производственный посевной материал

Шизонт-инфицированные клетки определенного уровня пассажа используют без дальнейшей репликации для приготовления партии вакцины. Производственный посевной материал получают путем выращивания большого количества клеток в монослое или суспензионных культурах. Однослойные культуры выращивают в матрасах, от 150 см<sup>2</sup> до 175 см<sup>2</sup>, что обычно составляет в среднем от  $7 \times 10^7$  до  $8 \times 10^7$  клеток на матрас. Требуется около 80 мл полной среды на матрас. В системе культивирования в роллерных флаконах  $1,2-1,5 \times 10^8$  клеток могут быть получены в обычном роллерном флаконе (700 см<sup>2</sup>), содержащей 100-120 мл среды. Чтобы получить оптимальный выход клеток, стационарные культуры или культуры роллерных флаконов культивируют в течение 6-7 дней с питательными средами, как описано ранее, см. Раздел С1.2.2.1.

Шизонт-инфицированные клетки из всех матрасов собирают и объединяют, и вычисляют общее число. Альтернативно, приблизительно 20% клеток могут быть засеяны снова для получения другой партии вакцины. Несколько партий вакцины могут быть получены с использованием части производственного посевного материала в качестве рабочего посевного материала. Поскольку длительное культивирование после нескольких партий может приводить к изменению свойств будущих шизонтов, таких как изменением иммуногенности, последующая вакцина производится путем получения свежего производственного посевного материала из основного посевного



материала.

Шизонт-инфицированные клетки смешивают с ДМСО в конечной концентрации 7% или глицерином в конечной концентрации 10% и распределяют на аликвоты 1,8 мл в пластиковые флаконы объемом 2 мл, каждый флакон содержит десять доз концентрированной вакцины. Поскольку ДМСО немедленно проникает в клеточные мембраны, время, затрачиваемое на помещение вакцины во флаконы, должно быть максимально коротким. При использовании глицерина, перед замораживанием вакцины требуется время для уравнивания продолжительностью 30-40 минут. Единого мнения относительно того, сколько шизонт-инфицированных клеток должно составлять одну дозу вакцины, нет. Рекомендуемый практический подход заключается в подготовке доз, содержащих  $10^6$ - $10^7$  инфицированных клеток, для противодействия различным условиям окружающей среды в полевых условиях. Однако значительная защита от инфекции, вызванной спорозоитом, была достигнута путем вакцинации в дозе  $10^5$  инфицированных клеток (Kachani *et al.*, 2004b).

Вакцину замораживают, помещая флаконы в низкотемпературную морозильную камеру глубокой заморозки ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) и через 24 часа переносят в контейнеры с жидким азотом. В качестве альтернативы флаконы можно поместить в газообразный жидкий азот на 3 часа, а затем погрузить в жидкий азот на хранение (Pirano, 1989b). Вакцина доставляется в поле в жидком азоте и разбавляется изотоническим забуференным физиологическим раствором 1/10 во флаконе с винтовой крышкой с резиновой или силиконовой перегородкой для асептического извлечения. Для разбавления вакцины, замороженной с глицерином, изотонический буферный солевой раствор также должен содержать 10% глицерина, чтобы избежать осмотического повреждения шизонтов. Вакцину вводят подкожно в течение 30 минут после оттаивания (Pirano, 1977).

Режим вакцинации в Иране до 1990 года состоял в инокуляции двух разных слабовирулентных штаммов с интервалом в 1 месяц. Но для сокращения затрат и экономии времени был внедрен новый метод, включающий только одну дозу вакцины на основе местного живого аттенуированного штамма (Hashemi-Fesharki, 1998). В Марокко используется новая культуральная вакцина, обычно в десятикратной сниженной дозе ( $10^4$  шизонт-инфицированных клеток) (Kachani *et al.*, 2004b). Однако существуют проблемы контроля качества вакцин с коротким сроком годности.

### 2.2.3. Производственный контроль

Необходимо вести учет исходного рабочего посевного материала и пассажей. Посевной материал не должен содержать инфекционных возбудителей, таких как энзоотический лейкоз КРС, бычий вирус иммунодефицита, бычий пестивирус, бычий синцитиальный вирус, лихорадка долины Рифт и т. д. Процедуры испытаний будут зависеть от их доступности, предпочтительно с использованием ДНК-анализа.

Уровень рН, температуру и окраску растворов следует проверять во время процесса, должны отсутствовать контаминанты. Количество и контаминацию растущих клеточных культурах следует ежедневно проверять с помощью инвертирционного микроскопа.

#### 2.2.4. Испытания партий готового продукта

i) Стерильность

Описание испытаний биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации можно см. в главе 1.1.9.

ii) Меры предосторожности

Шизонты *Theileria annulata* не являются опасными для человека или заразными для животных, поэтому основная цель при разработке объекта для производства вакцин заключается в предотвращении загрязнения продукта посторонними организмами.

a) Отсутствие свойств, вызывающих неоправданные местные или системные реакции

Для проверки безопасности основного посевного материала двум-четырем наиболее восприимчивым телятам вводят дозу, в десять раз превышающую дозу, рекомендуемую для иммунизации. Эта доза не должна вызывать клинические признаки, выходящие за пределы временного повышения температуры. При полностью аттенуированном исходном посевном материале шизонты и пироплазмы не будут наблюдаться в лимфатических узлах и мазках печени или крови. Однако разные породы КРС могут проявлять различную чувствительность к вакцине. Этот факт следует учитывать при введении вакцины из частично аттенуированного посевного материала высокопородному КРС.

После успешного теста на безопасность образца все последующие партии, изготовленные из одного и того же основного исходного материала, могут быть выпущены без дальнейшего тестирования на безопасность. Однако, если паразиты обнаруживаются в крови или тканях вакцинированных животных в полевых условиях, или если после введения вакцины развиваются клинические признаки, партия или параллельная партия из одного и того же исходного посевного материала должны быть повторно протестированы на безопасность.

iii) Иммуногенность партии

В Израиле вакцины с шизонтом тестируют согласно документированной процедуре (Pirano, 1989a) до выпуска.

Как правило, шизонтная вакцина производится небольшими индивидуальными партиями (3-5 тысяч доз), что делает полное тестирование каждой партии непрактичным по экономическим причинам. Поэтому рекомендуется, чтобы первая партия вакцины, полученная из исходного посевного материала, была проверена на предмет безопасности, эффективности, иммуногенности и стерильности, в то

время как каждая последующая партия должна быть проверена только на стерильность и иммуногенность. Эта рекомендация основана на том факте, что после того, как культивированные шизонты аттенуируют, в ходе дальнейшего культивирования возврата к вирулентности не наблюдалось. Что касается эффективности, явных изменений иммуногенных свойств не обнаруживали при ограниченном числе (20-30) пассажей при производстве фактической вакцины.

а) Жизнеспособность шизонт-инфицированных клеток

Тест на иммуногенность проводят с использованием количественных методов *in vitro*. Замороженная вакцина остается стабильной в течение периода хранения, даже в течение длительного времени, но некоторые потери жизнеспособности происходят во время процессов замораживания и оттаивания. Жизнеспособность должна быть проверена в условиях, максимально приближенных к тем, которые наблюдались при использовании вакцины в полевых условиях. По этой причине до проведения тестов на жизнеспособность вакцина должна быть разморожена, а разбавленная суспензия шизонт-инфицированных клеток должна быть оставлена при температуре окружающей среды на 60 минут. Простым критерием оценки жизнеспособности инфицированных клеток является подсчет клеток, отторгающих нигрозин (Wathanga *et al.*, 1986). Вакцина, которая после размораживания и разведения и выдерживания при комнатной температуре в течение 1 часа, все еще содержит 50% или более живых клеток, может быть выпущена в оборот, хотя в большинстве случаев обнаруживается 80-90% живых клеток.

Жизнеспособность шизонтов также отражается на эффективности посева шизонт-инфицированных клеток (Wathanga *et al.*, 1986), поскольку только клетки, содержащие жизнеспособные шизонты, размножаются в культуре. Для этой цели размороженную разведенную вакцину переносят из флакона в центрифужную пробирку. Берут образец для подсчета и центрифугируют суспензию в течение 15 минут при 600 *g*. В это время определяется общее количество клеток (живых и мертвых) для подтверждения того, что замороженная вакцина имеет необходимую начальную концентрацию клеток. После центрифугирования супернатант удаляют и клетки ресуспендируют до исходного объема с использованием полной культуральной среды. Последовательные десятикратные разведения клеток в полной среде проводят в стерильных 10 мл пробирках, так что последние два разведения содержат 50 и 5 клеток на мл соответственно. Двенадцать повторов, по 200 мкл из каждого из последних двух разведений, вводят в 96-луночный планшет. Планшеты инкубируют при 37°C в 5% атмосфере CO<sup>2</sup> и культуры проверяют с помощью инверсионного микроскопа через 6 и 9 дней после посева. Подсчитывают количество лунок, теоретически содержащих 1 клетку, в которой наблюдается рост. Вакцина, показывающая эффективность <2 (клеток), подходит для

использования в полевых условиях.

## 2.3. Требования для получения разрешения / регистрации / лицензирования

### 2.3.1 Процесс производства

Для регистрации вакцины все соответствующие данные, касающиеся изготовления вакцины и контроля качества (см. Разделы С2.2.1 и С2.2.2), должны быть представлены органам власти. Эта информация должна быть предоставлена для трех последовательных партий вакцины объемом не менее 1/3 типичного объема промышленной партии.

### 2.3.2 Требования к безопасности

i) Безопасность целевых и нецелевых животных

Шизонты *Theileria annulata* не являются инфекционно опасными для животных. Эти вакцины не оказывают неблагоприятного воздействия на здоровый КРС. Однако животные с существующими инфекциями, особенно вирусными, могут не переносить вакцинацию. Не рекомендуется введение вирусной вакцины, например, вакцины против ящура, в период иммунизации (период реакции), так как иммунный ответ может быть скомпрометирован (Hashemi-Fesharki, 1988). В Иране не рекомендуется вакцинировать коров, срок беременности которых составляет более 5 месяцев, хотя исследования на стельных особях КРС с использованием вакцин, применяемых в Израиле, показали, что вакцинация не влияет на беременность (Pirano, 1989a). Вызванный иммунитет имеет продолжительное действие.

В целом, КРС должен быть иммунизирован в первые несколько месяцев жизни, а наличие клещей в естественных условиях усиливает иммунитет. Хотя были идентифицированы антигенно разные штаммы *T. annulata* (Pirano, 1977), обычно считается, что между штаммами существует достаточная перекрестная защита для обеспечения адекватной защиты от болезней в полевых условиях, как это наблюдается в Израиле. В обширных зараженных районах Центральной Азии один вид вакцины доказал свою иммунологическую эффективность для 1,5 миллионов особей КРС (Dolan, 1989; Wathanga *et al.*, 1986). Однако, как было описано ранее, в Иране регулярно используются два вида (Hashemi-Fesharki, 1988).

ii) Возврат к вирулентности в случае аттенуированных/ живых вакцин и соображения экологии.

iii) После аттенуации культивированных шизонтов, случаев возврата к вирулентности при дальнейшем культивировании не наблюдали.

iv) Меры предосторожности (опасность)

Различные породы КРС могут проявлять различную чувствительность к вакцине. Этот факт следует учитывать при вакцинации высокопородного КРС вакциной, полученной из частично аттенуированного исходного посевного материала.

### 2.3.3. Требования к эффективности

i) Способность защищать от тейлериоза, передаваемого естественным путем

Партия экспериментальной вакцины, используемая в испытании на безопасность, также может быть использована для проверки эффективности культуральной вакцины против тейлериоза. Трех или четырех телят вакцинируют обычной дозой вакцины, а 6 недель спустя вакцинированных телят и одинаковое количество невакцинированных телят заражают спорозитами *T. annulata*. Инфекция может быть вызвана живыми взрослыми клещами, зараженными *T. annulata* на предимагинальной стадии, или путем инокуляции консервированного препарата, полученного от мацерированных инфицированных клещей (методы см. в Разделе С2.2). Опыт показывает, что инокуляция консервированных (мацерированных клещей) обычно индуцирует более серьезную реакцию, чем эквивалентное количество живых, зараженных клещей, которые могут питаться на КРС. Однако в конечном итоге результаты, полученные при помощи использования консервированного препарата, выглядят более воспроизводимыми, нежели результаты, полученные с различными партиями живых клещей.

Не существует согласованных на международном уровне стандартов для объема контрольной дозы, используемой при тестировании эффективности вакцины, полученной от культуры *T. annulata*. Для заражения КРС использовались от пяти до десяти особей женского пола и равное количество зараженных, некормленных особей мужского пола клещей *Hyalomma*. В качестве альтернативы консервированный препарат, эквивалентный 2-4 мацерированным клещам, инокулированный подкожно в область шеи, неизменно будет вызывать острый тейлериоз. Реакции на заражение вакцинированных и невакцинированных контрольных телят контролируют с использованием следующих параметров: длительность и тяжесть пирексии, процент шизонт-инфицированных клеток в лимфатических узлах или биопсийных мазках печени, процент инфицированных пироплазмой эритроцитов в мазках крови, снижение количества белых и красных кровяных телец и тяжесть клинических проявлений, таких как анорексия, депрессия и невозможность подняться.

Результаты теста на эффективность зависят от таких факторов, как иммунологические характеристики изолята *T. annulata*, выращенного и аттенуированного в культуре, вирулентность и доза полевого изолята, используемого для контрольного заражения, виды зараженных клещей, используемых для получения спорозитов. Исследовательские изыскания (Pirano, 1989b) показывают, что телята, вакцинированные шизонт-вакциной, после потенциально летального гомологичного контрольного заражения могут проявлять, по-видимому, почти полную защиту или паразитемию низкого уровня, сопровождающуюся умеренной лихорадкой и незначительным изменением остальных параметров от их значений до вакцинации. Меньшая степень защиты проявлялась в случаях, когда КРС, вакцинированный шизонтной вакциной, подвергали

контрольному заражению клещевыми паразитами из географически отдаленного региона. Напротив, в большинстве испытаний невакцинированные контрольные телята демонстрировали высокий уровень паразитемии и панцитопении, сопровождающийся тяжелыми клиническими проявлениями. В отсутствие специфических лекарств, большинство контрольных животных погибали от инфекции (Pirano, 1989b).

Полевые наблюдения также использовались для оценки эффективности противозооотических вакцин (Pirano, 1989a, Stepanova & Zablotskii, 1989). Восприимчивый местный КРС, а также высокопородные экзотические животные были защищены от клинического тейлериоза и гибели на пастбищах, на которых невакцинированный КРС попадал под действие тейлериоза. Поскольку полностью аттенуированная шизот-вакцина не дает пироплазм, наличие этой стадии тейлериоза у вакцинированного КРС, не проявляющего каких-либо клинических признаков, считается результатом бессимптомной клеточной инфекции.

Замороженная вакцина можно хранить без потери жизнеспособности в больших холодильниках с жидким азотом на производственном объекте и транспортировать на фермы в небольших контейнерах с жидким азотом. В энзоотических по тейлериозу зонах можно организовать полевые центры по хранению и поставке вакцины. Основное оборудование, необходимое для применения замороженной вакцины в полевых условиях, включает широкогорлую колбу для приготовления водяной бани на 40°C, термометр для измерения температуры воды, длинный пинцет, защитный щиток для лица и термостойкие перчатки. Применение замороженной вакцины для КРС в полевых условиях начинается с надевания защитного щитка и термостойких перчаток. Требуемое количество флаконов отбирают с помощью пинцета из контейнера холодильника с жидким азотом. При извлечении флаконов контейнер следует держать как можно более глубоко в холодильнике, чтобы избежать быстрого нагревания оставшихся флаконов. Каждый отобранный флакон должен быть проверен, чтобы удостовериться, что внутри него не просочился жидкий азот. Жидкий азот не изменяет вакцину, но может привести к взрыву флакона при помещении на водяную баню. Такой флакон следует выдерживать при температуре окружающей среды в течение 1-2 минут, чтобы азот мог выйти, а затем продолжить работу обычным способом. Утечка жидкого азота во флакон с замороженной вакциной вызывает вопросы о стерильности замороженной вакцины. Однако такая система использовалась на протяжении десятилетий без каких-либо значительных проблем. Вакцину вводят подкожно через 30 минут после оттаивания (Pirano, 1977).

#### **2.3.4. Длительность иммунитета**

Получены противоречивые результаты в отношении длительности иммунитета, вызванного иммунизацией культуральной клеточной вакциной. Сообщалось о длительности иммунитета в диапазоне от более 48 месяцев (Stepanova & Zablotskii, 1989) до менее 13 месяцев (Ouelli *et al.*, 2004).

### 2.3.5. Стабильность

Замороженная вакцина имеет практически неограниченный срок хранения.

## **С2. Иммунизация крупного рогатого скота против *Theileria parva* методом инфицирования и лечения (живая вакцина)**

### **1. Общие сведения**

Вакцинация против *T. parva* основана на способе заражения и лечения, при котором аликвоту жизнеспособных спорозоитов инокулируют подкожно, и животных одновременно обрабатывают препаратом тетрациклина длительного действия, так называемый способ заражения и лечения (ITM) (Radley, 1981). Тетрациклины снижают тяжесть инфекции, и полученная умеренная инфекция обычно контролируется иммунным ответом хозяина, таким образом, достигается состояние носительства. Всегда существует риск, связанный с использованием живых паразитов для иммунизации, однако при соответствующем контроле качества и тщательном определении безопасной и эффективной иммунизирующей дозы метод может быть использован и успешно используется в полевых условиях. Было показано, что некоторые виды *T. parva* гарантированно заражают КРС, не вызывая заболеваний, и их можно использовать без лечения тетрациклином. Один такой консервированный препарат применяется в полевых условиях и имеет значительные преимущества по сравнению с потенциально летальными инфекциями, вызываемыми консервированными препаратами, и обеспечивает более низкую стоимость вакцинации. Тем не менее, различные консервированные препараты этих видов могут вызвать тяжелые заболевания у крупного рогатого скота, что еще раз подтверждает важность тщательного контроля над иммунизирующей дозой.

### **2. Структура производства и минимальные требования к вакцинам**

#### **2.1. Характеристики посевного материала**

##### **2.1.1. Биологические характеристики исходного посевного материала**

Инфицированные *Theileria parva* клещи могут быть получены путем кормления личинок клещей *Nymphal Rhipicephalus appendiculatus* на ушах животного на стадии активной инфекции ЕСФ. После линьки, после предварительного кормления в течение 4 дней на кроликах, эти клещи будут иметь инфекционные спорозоиты в слюнных железах. При измельчении таких предварительно выкормленных клещей в специальной среде, спорозоиты будут высвобождаться в супернатантах, и может быть получен консервированный препарат (FAO, 1984), который может быть криоконсервирован и, в случае получения достаточного количества, сохранен в качестве исходного посевного материала.

При необходимости консервированные рабочие посевные материалы готовят путем введения криоконсервированных спорозоитов исходного посевного материала экспериментальному КРС и получения стабильного посевного материала, как описано ниже. Вакцины должны быть получены из посевного материала (рабочего посевного материала), который после

иммунологического описания не подвергался дальнейшим пассажам клещей, поскольку последние может измениться после пассажа.

### 2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, свобода от посторонних примесей)

#### i) Отбор клещей в полевых условиях

Важно, чтобы при подготовке иммунизирующих консервированных препаратов использовались хорошо описанные лабораторные штаммы *R. appendiculatus*. Если в полевых условиях клещей собирают для экспериментальных целей, следует рассмотреть возможность опасности для человека, представляемой патогенами, присутствующими в этих клещах. Наиболее важным патогеном считается вирус Конго-крымской геморрагической лихорадки, обычно ассоциируемый с клещами рода *Hyalomma* и широко распространенной в географическом ареале обитания *R. appendiculatus*. Таким образом, лица, работающие с полевыми клещами, должны знать о потенциальных опасностях. Клещи видов *Hyalomma* обычно не следует удалять с хозяев; набухших или частично набухших клещи нельзя раздавливать пальцами. В случае удаления, при обращении с клещами следует использовать пинцет.

#### ii) Оборудование для обработки клещей

Обработку собранных в полевых условиях клещей в лаборатории следует контролировать во избежание их случайного прикрепления к персоналу. Собранные в поле клещи должны питаться на кроликах и КРС в изолированных помещениях. Животных, на которых кормятся лабораторно-зараженные или полевые клещи, следует уничтожать. После набухания собранных в поле клещей клещей на лабораторных животных, аликвоты гомогенизируют и проверяют на наличие посторонних патогенов человека посредством инокуляции в культуру клеток почки новорожденного хомяка (ВНК) и клеток Vero. Результаты этих инокуляций следует изучать в ходе трех пассажей. Все неиспользованные клещи должны быть уничтожены химическими средствами или сжиганием.

Испытания биологических материалов на стерильность и свободу от контаминаций можно найти в главе 1.1.9. Поскольку материал консервированного препарата получен от полевых животных и кроликов, их клетки могут быть потенциальными источниками контаминации вакцины посторонними патогенами. Потенциальные контаминанты включают бычий лейкоз, микоплазму, вирус вирусной диареи КРС, ГЭ КРС, а также другие виды *Theileria*, передаваемые *R. Appendiculatus*, наряду с другими бактериями и вирусами.

В случае использования разных видов вакцины в тех же помещениях проблемы с этикетками можно свести к минимуму при помощи соответствующих карандашей и четкой маркировки. Для предотвращения перекрестной контаминации и неправильной маркировки приготовление различных консервированных препаратов следует проводить последовательно. Для обеспечения использования правильного исходного



сырья должен быть введен регулярный контроль качества.

### **2.1.3. Валидация в качестве вакцинного штамма**

Вакцинный штамм следует идентифицировать в ходе испытаний на перекрестный иммунитет. Их организуют, используя вакцинный штамм и консервированные препараты изолятов полевого *T. parva* из региона, для которого необходимо изготовить вакцинный штамм. В идеале, для каждого теста следует использовать пять животных и два контрольных животных, учитывая, что тесты должны проводиться двумя способами. Первый способ: использование вакцины для контрольного заражения животных, иммунизированных местными изолятами, и подтвержденных последующим гомологичным заражением; второй способ: использование местного штамма(ов) для контрольного заражения животных, иммунизированных вакциной и подтвержденных последующим гомологичным контрольным заражением. Это предоставит информацию о том, в какой степени вакцинный штамм будет обеспечивать защиту. С другой стороны, результаты покажут, может ли произойти «прорыв» в местной популяции *T. parva*, присутствующей у животных-носителей в регионе, где будет применена вакцина. Второй тест заключается в исследовании того, может ли вакцинный штамм контролироваться посредством планируемого лечения во время ИТМ.

## **2.2. Способ производства**

### **2.2.1. Процедура**

Партии вакцин производятся в нескольких институтах в Восточной Африке с использованием различных штаммов, возможно, требующих параметров, отличных от описанных здесь. Для обеспечения устойчивости иммунизации в полевых условиях, важно, чтобы консервированные препараты производимых клещами спорозоитов в иммунизирующем сырье были получены из полностью описанного консервированного «рабочего посевного материала». Консервированный рабочий посевной материал должен быть получен непосредственно из референтного исходного посевного материала, имеющегося в необходимом количестве для подготовки иммунизирующих консервированных препаратов в дальнейшем. Иммунизирующие консервированные препараты могут быть приготовлены в соответствии с предлагаемым набором стандартов (Morzaria *et al.*, 1999b).

### **2.2.2. Требования к ингредиентам**

Перед началом производства вакцины необходим посевной материал с известными характеристиками. Различают три типа посевного материала:

i) **Исходный посевной материал**

Исходный посевной материал является криоконсервированным препаратом спорозоита, полученным из определенного сырья, которое было выбрано и отправлено на постоянное хранение, и из которого получены все другие посевные материалы. Исходный посевной материал должен состоять из однородной партии, которая смешана и залита в контейнеры в виде одной партии. Поскольку в производственном процессе используются спорозоиты, зараженные *T. parva*, исходный

посевной материал также представляет собой исходное сырье (см. Главу 1.1.8). Для приготовления исходного посевного материала используются *T. parva*-инфицированные взрослые клещи *R. appendiculatus*, которые на стадии личинок кормились на ушах животного на стадии активной инфекции ЕСФ. После линьки и кормления на кроликах в течение 4 дней они будут демонстрировать инфекционных спорозоитов в слюнных железах. Их количество может быть определено путем вскрытия клещей и определения процента инфицирования во вскрытых слюнных железах посредством окрашивания (Walker *et al.*, 1981). После измельчения этих клещей в специфической среде спорозоиты будут высвобождаться в супернатантах, и может быть получен препарат (FAO, 1984), который может быть криоконсервирован в не менее чем 100 криопробирках, каждая из которых предпочтительно содержит равный набор инфицированных ацинусов, или в случае нового сырья, равный 10 зараженным клещам на пробирку. Проверку жизнеспособности исходного посевного материала следует выполнять после криоконсервации исходного посевного материала в течение не менее 24 часов посредством восстановления содержимого одной из криопробирок.

ii) Рабочий посевной материал

Рабочий посевной материал получают из инфекционных спорозоитов на уровне пассирования между исходным посевным материалом и производственным материалом. Для подготовки рабочего посевного материала содержимое одной криопробирки исходного посевного материала вводят здоровому экспериментальному животному для получения острой инфекции ЕСФ.

iii) Производственный посевной материал

Для приготовления партии вакцины содержимое достаточного количества криопробирок с рабочим посевным материалом смешивают и соответствующую дозу вводят необходимому количеству экспериментального КРС для получения острой инфекции ЕСФ.

Инфекция устанавливается с помощью консервированного рабочего посевного материала *T. parva* путем введения здоровому КРС серологически отрицательного к переносимым клещами болезням. Во время паразитической фазы последующей болезни чистые лабораторно-выращенные личинки *R. appendiculatus* питаются на животных, и напитавшихся клещей собирают. Взрослые клещи, собранные в период от 3 недель до 4 месяцев после линьки, наносят на уши здоровых кроликов. На каждое ухо наносят около 600 клещей, и неприкрепившихся клещей удаляют через 24 часа. Через 4 дня клещей удаляют, и отбирают образцы (обычно 60 клещей) для определения процента инфицирования путем вскрытия слюнных желез. Оставшихся клещей подсчитывают и делят на партии приблизительно по 1000 особей. Оценка общего количества клещей может быть получена путем подсчета и взвешивания заданного количества клещей, а затем взвешивания всех клещей. Клещей промывают в сите под большой струей водопроводной воды; также может быть проведена их поверхностная дезинфекция в 1% хлорида бензалкония или в 70% спирт. Затем клещей снова

промывают в дистиллированной воде.

Клещей помещают (~ 1000) во флаконы для образцов из толстого стекла или в пластиковые стаканы и добавляют 50 мл МЭМ с солями Хэнкса или Эрла и 3,5% бычьего плазменного альбумина (БПА). Флаконы хранят на льду, а клещей измельчают с использованием тканевого гомогенизатора (например, Silverson LR2) в течение 2 минут с использованием измельчительной головки с большим клапаном и в течение 3 минут с использованием головки с маленьким клапаном (эмельгатор). Для более мелких партий альтернативным методом может являться перетирание клещей партиями по 1000 особей с использованием ступки и пестика. Затем в течение 15-30 минут клещей непрерывно перетирают в ступке группы по 2 специалиста. Первоначально используется 30-35 мл охлажденной среды МЕМ/ 3,5% БПА без глицерина с 50-100 г стекла. Остаток (от 50 мл) МЕМ/ АБП без глицерина используется для ополаскивания ступки, пестика и стекла, используемых для дробления клещей. Обратите внимание, что большая часть дробления выполняется по стенке ступки. Качество измельчения необходимо проверить под стереоскопическим микроскопом, и при необходимости, добавить стекла. СРЕДУ НЕОБХОДИМО ХРАНИТЬ ПРИ 4°C.

Измельченный материал клещей доводят до 50 мл на каждые 1000 клещей, затем его центрифугируют при 50 g в течение 5 минут и собирают супернатант. По каплям добавляют равный объем холодного 15% глицерина в МЕМ/ АБП, в то время как клещевой материал охлаждают на льду и перемешивают магнитной мешалкой. Конечный объем будет содержать спорозоиты из расчета десять клещей/ мл. Количество клещей/ мл может быть скорректировано, если показатели инфицирования паразитами в определенной партии клещей были либо очень высокими, либо очень низкими. Конечная концентрация глицерина в консервированном препарате спорозоида составляет 7,5%.

Флакон, содержащий измельченный материал клещей (ИМК), оснащена дозатором. Криопробирки объемом 1 мл заполняют консервированным препаратом (1 мл на флакон) при постоянном перемешивании на ледяной бане. Аликвоты выдерживают при 4°C. В качестве альтернативы, использовали оборудование для искусственного осеменения, применяемое для дозирования спермы, с предварительно маркированными пластмассовыми соломинками. Последняя система идеально подходит для больших объемов консервированного препарата, а цветовое кодирование и маркировка обеспечивают дополнительную проверку идентичности иммунизирующего консервированного препарата. Необходимое время установления равновесия составляет 30-45 минут.

Аликвоты затем хранят на изоляционных подставках, которые необходимо незамедлительно поместить в морозильную камеру с температурой -80°C. Их выдерживают в течение 24 часов, чтобы обеспечить постепенное охлаждение (ступенчатное замерзание) консервированного препарата. На второй день аликвоты переносят в жидкий азот и хранят до использования. Альтернативно флаконы могут быть помещены в газофазный жидкий азот на 3 часа, а затем погружены в жидкий азот для хранения (Pirano, 1989b). Вакцина

транспортируется в поле в жидком азоте. Пробирки вынимают в месте вакцинации, погружают флаконы с жидким азотом в теплую воду (38°C) на 30 минут для обеспечения надлежащего восстановления. Вакцину следует вводить в течение 60 минут после извлечения из контейнера с жидким азотом. После размораживания вакцину можно хранить в жизнеспособном состоянии на льду (+4°C) в течение 6 часов (Marcotty *et al.*, 2001; Mbaou *et al.*, 2007). Метод заражения и лечения обычно применяется с использованием тетрациклина длительного действия, вводимого внутримышечно, и рекомендуется сначала вводить тетрациклин, на случай если животное убежит, получив только консервированный препарат. После этого консервированный препарат вводят подкожно в область над перипаротидным лимфатическим узлом в ухе.

### 2.2.3. Производственный контроль

Необходимо вести учет исходного рабочего посевного материала и пассажей. Посевной материал не должен содержать инфекционных возбудителей, таких как энзоотический лейкоз КРС, бычий вирус иммунодефицита, бычий пестивирус, бычий синцитиальный вирус, лихорадка долины Рифт и т. д. Процедуры испытаний будут зависеть от их доступности, предпочтительно с использованием ДНК-анализа.

### 2.2.4. Испытания партий готового продукта

#### i) Стерильность

Описание испытаний биологических материалов на стерильность и свободу от контаминации можно см. в главе 1.1.9.

#### ii) Безопасность

Клеши и экспериментальные млекопитающие являются потенциальными источниками контаминации консервированных препаратов посторонними патогенами. В обоих случаях потенциальные контаминанты включают *Ehrlichia bovis*, бычья *Borrelia* sp., орбивирусы, буниавирусы и др. Поэтому для приготовления консервированных препаратов, которые будут применяться для иммунизации не должны использоваться полевые клещи. Для этой цели следует использовать хорошо описанные и не содержащие патогенов лабораторные колонии клещей. Для питания клещей следует использовать только здоровый КРС и кроликов, свободные от клещевых паразитов. Консервированные препараты следует готовить в асептических условиях. В некоторых случаях может быть предписано использование антибиотиков в концентрациях, соответствующих культуре тканей. Подготовленные консервированные препараты должны подвергаться обычным испытаниям на наличие любых вирусных инфекций в клетках ВНК и Vero (как указано выше). Консервированные препараты должны быть подвергнуты стандартному описанию *in vivo*, которое должно включать тестирование на инфекционность на интактном восприимчивом КРС, чувствительность к тетрациклинам и другим препаратам против тейлериоза и исследования перекрестного иммунитета. Необходимо подготовить описанный «консервированный препарат рабочего

посевного материала» для обеспечения чистоты сырья *T. parva* в дочернем иммунизирующем консервированном препарате.

Во время подготовки консервированного препарата также необходимо соблюдать осторожность, чтобы избежать контаминации инородными агентами сырья, используемого с другим сырьем *T. parva*. Необходимо установить процедуры обеспечения качества, например, при обработке инфицированных клещей, и данные правила следует строго соблюдать. Помещения для обработки клещей должно иметь строгое разделение инфицированных и неинфицированных клещей. Персонал, работающий с разными группами клещей, должен использовать отдельные комбинезоны для каждой партии клещей, используемых при подготовке консервированного препарата, и спецодежда подлежит ежедневной стерилизации. Следует избегать одновременной работы с несколькими различными партиями клещей. Системы хранения консервированного препарата должны включать четкую маркировку каждой пробирки или соломинки с консервированным препаратом с указанием предпочтительного количества доз на флакон или соломинку. Этот показатель будет варьироваться в зависимости от использования для небольших молочных стад или выгульных стад и т.п.

Проверки контроля качества консервированного препарата должны определять сходство с исходным сырьем посевного материала, а также обнаруживать любую контаминацию *T. parva*.

iii) Иммуногенность партии

Оценка количества инфицированных *T. parva* ацинусов в рассеченных слюнных железах клещей до измельчения является полезным индикатором уровня инфекции, но не учитывает переменные потери жизнеспособности при подготовке консервированного препарата в силу интенсивности измельчения и процессов замораживания-оттаивания. Кроме того, состояние созревания спорозитов трудно оценить гистологическим исследованием слюнных желез клеща. Поэтому инфекционность консервированного препарата определяют путем введения стандартной дозы объемом 1,0 мл восприимчивому КРС. Содержимое 2-4 случайно выбранных пробирок смешивают, а затем титруют на КРС, и его инфекционность и летальность при разных разведениях устанавливают для использования при иммунизации. Поскольку реакция КРС на инфекцию и метод лечения зависит от его восприимчивости к инфекции, важно проводить титрование консервированного препарата на КРС того же типа, что подлежит, иммунизации. Титрование консервированных препаратов вакцины остается весьма спорным вопросом. В идеальных условиях медианную инфекционную дозу ( $ID_{50}$ ) и среднюю летальную дозу ( $LD_{50}$ ) следует определять титрованием консервированного препарата с использованием десятикратного разведения (Duchateau *et al.*, 1998, 1999). Затем идентификатор  $ID_{99+}$  (соответствующий почти 100%-ной инфекционности и имеющий минимальную летальность) должен быть количественно определен с помощью дальнейшего титрования с использованием

разведений, приближенных к LD<sub>50</sub>. Что касается составных вакцин, то количественная оценка дозы вакцины сложна, так как разные штаммы необходимо объединить, что приведет к изменению общей летальности вакцины (Spreybroeck *et al.*, 2008). Также определяют восприимчивость к тетрациклинам, в основном, для обеспечения дозы контролируемой дозы консервированного препарата, предпочтительно, одной дозой тетрациклина длительного действия, вводимого одновременно с введением вакцины. Иммунизирующая доза должна индуцировать очень слабую или неочевидную инфекцию, и животное должно развивать серологический титр и иметь иммунитет против контрольного заражения летальным гомологичным штаммом. Если однократное введение тетрациклина не позволяет подавить инфекцию у всего КРС, то может быть использована либо более низкая доза иммунизирующего консервированного препарата, либо две дозы тетрациклина (в день 0 и 4). Было установлено, что однократная доза окситетрациклина длительного действия 30 мг/ кг эффективна при иммунизации в полевых условиях при использовании с соответствующим разбавлением консервированного препарата. Альтернативный метод, который был использован, включает инфицирование консервированным препаратом и введение парваксона в дозе 20 мг/ кг на 8 день (в зависимости от консервированного препарата). Этот метод может быть применен, когда тетрациклины ненадежны и требуется более одной обработки животного. Было показано, что однократная терапия с использованием бупараваксона в дозе 2,5 мг/ кг во время инфекции была эффективной при стабильных инфекциях, которые не контролировались с помощью однократного введения тетрациклина длительного действия в дозе 20 мг/ кг.

После установления процедуры, обеспечивающей безопасную и эффективную иммунизирующую дозу, последнюю следует строго соблюдать в полевых условиях. В противном случае может произойти нарушение иммунизации. Также важно определить разведение консервированного препарата и режим введения лекарств/ доз для наиболее восприимчивого КРС, для которого будет применяться иммунизация и терапия.

## **2.3. Требования к авторизации / регистрации / лицензированию**

### **2.3.1. Процесс производства**

Для регистрации вакцины все соответствующие данные, касающиеся изготовления вакцины и контроля качества (см. Разделы С2.2.1 и С2.2.2), должны быть представлены органам власти. Эта информация должна быть предоставлена для трех последовательных партий вакцины объемом не менее 1/3 типичного объема промышленной партии.

### **2.3.2. Требования к безопасности**

- i) Безопасность целевых и нецелевых животных

Спорозоиты *Theileria parva* не опасны для человека, но инфекционны для КРС, и инфицирование нативных животных для производства партий вакцины, а также эксперименты по титрованию для количественной

оценки дозы должны проводиться в учреждениях, свободных от клещей. Исследования биологических материалов на стерильность и свободу от загрязнения можно найти в главе 1.1.9. Во время заседания в Малави в 1988 году были приняты следующие рекомендации по безопасности при подготовке, манипуляциям и поставке вакцины против *T. parva* и лечении (Anon, 1989).

- ii) Возврат к вирулентности для аттенуированных/ живых вакцин и соображения экологии

Ввоз иммунизирующего препарата в регион/ страну, из которой он не происходит, может привести к тому, что паразит или паразит, входящий в состав данной партии, укоренится в качестве паразита КРС через носительство и будет распространяться с клещами. Долгосрочное воздействие заноса новых (и потенциально летальных) паразитов на эпизоотологию болезни необходимо учитывать до ввоза препарата и тщательно отслеживать после иммунизации.

Описание паразитов в целевых поголовья необходимо проводить до иммунизации и через определенные промежутки времени после иммунизации. В настоящее время описание сырья из паразитов применительно к вакцинации в первую очередь связана с иммунизацией и тестами по перекрестному заражению КРС. Однако в лабораториях, обладающих богатым опытом, был использован ряд *in vitro* методов для описания сырья на основе паразитов. Предварительные исследования показали, что сырье на основе паразитов, которое отличаются по профилю МАт, не может обеспечивать перекрестную защиту, тогда как сырье с аналогичным профилем обеспечивают перекрестную защиту (Irvin & Morrison, 1987). Однако в более поздних экспериментах с использованием другого сырья *T. parva* это наблюдение признано ошибочным. В ходе другого метода обнаружения антигенных различий использовали клоны Т-клеток, специфичные для зараженных паразитами клеточных линий, поскольку считается, что реакции Т-клеток играют важную роль в опосредовании иммунитета к *T. parva* (Irvin & Morrison, 1987). В настоящее время отсутствуют *in vitro* тесты, которые коррелируют с защитой *in vivo*. Для описания уровней инфекционности и вирулентности различного сырья на основе паразитов и для оценки влияния контрольного вмешательства на тейлериоз был предложен статистически обоснованный индекс реакции на болезнь, основанный на паразитологических, клинических и гематологических измерениях, (Rowlands *et al.*, 2000). В последнее время для характеристики консервированных вакцинных препаратов используется ДНК-типизация, которая может быть основана на многолокусном генотипировании с использованием полиморфных генов антигена или сателлитных маркеров, или их комбинации.

- iii) Меры предосторожности

Следует соблюдать осторожность при приготовлении консервированных препаратов спорозонта, чтобы избежать аэрозольной инфекции персонала посторонними патогенами при измельчении клещей. Персонал,

занимающийся измельчением клещей, должен быть проинструктирован относительно потенциальных опасностей; доступ к местам гомогенизации клещей должен иметь только назначенный и информированный персонал; персонал должен носить защитную одежду, в том числе перчатки и маски; и измельчение клещей должно проводиться в безопасном микробиологическом ламинарном боксе (см. главу 1.1.4 Биобезопасность и биозащита: стандарт для управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и на объектах животноводства).

### 2.3.3. Требования к эффективности

- i) Способность защищать от тейлериоза, передаваемого естественным путем

Трех или четырех телят вакцинируют обычной дозой вакцины, а 6 недель спустя вакцинированных телят и одинаковое количество невакцинированных телят заражают летальной дозой спорозоитов *T. parva* путем введения консервированного препарата, полученного из зараженных клещей. Не существует согласованных на международном уровне стандартов для объема контрольной дозы, используемой при проверке эффективности вакцины против *T. parva*. Доза должна вызывать, по крайней мере, острый тейлериоз. Реакции на инфекцию вакцинированных и невакцинированных контрольных телят отслеживают с использованием следующих параметров: день первого проявления, продолжительность и тяжесть гипертермии, день первого проявления и процент шизонт-инфицированных клеток в мазках лимфатических узлов, скорость эритроцитов, инфицированных пироплазмой, в мазках крови и тяжесть клинических проявлений, таких как анорексия, депрессия и лежачее положение. Для указанных целей можно использовать оценки, которые были предложены Rowlands *et al.* (2000) или Schettters *et al.* (2010).

Результаты теста на эффективность зависят от таких факторов, как иммунологические характеристики изолята *T. Parva*, а также вирулентность и доза полевого изолята, используемого для контрольного заражения. Исследования показывают, что телята, вакцинированные спорозоитовыми вакцинами, могут проявлять почти полную защиту или демонстрировать паразитемию низкого уровня, сопровождающуюся умеренной лихорадкой и незначительными отклонениями остальных параметров от их значений до вакцинации после контрольного заражения потенциально летальным гомологичным штаммом. Меньшая степень защиты проявлялась, когда КРС подвергался контрольному заражению паразитами, полученными от клещей из географически отдаленного региона. Напротив, в большинстве испытаний невакцинированные контрольные телята демонстрировали высокий уровень паразитемии и тяжелые клинические проявления. В отсутствие специального лечения большинство контрольных животных погибали от инфекции.

Полевые наблюдения также использовались для оценки эффективности противоэпизоотологических вакцин. Восприимчивый местный скот, а



также высокопородные экзотические породы были защищены от клинического тейлериоза и гибели на пастбищах, на которых невакцинированный КРС заразился тейлериозом.

Замороженная вакцина можно хранить без потери жизнеспособности в больших холодильниках с жидким азотом на производственном объекте и транспортировать на фермы в небольших контейнерах с жидким азотом. В энзоотических по тейлериозу зонах можно организовать полевые центры по хранению и поставке вакцины. Основное оборудование, необходимое для применения замороженной вакцины в полевых условиях, включает широкогорлую колбу для приготовления водяной бани на 38°C, термометр для измерения температуры воды, длинный пинцет, защитный щиток для лица и термостойкие перчатки. Применение замороженной вакцины для КРС в полевых условиях начинается с надевания защитного щитка и термостойких перчаток. Требуемое количество флаконов отбирают с помощью пинцета из контейнера холодильника с жидким азотом. При извлечении флаконов контейнер следует держать как можно более глубоко в холодильнике, чтобы избежать быстрого нагревания оставшихся флаконов. Каждый отобранный флакон должен быть проверен, чтобы удостовериться, что внутри него не просочился жидкий азот. Жидкий азот не изменяет вакцину, но может привести к взрыву флакона при помещении на водяную баню. Такой флакон следует выдерживать при температуре окружающей среды в течение 1-2 минут, чтобы азот мог выйти, а затем продолжить работу обычным способом. Утечка жидкого азота во флакон с замороженной вакциной вызывает вопросы о стерильности замороженной вакцины. Однако такая система использовалась на протяжении десятилетий без каких-либо значительных проблем

#### 2.3.4. Длительность иммунитета

В отличие от *T. annulata*, где в полевых условиях наблюдается значительная перекрестная защита между различными штаммами, в отношении *T. parva* сложилась более сложная ситуация. Для преодоления этой антигенной сложности используются две стратегии. В ряде стран было проверено сочетание трех видов сырья, которые обеспечивают широкий спектр защиты. Два больших объема трехвалентного консервированного препарата подготовлены для ФАО Международным научно-исследовательским институтом животноводства (ИЛРИ, Найроби) в 1996 году и еще один в 2008 году. Эти консервированные препараты были приготовлены в соответствии с последними стандартами и безопасно и эффективно применяются в Танзании. Дальнейшие партии будут подготовлены в Центре африканского союза по клещам и заболеваниям, переносимым клещами (Лилонгва, Малави) в связи с растущим спросом на инфекционно-лечебный метод иммунизации в эндемичных по *T. parva* регионах стран Африки к югу от Сахары. Если иммунизирующий консервированный препарат окажется неэффективным против «прорывного сырья», он должен быть выделен, описан, испытан и рассмотрен для использования либо отдельно, либо в качестве дополнения к используемому в настоящий момент иммунизирующему консервированному

препарата. Другая стратегия заключается в подготовке консервированного препарата из национального или местного сырья для использования в определенных регионах. Эта последняя стратегия является более затратной в отношении времени и ресурсов, но она в некоторой степени позволяет избежать ввоза новых паразитов в регион. При перемещении КРС существует риск заноса нового паразита на территорию, что может разрушить иммунитет, обеспечиваемый местным паразитом. Поэтому необходимо тщательно оценивать использование местного или завезенного сырья для иммунизации (Geysen, 2008; McKeever, 2007).

Метод иммунизации путем заражения и лечения эффективен при условии соблюдения соответствующих мер обеспечения качества. В более долгосрочной перспективе, сопутствующие проблемы с доставкой и риск индуцирования носительства и передачи болезни подчеркивают необходимость выявления защитных антигенов для разработки субъединичных вакцин.

### 2.3.5. Устойчивость

Замороженная вакцина имеет практически неограниченный срок хранения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ALLSOPP B.A. & ALLSOPP M.T.E.P. (1988). *Theileria parva*: genomic DNA studies reveal non-specific diversity. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **28**, 77–84.
- ALLSOPP B.A., BAYLIS H.A., ALLSOPP 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**, 157–165.
- ALLSOPP B.A., CARRINGTON M., BAYLIS H.A., SOHAL S., DOLAN T.T. & IAMS K. (1989). Improved characterization of *Theileria parva* isolates using the polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **35**, 137–148.
- ANON (1989). Theileriasis in Eastern, Central and Southern Africa, Dolan T.T., ed. Proceedings of a meeting on East Coast fever immunization held in Malawi, 18–20 September 1988. International Laboratory for Research on Animal Diseases, Nairobi, Kenya, 174–176.
- BILLIOUW M., BRANDT J., VERCRUYSSSE J., SPEYBROECK N., MARCOTTY T., MULUMBA M. & BERKVENNS D. (2005). Evaluation of the indirect fluorescent antibody test as a diagnostic tool for East Coast fever in eastern Zambia. *Vet. Parasitol.*, **127**, 189–198.
- 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**, 215–232.
- BISHOP R.P., ALLSOPP B.A., SPOONER P.R., SOHANPAL B.K., MORZARIA S.P. & GOBRIGHT E.I. (1995). *Theileria*: improved species discrimination using oligonucleotides derived from large subunit ribosomal RNA sequences. *Exp. Parasitol.*, **80**, 107–115.
- BISHOP R.P., SPOONER P.R., KANHAI G.K., KIARIE J., LATIF A.A., HOVE T., MASAKA S.

- & DOLAN T.T. (1994). Molecular characterization of *Theileria* parasites: application to the epidemiology of theileriosis in Zimbabwe. *Parasitology*, **109**, 573–581.
- BROWN C.G.D. (1979). Propagation of *Theileria*. In: Practical Tissue Culture Application, Maramorosch K. & Hirumi H., eds. Academic Press, New York, USA, 223–254.
- CONRAD P.A., IAMS K., BROWN W.C., SOHANPAL B. & OLE-MOIYOI O.K. (1987). DNA probes detect genomic diversity in *Theileria parva* stocks. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **25**, 213–226.
- DARGHOUTH M.E.A., BOUATTOUR A., BEN-MILED L. & SASSI L. (1996). Diagnosis of *Theileria annulata* – infection of cattle in Tunisia: comparison of serology and blood smears. *Vet. Res.*, **27**, 613–627.
- DOLAN T.T. (1989). Theileriasis: A comprehensive review. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **8**, 11–36.
- D'OLIVEIRA C., VANDERMERVE M., HABELA M., JACQUIET P. & JONGEJAN F. (1995). Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 2665–2669.
- DUCHATEAU L., BERKVENNS D.L. & ROWLANDS G.J. (1999). Decision rules for small vaccine experiments with binary outcomes based on conditional an expected power and size of the Fisher-exact test. *J. Appl. Statistics*, **26**, 689– 700.
- DUCHATEAU L., MCDERMOTT B. & ROWLANDS G.J. (1998). Power evaluation of small drug and vaccine experiments with binary outcomes. *Stat. Med.*, **17**, 111–120.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1984). Tick and Tick-borne Disease Control: A Practical Field Manual. FAO, Rome, Italy.
- GEYSEN D. (2008). Live immunisation against *Theileria parva*: spreading the disease? *Trends Parasitol.*, **24**, 245– 246.
- GEYSEN D., BISHOP R., SKILTON R., DOLAN T.T. & MORZARIA S. (1999). Molecular epidemiology of *Theileria parva* in the field. *Trop. Med. Int. Health*, **4**, A21–27.
- GODDEERIS B.M., KATENDE J.M., IRVIN A.D. & CHUMO R.S.C. (1982). Indirect fluorescent antibody test for experimental and epidemiological studies on East Coast fever (*Theileria parva* infection of cattle). Evaluation of a cell culture schizont antigen fixed and stored in suspension. *Res. Vet. Sci.*, **33**, 360–365.
- GRAY M.A., LUCKINS A.G., RAE P.F. & BROWN C.G.D. (1980). Evaluation of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of infections with *Theileria parva* and *Theileria annulata*. *Res. Vet. Sci.*, **29**, 360–366.
- GUBBELS G., DE VOS A., VAN DER WEILDE M., VISERAS J., SCHOULS L., DEVRIES E. & JONGEJAN F. (1999). Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridisation. *J. Clin. Microb.*, **37**, 1782–1789.
- GUBBELS M.J., HONG Y., VAN DER WEIDE M., QI B., NIJMAN I.J. & GUANGYUAN L. (2000). Molecular characterisation of the *Theileria buffeli/orientalis* group. *Int. J. Parasitol.*, **30** (8), 943–952.
- HASHEMI-FESHARKI R. (1988). Control of *Theileria annulata* in Iran. *Parasitol. Today*, **4**, 36–40.
- HASHEMI-FESHARKI R. (1998). Recent development in control of *Theileria annulata* in Iran. *Parasite*, **5**, 193–196. IRVIN A.D. & MORRISON W.I. (1987). Immunopathology, immunology

and immunoprophylaxis of *Theileria* infections. In: Immune Response in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology, and Immunoprophylaxis, Soulsby

E.J.L. ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 223–274.

JEONG W., YOON S.H., AN D.J., CHO S.H., LEE K.K. & KIM J.Y. (2010) A molecular phylogeny of the benign *Theileria* parasites based on major piroplasm surface protein (MPSP) gene sequences. *Parasitology*, **137**, 241–249.

KACHANI M., EL-HAJ N., KAHOUACHE & OUHELLI H. (2004a). Vaccin vivant contre la theileriose bovine constitué par des macroschizonte de *Theileria annulata*: innocuité, durée de l'immunité et absence de portage. *Revue Méd. Vet.*, **155**, 624–631.

KACHANI M., EL-HAJ N. & OUHELLI H. (2004b). Condition de stockage d'un vaccin vivant contre *Theileria annulata*. *Revue Méd. Vet.*, **155**, 467–471.

KARIUKI D.P., YOUNG A.S., MORZARIA S.P., LESAN A.C., MINING S.K., OMWOYO P., WAFULA J.L. & MOLYNEUX D.H. (1995). *Theileria parva* carrier state in naturally infected and artificially immunised cattle. *Trop. Anim. Health Prod.*, **27**, 15–25.

KAWAZU S., SUGIMOTO C., KAMIO T. & FUJISAKE K. (1992). Analysis of the genes encoding immunodominant piroplasm surface proteins of *Theileria sergenti* and *Theileria bufelli* by nucleotide sequencing and polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **56**, 169–176.

KUBOTA S., SUGIMOTO C. & ONUMA M. (1995). A genetic analysis of mixed population in *Theileria sergenti* stocks and isolates using allele-specific polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.*, **57**, 279–282.

MARCOTTY T, BILLIOUW M., CHAKA G., BERKVENNS D., LOSSON B. & BRANDT J. (2001). Immunisation against East Coast fever by the infection and treatment method: evaluation of the use of ice baths for field delivery and appraisal of an acid formulation of long-acting tetracycline. *Vet. Parasitol.*, **99** (3), 175–187.

MARCOTTY T.B.J., BILLIOUW M., CHAKA G., LOSSON B. & BERKVENNS D. (2002). Immunisation against *Theileria parva* in eastern Zambia: influence of maternal antibodies and demonstration of the carrier status. *Vet. Parasitol.*, **110** (1–2), 45–56.

MARITIM A.C., YOUNG A.S., LESAN A.C., NDUNGU S.G., MUTUGI J.J. & STAGG D.A. (1989). Theilerial parasites isolated from carrier cattle after immunization with *Theileria parva* by the infection and treatment method. *Parasitology*, **99**, 139–147.

MBAO V., BERKVENNS D., DORNY P., VAN DEN BOSSCHE P. & MARCOTTY T. (2007) Comparison of the survival on ice of thawed *Theileria parva* sporozoites of different stocks cryoprotected by glycerol or sucrose. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **74** (1), 9–15.

MCKEEVER D.J. (2007). Live immunisation against *Theileria parva*: containing or spreading the disease? *Trends Parasitol.*, **23**, 565–568.

MORISSON W.I & MC KEEVER D.J. (2006). Current status of vaccine development against *Theileria* parasites. *Parasitology*, **133**, S169–S187.

MORZARIA S.P., KATENDE J., MUSOKE A., NENE V., SKILTON R. & BISHOP R. (1999a). Development of sero-diagnostic and molecular tools for the control of important tick-borne pathogens of cattle in Africa. *Parasitologia*, **41** (Suppl. 1), 73–80.

MORZARIA S.P., MUSOKE A.J., DOLAN T.T., NENE V., NORVAL R.A.I. & BISHOP R. (1989). Studies on pathogenic *Theileria mutans*. Annual Scientific Report, International Laboratory

for Research on Animal Diseases, Nairobi, Kenya, 7–8.

MORZARIA S., SPOONER P., BISHOP R. & MWAURA S. (1999b). The preparation of a composite stabilate for immunisation against East Coast fever. *In: Live Vaccines for Theileria parva: Deployment in Eastern, Central and Southern Africa. Proceedings of a Joint OAU, FAO and ILRI Workshop held at ILRI, Nairobi, Kenya 10–12 March 1997.* ILRI, Kenya, 56–61.

MUSOKE A.J., KATENDE J.M., TOYE P.G., SKILTON R.A., IAMS K.P., NENE V. & MORZARIA S.P. (1994). Progress towards development of an antibody detection ИΦA for the diagnosis of *Theileria parva*. *In: Use of Applicable Biotechnology Methods for Diagnosing Haemoparasites. Proceeding of the Expert Consultation, FAO, Rome, Italy,* 174–181.

OUELLI H., KACHANI M., EL-HAJ N. & RAISS S. (2004). Vaccin vivant contre *Theileria annulata* et durée de l'immunité. *Revue Méd. Vet.* **155**, 72-75.

OURA C.A., ODONGO D.O., LUBEGA G.W, SPOONER P.R, TAIT A. & BISHOP R.P. (2003). A panel of microsatellite and minisatellite markers for the characterisation of field isolates of *Theileria parva*. *Int. J. Parasitol.*, **33** (14), 1641–1653.

PATEL E.H., LUBEMBE D.M., GACHANJA J., MWAURA S., SPOONER P. & TOYE P. (2011). Molecular characterization of live *Theileria parva* sporozoite vaccine stabilates reveals extensive genotypic diversity. *Vet. Parasitol.*, **179**, 62–68.

PIPANO E. (1977). Basic principles of *Theileria annulata* control. *In: Theileriosis, Henson J.B. & Campbell M., eds. International Development Research Centre, Ottawa, Canada,* 55–65.

PIPANO E. (1989a). Bovine theileriosis in Israel. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **8**, 79–87.

PIPANO E. (1989b). Vaccination against *Theileria annulata* theileriosis. *In: Veterinary Protozoan and Hemoparasitic Vaccines, Wright I.G., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA,* 203–234.

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

RADLEY D.E. (1981). Infection and treatment immunization against theileriosis. *In: Advances in the Control of Theileriosis, Irvin A.D., Cunningham M.P. & Young A.S., eds. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, The Netherlands,* 227–237.

ROWLANDS G.J., MUSOKE A.J., MORZARIA S.P., NAGDA S.M., BALLINGAL K.T. & MCKEEVER D.J. (2000). A statistically derived index for classifying East Coast fever reactions in cattle challenged with *Theileria parva* under experimental conditions. *Parasitology*, **120**, 371–381.

SCHETTERS T.P., ARTS G., NIESSEN R. & SCHAAP D. (2010). Development of a new score to estimate clinical East Coast fever in experimentally infected cattle. *Vet. Parasitol.*, **167** (2–4), 255–259.

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. *Vet. Parasitol.*, **155**, 37–48.

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**, 265–276.

SPEYBROECK N., MARCOTTY T., AERTS M., DOLAN T., WILLIAMS B., LAUER J., MOLENBERGHS G., BURZYKOWSKI T.,

MULUMBA M. & BERKVENNS D. (2008). Titrating *Theileria parva*: Single stocks against combination of stocks. *Exp. Parasitol.*, **118**, 522–530.

STEPANOVA N.I. & ZABLITSKII V.T. (1989). Bovine theileriosis in the USSR. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **8**, 89–92. WALKER A.R., YOUNG A.S. & LEITCH B.L. (1981) Assessment of *Theileria* infections in *Rhipicephalus appendiculatus* ticks collected from the field. *Z. Parasitenkd.*, **65**, 63–69.

WATHANGA J.M., JONES T.W. & BROWN C.G.D. (1986). Cryopreservation of *Theileria* infected lymphoblastoid cells with functional assessment of viability. *Trop. Anim. Health Prod.*, **18**, 191–197.

\*

\*      \*

**NB:** Существует Референтная лаборатория МЭБ по тейлериозу (см. Таблицу в Части 4 настоящего Наземного Руководства или см. веб-сайт МЭБ для получения наиболее недавнего списка:

<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>  
<http://www.oie.int/>).

Пожалуйста, свяжитесь с Референтной лабораторией МЭБ для получения дополнительной информации о диагностических тестах, реагентах и вакцинах против тейлериоза