

## ГЛАВА 3.4.2

### БАБЕЗИОЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

---

#### РЕЗЮМЕ

Бабезиоз является болезнью, которая передается простейшими клещами и которую вызывают простейшие паразиты *Babesiabovis*, *B. Bigemina*, *B. Divergens* и другие. *Rhipicephalus (Boophilus) spp.*, основные переносчики *B.bovis* и *B.bigemina* широко распространены в тропических и субтропических странах. Основным переносчиком *B. Divergens* является *Ixodesricinus*. Другими важными переносчиками, передающими этот патогенный организм, являются *Haemaphysalis* и другие виды *Rhipicephalus*.

**Идентификация возбудителя:** Когда речь идет о живых животных, толстые и тонкие мазки капиллярной крови необходимо брать из, например, кончика хвоста. Паразиты в павших животных могут быть обнаружены посредством микроскопических исследований мазков периферической крови, мозга, почек, сердечной мышцы, селезенки и печени при условии несильного разложения. Мазки фиксируют в течение 15-30 минут в метаноле, окрашенном 10% красителем Гимза, и исследуют при  $\times 800-1000$  увеличении при погружении в масло. Можно проводить анализы с использованием чувствительной полимеразной цепной реакции, при помощи которой можно обнаружить и дифференцировать виды *Babesia* у крупного рогатого скота.

**Серологические тесты:** Иммуносорбентный ферментный анализ (ИФА) и конкурентный ИФА с использованием рекомбинантных мерозоитных белков *B.bovis* и *B.bigemina* заменили непрямую реакцию флуоресцирующих антител (НМФА) для обнаружения антител к *Babesia spp.* из-за эффективности обработки и объективности интерпретации результатов. Реакцию флуоресцирующих антител широко использовали в прошлом, но серологические перекрестные реакции затрудняют диагностику *B.bigemina*. Иммунохроматографические исследования (ICT) с использованием рекомбинантных мерозоитных белков *B. bovis* и *B. bigemina* были также разработаны и использовались для эпизоотологических исследований данных инфекций. Реакцию связывания комплемента (РСК) использовали в некоторых странах, но в настоящее время ее не рекомендуют к использованию.

**Требования к вакцинам:** Вакцины, включающие живые и аттенуированные штаммы *B. bovis*, *B. bigemina* или *B. divergens* производят в разных странах из крови инфицированных животных-доноров или из культуры *in-vitro*. Вакцины поставляют в замороженном или охлажденном виде. Преимущество замороженных вакцин состоит в тщательном производственном контроле каждой партии. Но по сравнению с охлажденными вакцинами, они имеют меньший срок хранения после оттаивания. Из-за риска

контаминации этих полученных из крови вакцин важно проводить тщательный контроль качества, но это может быть чрезвычайно дорого.

В то время как методы производства *in-vitro* имеют очевидные преимущества с точки зрения благополучия животных, вакцины можно успешно производить с использованием систем производства *in-vivo* при строгом соблюдении норм обеспечения благополучия животных. Как в отношении систем *in-vivo*, так и в отношении систем *in-vitro*, необходимо строго соблюдать протоколы производства для того, чтобы обеспечить стабильность вакцины и избежать потенциальных изменений вирулентности, иммуногенности и защитных свойств, связанных с непрерывными пассажами организмов *Babesia spp.* как на культуре, так и на спленэктомизированных телятах.

Что касается живых вакцин, рекомендуется с целью безопасности ограничить их использование у телят моложе 1 года, так как вероятно эти животные имеют неспецифический иммунитет. Более взрослых вакцинированных животных необходимо содержать под наблюдением и обрабатывать бабезицидами, если наблюдаются нежелательные явления.

Защитный иммунитет развивается через 3-4 недели. Однократная вакцинация обеспечивает пожизненным иммунитетом.

## А. ВВЕДЕНИЕ

Бабезиоз крупного рогатого скота вызывают простейшие паразиты рода *Babesia*, отряда *Piroplasmida*, типа *Apicomplexa*. Из видов, поражающих животных, два вида – *Babesia bovis* и *Babesia bigemia* являются наиболее распространенными и значимыми в Африке, Азии, Австралии и Центральной и Южной Америке. *Babesia divergens* имеет экономическое значение в некоторых частях Европы.

Различные виды клещей являются переносчиками *Babesia* (Bocketal., 2008). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* является основным переносчиком *B. Bigemia* и *B. Bovis* и широко распространен в тропиках и субтропиках. Переносчиком *Babesia divergens* является *Ixodes ricinus*. Другими важными переносчиками являются *Haemaphysalis* и другие виды *Rhipicephalus*.

*Babesia bigemia* является наиболее распространенным видом, в то время как *B. Bovis* является более патогенным чем *B. Bigemia* или *B. divergens*. Инфицирование *B. Bovis* характеризуется высокой температурой, атаксией, анорексией, общим циркуляторным шоком и иногда нарушениями нервной системы в результате разрушения инфицированных эритроцитов в церебральных капиллярах. Позже в ходе болезни могут развиваться анемия и гемоглобинурия. В случае острого течения болезни максимальный уровень паразитемии (процент инфицированных эритроцитов) в циркулирующей крови составляет менее 1 %. В противоположность этому при инфицировании *B. Bigemia* уровень паразитемии часто превышает 10% и может достигать 30%. Инфицирование *B. Bigemia* характеризуется в основном повышенной температурой, гемоглобинурией и анемией. При инфицировании *B. Bigemia* внутрисосудистых разрушений инфицированных эритроцитов не наблюдается. Паразитемия и клинические проявления при инфицировании *B. divergens* в некотором роде сходны с инфицированием *B. Bigemia* (Zintl et al., 2003).

У инфицированных животных вырабатывается пожизненный иммунитет против повторного инфицирования теми же самыми видами. Кроме того, существуют доказательства об уровне перекрестной защиты против последующего инфицирования *B. Bovis* у *B. Bigemia*-иммунных животных. У телят редко проявляются клинические признаки болезни после инфицирования несмотря на участие видов *Babesia* или иммунный статус маток (Bock et al., 2008; Zintl et al., 2003).

## В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Таблица 1. Имеющиеся методы тестирования для диагностики бабезиоза КРС и их цель

| Метод                                  | Цель                          |   |                               |                                   |                                |   |
|--|-------------------------------|---|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---|
|  | Свобода популяции от инфекции | Свобода отдельного животного от инфекции до перемещения | Вклад в стратегию искоренения | Подтверждение клинических случаев | Превалентность инфекции-надзор | Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации |
| Идентификация возбудителя <sup>1</sup> |                               |   |                               |                                   |                                |   |
| Микроскопическое исследование          | -                             | +   | -                             | +++                               | -                              | -   |
| ПЦР                                    | -                             | +++   | -                             | +++                               | -                              | -   |
| Обнаружение иммунного ответа           |                               |   |                               |                                   |                                |   |
| РСК                                    | -                             | -   | -                             | -                                 | -                              | +   |
| ИФА                                    | +++                           | +   | +++                           | -                                 | +++                            | +++   |
| Непрямая РИФ                           | +                             | -   | -                             | -                                 | ++                             | +++   |

Ключ: +++ = рекомендуемый метод; ++ = может быть использован в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность или другие факторы в значительной степени ограничивают его применение; - = не подходит для этой цели.

Несмотря на то, что не все тесты, перечисленные как категория +++ или ++ были подвергнуты формальной валидации, характер их рутинного использования и тот факт, что они широко использовались без двусмысленный результатов делают их приемлемыми для использования.

ПЦР = полимеразная цепная реакция, РСК = реакция связывания комплемента; ИФА = иммуноферментный анализ; непрямая РИФ = непрямая реакция иммунофлуоресценции.

### 1. Идентификация возбудителя

#### 1.1. Прямое микроскопическое исследование

Традиционным методом идентификации возбудителя у инфицированных животных является микроскопическое исследование толстых и тонких мазков крови окрашенных красителем Гимза, тип окраски по Романовскому (10% краситель Гимза в фосфатно-буферном растворе (ФБР) или растворе Соренсона, рН 7.4). Чувствительность толстых мазков такова, что уровень паразитемии, который можно обнаружить, составляет 1 паразит в 10<sup>6</sup> эритроцитах. Виды хорошо дифференцируются в тонких мазках, но плохо в более чувствительных толстых мазках. Использование данного метода

<sup>1</sup> Рекомендуется комбинация методов идентификации возбудителя, применяемая на том же клиническом образце.

возможно для обнаружения острых инфекций, но не для обнаружения переносчиков, где уровень паразитемии в основном достаточно низкий. Идентификация паразита и его дифференциация могут быть улучшены посредством использования вместо красителя Гимза флуоресцентного красителя, такого как акридинового оранжевого.

Образцы, отобранные от живых животных, должны быть предпочтительнее мазками свежей крови из капилляров, расположенных на кончиках ушей и кончике хвоста, так как в капиллярной крови наиболее распространен *B. Bovis*. Паразиты *B. Bigemia* и *B. Divergens* равномерно распределяются по сосудистой системе. Если нет возможности взять свежие мазки из капиллярной крови, то в антикоагулянт, литий-гепарин или этилен диамин тетрауксусную кислоту, собирают стерильную, кровь из яремной крови. Образец необходимо хранить в прохладном месте, предпочтительнее при температуре 5°C до отправки в лабораторию. Тонкие мазки крови высушивают на воздухе, фиксируют в абсолютизированном метаноле в течение 10-60 секунд и затем окрашивают 10% красителем Гимза в течение 15-30 минут. Предпочтительнее окрашивать мазки крови как можно скорее после приготовления для соответствующего окрашивания. Толстые мазки готовят следующим образом: на чистое стекло капают маленькую каплю крови (приблизительно 50 мкл) и круговыми движениями размазывают по небольшой площади стекла уголком другого стекла. Эту каплю не фиксируют в метаноле, а просто просушивают на воздухе, закрепляют техническим способом в течение 5 минут при температуре 80°C и окрашивают 10% красителем Гимза. Этот метод является более чувствительным для обнаружения видов *Babesia*, так как эритроциты разрушаются, а уровень паразитов повышается, но дифференциация видов затруднена. Неокрашенные мазки крови не следует хранить вместе с раствором формалина, так как пары формалина негативно воздействуют на качество окрашивания. Влага также негативно влияет на качество окрашивания.

Образцы, отобранные у мертвых животных, должны состоять из тонких мазков крови, а также смывов из коры головного мозга, почек (только, что умерших), селезенки (когда признаки разложения уже очевидны), сердечной мышцы, легкого и печени (Bock et al., 2006). Мазки из органов готовят путем надавливания чистым стеклом на свежий надрез на органе или путем раздавливания небольшого образца ткани (особенно коры головного мозга) между двумя чистыми стеклами микроскопа. При этом верхним стеклом, проводят по нижнему стеклу так, чтобы мазок ткани остался на каждом стекле. Затем мазок высушивают на воздухе (во влажном климате требуется небольшой подогрев), фиксируют в абсолютизированном метаноле нВ 10-60 секунд и окрашивают 10% красителем Гимза в течение 15-30 минут. Данный метод особенно подходит для проведения диагностики инфекции *B. Bovis* с использованием мазков из коры головного мозга, но если образцы отбирают через 24 часа после наступления смерти или позднее, особенно, при теплой погоде, данный метод является не надежным. Паразитов иногда можно

обнаружить в капиллярной крови, отобранной из области нижней конечности через один день или несколько дней после наступления смерти.

Все окрашенные мазки исследуют при погружении в масло с использованием (как минимум)  $\times 6$  линзы окуляра и  $\times 80$  линзы объектива. *Babesia Bovis* является небольшим паразитом, обычно находящимся в центре эритроцита. Его длина, примерно, 1-1,5 мкм и ширина 0,5-1,0 мкм. Обычно их обнаруживают парами, которые расположены под тупым углом друг к другу. *Babesia divergens* является небольшим паразитом и его морфологические признаки сходны с *Babesia bovis*. Однако, пары, расположенные под тупым углом, находятся с краю эритроцита. *Babesia Bigemia* обычно имеет грушевидную форму, но так же обнаруживают и много различных единичных форм. Обычно этот паразит имеет гораздо более крупные размеры (3-3,5 мкм длиной и 1-1,5 мкм шириной) и его обычно обнаруживают парами, расположенными под острым углом друг к другу или почти параллельно друг к другу. В острых случаях уровень паразитемии *B. Bovis* редко достигает 1% (при измерении в общем кровообращении, а не в капиллярной крови), уровень паразитемии *B. divergens* и *B. Bigemia* гораздо выше обычного.

## 1.2. Диагностические анализы, основанные на нуклеиновой кислоте

Диагностические анализы, основанные на нуклеиновой кислоте, являются очень чувствительными, особенно, при обнаружении *B. Bigemia* и *B. Bovis* у крупного рогатого скота-носителя (Buling *et al.*, 2007; Criado-Fornelio, 2007). Известно, что для выявления *Babesia spp.* методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), являются в 100 раз более чувствительными, чем микроскопические методы исследования, и могут обнаружить уровни паразитемии начиная с 0,001% до 0,0000001% (1 паразит в  $10^9$  эритроцитах) (Criado-Fornelio, 2007). Было описано несколько методов ПЦР, при помощи которых обнаружить и дифференцировать виды *Babesia* при заражении носителей (Buling *et al.*, 2007; Criado-Fornelio, 2007). Были также описаны анализы ПЦР для дифференциации изолятов *B. Bovis*. Применение процедуры обратного блоттинга, когда продукты ПЦР гибридизируются мембраносвязанными видоспецифическими олигонуклеотидными зондами, в отношении *Babesia* и, не так давно, двух методов количественной ПЦР (Criado-Fornelio *et al.*, 2009) позволило одновременно обнаружить многочисленные виды даже при инфекциях в случае носительства. Однако современные методы ПЦР не используются для широкомасштабного тестирования и в настоящее время вряд ли могут заменить серологические исследования в качестве метода, предпочтительного для проведения эпизоотологических исследований. Анализы ПЦР являются полезными в качестве подтверждающих тестов и, в не некоторых случаях, в качестве нормативных тестов. В недавнее время были разработаны методы изотермической амплификации с формированием петель (LAMP) и мультиплексной LAMP (Iseki *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012), которые обладают большей чувствительностью чем ПЦР. Этот последний

метод требует использования дорого и сложного оборудования, тогда как метод LAMP требует использование обычной водяной бани и результаты можно считывать невооруженным глазом. Таким образом, метод LAMP является недорогим, простым и метод быстрой амплификации ДНК подходит для диагностики на раннее выявление антигена.

### 1.2.1. Гнездовая ПЦР для одновременного обнаружения *B. Bovis* и *B. Bigemina*

В связи с тем, что чувствительность гнездовой ПЦР является выше, чем у ПЦР, гнездовая ПЦР является подходящим анализом для применения в международной торговле, особенно в отношении *B. Bovis*, который обычно демонстрирует низкую паразитемию или низкий статус носительства. Несмотря на то, что для гнездовой ПЦР используют несколько генов, RAP-1 и АМА-1 широко используются в отношении *B. bovis* и *B. Bigemina*, соответственно.

#### i) Выделение ДНК

- a) Целый образец крови отбирают в вакуумную пробирку для отбора крови, содержащую ЭДТК.
- b) 200 мкл крови КРС помещают в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку.
- c) Добавляют 1 мл холодного ФБР и центрифугируют при 1000 г в течение 5 минут при 4°C. Данный этап повторяют три раза.
- d) Удаляют супернатант и осадок ресуспендируют во 200 мкл ФБР.
- e) После измерения концентрации ДНК с использованием спектрометра образцы можно хранить при температуре -20°C.

#### ii) Мультиплексная гнездовая ПЦР

Следующая процедура теста была взята у Figueroa *et al.* (1993) и модифицирована для обнаружения *B. Bovis* и *B. Bigemina* при помощи мультиплексной гнездовой ПЦР на основе RAP-1 и Spel-Aval, соответственно.

- a) Для первого цикла ПЦР готовят 9 мкл реакционную смесь, состоящую из 1 мкл 10×рабочий буферный раствор, 200 мкл каждого дНТФ, 0,5 мкл внешних прямых (BoF и BiA) и обратных праймеров (BoR и BiB), 0,5 единиц ДНК полимеразы Taq (Applied Biosystems) и дистиллята двойной перегонки.
- b) 1 мкл выделенного образца ДНК добавляют в реакционную смесь и затем подвергают следующим условиям циклической ПЦР. За первоначальной активацией фермента при 95°C в течение 5 минут следуют 35 циклов, каждый из которых

состоит из этапа денатурирования 95°C в течение 5 минут секунд, этапа отжига при 55°C в течение 1 минуты и этапа вытягивания при 72°C в течение 1 минуты. Заключительный этап элонгации проводится при 72°C в течение 10 минут.

- с) Для гнездового цикла ПЦР 1мкл первого продукта ПЦР переносят в новую ПЦР пробирку, которая содержит реакционную смесь с тем же составом, что и во время первой ПЦР, за исключением внешних праймеров, которые были заменены внутренними прямыми (BoFN и BiAN) и обратными (BoRN и BiAN) праймерами.

iii) Список ПЦР праймеров

| Паразит     | ПЦР       | Праймер | Последовательность (5'-3')         |
|-------------|-----------|---------|------------------------------------|
| B. Bovis    | Первичная | BoF     | CAC-GAG-GAA-GGA-ACT-ACC-GAT-GTT-GA |
|             |           | BoR     | CCA-AGG-AGC-TTC-AAC-GTA-CGA-GGT-CA |
|             | Гнездовая | BoFN    | TCA-ACA-AGG-TAC-TCT-ATA-TGG-CTA-CC |
|             |           | BoRN    | CTA-CCG-AGC-AGA-ACC-TTC-TTC-ACC-AT |
| B. bigemina | Первичная | BiA     | CAT-CTA-ATT-TCT-CTC-CAT-ACC-CCT-CC |
|             |           | BiB     | CCT-CGG-CTT-CAA-CTC-TGA-TGC-CAA-AG |
|             | Гнездовая | BiAN    | CGC-AAG-CCC-AGC-ACG-CCC-CGG-TGC    |
|             |           | BiBN    | CCG-ACC-TGG-ATA-GGC-TGT-GTG-ATG    |

а) Продукты ПЦР сепарируют с использованием электрофореза (100V) в 1,5% агарозных гелях и 0,5 × трис/борат/ЭДТА (ТБЭ) буфер. Гели затем окрашивают SYBR зеленым I (1/1000), визуализируют в ультрафиолете и фотографируют.

iv) Интерпретация результатов

- а) Положительные образцы должны иметь ПЦР продукты предполагаемого размера (170 по для *B. Bigemina* и 291 по для *B. Bovis*) схожие с продуктами положительного контроля.
- б) Анализ необходимо повторять, если положительный контроль остается отрицательным или если отрицательный контроль является положительным.

Примечание: Несмотря на то, что описанная процедура применяется для мультиплексной ПЦР, симплексная гнездовая ПЦР может также применяться для обнаружения *B. Bovis* и *B. Bigemina* с использованием только соответствующих праймеров.

Sivakumar *et al.* (2012) отметил, что праймеры, нацеленные на рестрикционный фрагмент SpeI-AvaI могут также амплифицировать ДНК *B. ovata*. Таким образом необходимо особенно внимательно исследовать образцы ДНК, которые были получены из регионов, эндемичных по *B. Ovata*.

### 1.3. Культивирование *in-vitro*

Методы культивирования *in-vitro* используются для обнаружения передаваемой носителями инфекции *Babesia* spp. (Holman *et al.*, 1993), а *B. bovis* так же клонируют в культуре. Минимальный уровень обнаружения паразитов этим методом будет в большой степени зависеть от имеющегося оборудования и профессионализма оператора. Благодаря тому, что обнаруживаемый уровень равен  $10^{-10}$  (Friedhoff & Bose, 1994), данный метод считается очень чувствительным, так как имеет 100 % специфичность при обнаружении инфекции.

## 2. Серологические исследования

Непрямая реакция флюоресцирующих антител (нМФА) широко использовалась в прошлом для выявления антител к *Babesia* spp., но тест на обнаружение *B. Bigemina* обладает плохой специфичностью. Перекрестные реакции с антителами к *B. bovis* и *B. bigemina* в тестировании с использованием непрямой реакции флюоресцирующих антител представляли проблему в местах, где сосуществуют два паразита. Тестирование нМФА также имеет недостатки из-за низкой скорости обработки образцов и субъективности. Реакцию связывания комплемента (РСК) описывают как метод, который используется для обнаружения антител к *B. bovis* и *B. Bigemina* (Анонимный источник, 2006). Этот тест использовали при осмотре животных, предназначенных для импорта в некоторые страны.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) в большинстве случаев заменил нМФА в качестве диагностического теста для обнаружения *Babesia* spp. благодаря объективности интерпретации результатов и способности ежедневно обрабатывать большое количество образцов. ИФА для диагностики инфекции *B. bovis*, где используется целый антиген мерозоит, был подвергнут всесторонней оценке (Molloy *et al.*, 1998). Высокая чувствительность и специфичность данного теста были продемонстрированы в Австралии и Зимбабве, но пороговые значения в разных лабораториях отличались друг от друга (Molloy *et al.*, 1998). Недавно были разработаны непрямой (Вано *et al.*, 2008; Вончит *et al.*, 2006) и конкурентный ИФА (Goff *et al.*, 2003), где используются рекомбинантные поверхностные антигены мерозитов и роптрии-ассоциированные антигены *B. bovis*. Конкурентный ИФА был в большей степени валидирован в разных лабораториях, при этом антиген был распознан антителом из различных регионов мира (Goff *et al.*, 2006). В некоторых ситуациях было отмечено снижение специфичности непрямого ИФА для обнаружения *B. bovis* с использованием рекомбинантных антигенов (Вано *et al.*, 2008).

Несмотря на усилия различных исследователей из различных лабораторий до сих пор нет хорошо валидированного ИФА для обнаружения *B. bigemina*. Методы ИФА для обнаружения антител к неочищенному антигену *B. bigemina* обычно имеют плохую специфичность. Конкурентные методы ИФА, разработанные и валидированные в Австралии и США (Goff *et al.*, 2008), по всей видимости, являются единственными методами ИФА, которые используются в плановой диагностике. В



отличие от заражения *B. bovis*, когда считается, что животные после заражения остаются носителями на всю жизнь, в случае инфицирования *B. bigemina*, от инфекции можно освободиться и уровни антител могут опуститься ниже отрицательного порога в течение нескольких месяцев после заражения (Goff *et al.*, 2008). Неопределенные результаты могут быть получены при отрицательных пороговых значениях; и данное явление может привести к трудности в диагностике, когда титры снижаются, если животное освобождается от инфекции.

Методы ИФА были также разработаны для обнаружения *B. Divergens* с использованием антигена, полученного из культуры, *Meriones* или крупного рогатого скота, но, по всей видимости, нет ни одного метода, который был бы валидирован на международном уровне (Zintl *et al.*, 2003). Недавно был разработан иммунохроматографический анализ для одновременной серодиагностики бабезиоза крупного рогатого скота, вызванного *B. Bovis* и *B. bigemina* (Kim *et al.*, 2008).

### **2.1. Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ для обнаружения *Babesia bovis***

Приготовление антигена основано на методике, описанной Waltisbuhl *et al.*, 1987. Инфицированную кровь (5-10% паразитемии) отбирают у спленэктомированного теленка и помещают в этилен-диамин тетрауксусную кислоту. Сначала кровь центрифугируют, удаляют плазму и отправляют на хранение для дальнейшего использования. Затем эритроциты промывают три раза в пяти объемах фосфатно-буферного раствора (ФБР) и инфицированные клетки концентрируют путем дифференциального лизиса неинфицированных клеток в гипотоническом соляном растворе. Инфицированные клетки более резистентны к лизису в гипотоническом соляном растворе, чем неинфицированные клетки.

Для приготовления наилучшей концентрации для определенной инфицированной крови готовят серию гипотонических соляных растворов с 0,35% - 0,50% NaCl с последующим наращиванием на 0,025%. Затем пять объемов каждого соляного раствора добавляют к одному объему эритроцитной массы, аккуратно перемешивают и оставляют на пять минут. Затем смеси центрифугируют и удаляют супернатант. В каждую пробирку с эритроцитной массой добавляют равное количество плазмы (сохраненной из исходной крови) и содержимое пробирок перемешивают. Из каждой ресуспандированной смеси эритроцитов готовят тонкие мазки крови. Их фиксируют в метаноле и окрашивают красителем Гимза. Эти мазки исследуют под микроскопом с целью определения соляного раствора, который лизирует наибольшее количество неинфицированных эритроцитов, но оставляет инфицированные эритроциты интактными. Можно достигнуть >95% инфекции в оставшихся интактных эритроцитах.

Затем наибольшее количество эритроцитной массы дифференциально лизируют в оптимальном соляном растворе, центрифугируют и удаляют супернатант. Осадок (>95% инфицированных эритроцитов) лизируют в

дистиллированной воде при температуре 4°C, а паразитов осаждают центрифугированием, 12 000 *g* в течение 30 мин. Затем осадок после центрифугирования промывают, по крайней мере, три раза в ФБР посредством ресуспендирования и центрифугируют при температуре 4°C, пока в супернатанте не будет минимального количества гемоглобина. Затем его ресуспендируют в одном или двух объемах ФБР при 4°C и разрушают ультразвуком в соответствующих объемах при средней мощности в течение 60-90 секунд. Разрушенный ультразвуком материал ультрацентрифугируют (105 000 *g* в течение 60 секунд при температуре 4°C), а супернатант, содержащий растворившийся антиген мерозоит сохраняют. Супернатант смешивают с равным количеством глицерола и хранят в аликвотах по 2-5 мл при температуре -70°C. Для рабочей аликвоты приемлемо кратковременное хранение при температуре - 20°C.

### 2.1.1. Процедура тестирования

Процедура тестирования основана на процедуре, описанной Molloy *et al.*, (1998) с некоторыми изменениями.

- i) 100 мкл раствора антигена (когда антиген обычно разводят из расчета 1/400 – 1/600 на 0,1 Моль карбонатного буфера (pH 9.6)) добавляют в каждую лунку полистирольного 96-луночного титрационного микропланшета. Планшет покрывают и инкубируют в течение ночи при 4°C.
- ii) Раствор, содержащий любой несвязанный антиген удаляют и лунки затем блокируют в течение 1 часа при комнатной температуре посредством добавления в карбонатный буфер (pH 9.6) 200 мкл 2% раствора казеината натрия.
- iii) После блокировки лунки споласкивают три раза ФБР, содержащим 0,1% Твин 20 (PBST); затем 100 мкл разведенной исследуемой и контрольной сыворотки крупного рогатого скота (разведение 1/1000 в PBST, содержащим 2% порошка обезжиренного молока) добавляют в каждую лунку и планшеты инкубируют в течение 30 минут при комнатной температуре, периодически потряхивая.
- iv) Этап промывки состоит из 5 полосканий с использованием PBST. Во время последнего полоскания планшет трясут в течение 5 минут.
- v) Затем добавляют 100 мкл меченного пероксидазой антибычьего иммуноглобулина, разведенного в PBST, содержащим 2% порошок обезжиренного молока и планшеты встряхивают в течение 30 минут при комнатной температуре. (NB: некоторые партии порошка обезжиренного молока могут содержать иммуноглобулины, которые могут сталкиваться с конъюгатами анти-бычьего иммуноглобулина и должны проходить тестирование на соответствие до использования).
- vi) Лунки моют способом, описанным в пункте iv и 100 мкл субстрата пероксидазы (АБТС [2,2' – Azinobis-(3-Этилгексил

метоксициннамат-6-сульфоуксидна)]] дообавляют в каждую лунку (рекомендуемое рабочее разведение содержит 0.3 г/литр АБТС в буферном растворе глицерола/лимонной кислоты; концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01%<sup>1</sup>).<sup>2</sup> Реакция субстрата может продолжаться до тех пор, пока абсорбция сильной положительной контрольной сыворотки в каждом планшете не достигнет 1.

- vii) На данном этапе реакцию останавливают, используя равный объем (100 мкл) стоп-реагента пероксидазного окисления АБТС (рабочая концентрация 1% додецилсульфата натрия<sup>3</sup>). Показатели абсорбции при 414 нм считывают на ридере титрационного микропланшета в течение 30 минут. 3,3, 5,5-Тетраметилбензидин (ТМБ) также является подходящим субстратом, но реакцию с ним останавливают равными объемами (1 Моль) фосфорной кислоты (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) и результаты считывают при длине волны 450 нм.

С целью контроля различий между планшетами в каждый планшет включают известные положительные и отрицательные сыворотки. Тестируемую сыворотку сравнивают с позитивным контролем. Результаты абсорбции при постановки ИФА выражены в процентах данного положительного контроля (процент положительного результата). Положительные и отрицательные пороговые значения должны устанавливаться в каждой лаборатории посредством тестирования как можно большего количества положительных и отрицательных сывороток.

Каждую партию антигена и конъюгата необходимо титровать в шахматном порядке. Наиболее подходящей ферментной меткой для конъюгата является пероксидаза хрена. Подходящими субстратами являются АБТС или ТМБ. Используя данный тест можно обнаружить антитела, по крайней мере, через 4 года после однократного заражения. Реакции при использовании животных, иммунизированных против *B. bovis* должны составлять 95-100%, ложноположительные реакции с отрицательной сывороткой - 1-2%, ложноположительные реакции при использовании животных, иммунизированных против *B. bigemina* - <2%.

## 2.2. Конкурентный иммуоферментный анализ для обнаружения *Babesia bovis* и *Babesia bigemina*

---

<sup>2</sup>Поставлено KPL, Gaithersburg, Мериленд, США

<sup>3</sup>Поставлено KPL, Gaithersburg, Мериленд, США

Формат этих тестов основан на формате, описанном *Goff et al.* (2003). Тесты описаны вместе из-за схожести процессов. Они также были разработаны с целью валидации в качестве международных стандартных тестов и включают очищенный рекомбинантный антиген, высушенный в лунках титровального микропланшета для упрощения стандартизации, обработки и распределения и межлабораторного использования и сравнения при различных условиях (*Goff et al.*, 2006; 2008). Анализ основан на видоспецифическом, широко консервативном и тандемно повторяющемся В-клеточном эпитопе в С-конце роптрия-ассоциированного белка 1 (RAP 1), экспрессированном в качестве меченого гистидином пептида, слитого с тиоредоксином. Экспрессированный очищенный антиген сенсibiliзируют и затем высушивают в лунках титровального микропланшета; оптимальную концентрацию антигена и моноклонального антитела (MAb) определяют посредством блокирующей титрации. Что касается *B. bovis*, то положительная сыворотка ингибирует прикрепление эпитоп-специфического MAb BAVB75A4; что касается *B. bigemina*, то положительная сыворотка ингибирует прикрепление MAb BAVB75A4.

Были подсчитаны специфичность, чувствительность и прогнозируемые значения этих конкурентных тестов ИФА. И надежность теста сравнили по лабораториям. Что касается *B. Bovis* (*Goff et al.*, 2006), на основании анализа классификаций с применением ROC-кривых для определения положительных и отрицательных образцов в качестве порогового значения было выбрано 21% ингибирование. При использовании данного значения специфичность составляла 100%, чувствительность 91,1%, а положительная прогнозируемая величина 100%; отрицательная прогнозируемая величина была разной в зависимости от превалентности, от 99% при 10% превалентности до 55,6% при 90% превалентности. Недавно была проведена оценка конкурентного ИФА с использованием рекомбинантно мерозоитного поверхностного антигена 2с (rMSA-2с) в *Babesia Bovis* в Аргентине и он продемонстрировал 98% специфичность и 96,2% чувствительность (*Dominguez et al.*, 2012). Что касается *B. bigemina* (*Goff et al.*, 2008), при использовании гипотетического коэффициента превалентности равного 25% и порогового ингибирования для отрицательного значения равного 16% специфичность анализа составляла 98,3%, а чувствительность – 94,7%. Когда пороговое ингибирование было усилено до 21%, то специфичность составляла 100%, но чувствительность снизилась до 87,2%; Отрицательное прогнозируемое значение при 25% превалентности снизилось с 98,2% до 95,9%; а положительное прогнозируемое значение увеличилось с 94,9% до 100%. При ингибировании равном 21% отрицательное прогнозируемое значение варьировало от 97,0% при 10% превалентности до 48,2% при 95% превалентности; положительные прогнозируемые значения составляли 90,7% (10% превалентность), 95,7% (15% превалентность) и 100% при более высоком коэффициенте превалентности. Характеристики обоих тестов отвечают стандартам, требуемым для применения в международном масштабе.

## 2.3. Непрямая реакция флюоресцирующих антител

### 2.3.1. Приготовление антигена

Слайды антигена готовят из яремной крови, предпочтительнее всего когда паразетимия составляет 2% - 5%.

Кровь собирают в подходящий антикоагулянт (натрий цитрат или ЭДТК) и затем промывают, по крайней мере, три раза в 5-10 объемах ФБР с целью удаления контаминирующих белков плазмы и, особенно, иммуноглобулинов хозяина. После промывания инфицированные эритроциты суспендируют в двух объемах ФБР, к которым был добавлен 1% альбумин сыворотки крупного рогатого скота (BSA). BSA используют для прикрепления эритроцитов к стеклянному слайду. По предпочтению однослойные мазки крови готовят следующим образом: на чистое стекло капают каплю крови, которую потом вращают в центрифуге. Таким образом, получают однородные мазки. В то же время тонкие мазки крови можно готовить при помощи традиционной методики вручную (проводя концом одного стекла по другому). Затем мазки просушивают и фиксируют в течение 5 минут в печи при температуре 80°C. Зафиксированные мазки крови затем герметично закрывают (например, алюминиевой фольгой или коричневой бумажной клеящейся лентой) и хранят при температуре -70°C до тех пор, пока это необходимо (максимум 5 лет).

### 2.3.2. Процедура тестирования

Тестируемую сыворотку разводят в ФБР 1/30. Сыворотку можно использовать с термоинактивацией при температуре 56°C в течение 30 минут или без нее. На стеклах отмечают 8-10 делений, используя при этом масляную ручку, чтобы деления не размывались. В каждом квадрате 5-10 мкл разведения сыворотки капают на бумажный диск для фильтрации с использованием маленькой пипетки. Затем препараты инкубируют в течение 30 минут при температуре 37°C во влажной камере. Для контролей на каждый слайд помещают отрицательную и слабоположительную сыворотку (в том же самом 1/30 разведении).

После инкубации слайды споласкивают тонкой струей ФБР для того, чтобы удалить бумажные диски для фильтрации. Затем слайды погружают в лотки с ФБР на 10 минут, а затем в воду на десять минут. ФБР и воду циркулируют с использованием магнитной мешалки. Затем в каждый квадрат добавляют разведенные антитела антибычьего иммуноглобулина, меченные флуоресцеинизотиоцианатом. Соответствующее разведение основано на титровании каждой новой партии конъюгата, когда рабочий диапазон обычно составляет 1/400 –

1/1200. Конъюгированные кроличьи и куриные антитела обычно лучше подходят для этих целей, чем козьи антитела. Слайды с конъюгатом снова инкубируют при комнатной температуре в течение 30 минут и промывают указанным выше способом. Мокрые слайды накрывают покрывным стеклом в растворе, который содержит 1 часть глицерола и 1 часть ФБР и исследуют при помощи стандартной флуоресцентной микроскопии. Компетентный специалист может проводить исследование, приблизительно, 150 образцов в день.

#### 2.4. Реакция связывания комплемента

В некоторых странах реакцию связывания комплемента применяют с целью общей диагностики и квалификации скота для импорта. РСК не может идентифицировать всех инфицированных животных. Из-за низкой специфичности и чувствительности. Антиген для РСК готовят посредством экспериментального инфицирования КРС, что вызывает беспокойство с точки зрения благополучия животных; таким образом, по этой причине проведение РСК не следует продолжать и ее следует заменить серологическими исследованиями.

#### 2.5. Другие тесты:

В последние годы были описаны другие серологические тесты. Они включают дот-ИФА, слайд ИФА, реакцию латекс-агглютинации, реакцию агглютинации на карточке и иммунохроматографические методы тестирования (Kim *et al.*, 2008). Эти тесты демонстрируют приемлемые уровни чувствительности и специфичности к *B. Bovis* и, в случае с дот-ИФА ИХТ, и к *B. bigemina*. Однако, ни один из этих тестов, по всей видимости, не может быть адаптирован к использованию в плановой диагностике в лабораториях, где не осуществлялась первоначальная разработка и валидация. Адаптируемость этих тестов к плановой лабораторной диагностике должна быть оценена в будущем.

### С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

#### 1. Обоснование

У крупного рогатого скота вырабатывается длительный иммунитет после однократного заражения *B. bovis*, *B. divergens*, *B. bigemina*. Данное качество использовали в некоторых странах для иммунизации крупного рогатого скота против бабезиоза (Bock *et al.*, 2008; Mangold *et al.*, 1996; Ripano, 1997). Большинство этих живых вакцин содержат специально отобранные штаммы *Babesia*, в основном *B. bovis* и *B. bigemina*. Их производят на производственных объектах, находящихся на попечении государства, тем самым помогая промышленному животноводству, особенно, в Австралии, Аргентине, Южной Африке и Израиле. Некоторые другие страны могут сами производить вакцины в меньшем масштабе. Экспериментальную вакцину с *B. divergens*, изготовленную из крови инфицированных *Meriones*, успешно применяли в Ирландии (Zintl *et al.*, 2003).

Убитую вакцину с *B. divergens* также готовили из крови инфицированных телят (Zintl *et al.*, 2003), но информации относительно уровня и длительности переданного иммунитета мало. Также были разработаны другие экспериментальные вакцины, содержащие антигены *Babesia spp.*, полученные *in-vitro* (Montenegro-James *et al.*, 1992), но уровень и длительность защиты против гетерологичного штамма не ясны. Несмотря на характеристику различных белков паразитов и геномов *B. bovis* (Brayton *et al.*, 2007) и значительные усилия по всему миру, направленные на идентификацию подходящих вакцинных антигенов, перспективы использования рекомбинантных вакцин против *Babesia spp* остаются неясными (Brown *et al.*, 2006). На сегодняшний день эффективной субъединичной вакцины в наличие не имеется.

Руководство для производства ветеринарных вакцин дано в Главе 1.1.8 (Принципы производства ветеринарных вакцин). Руководство, представленное здесь, и Руководство в Главе 1.1.8 являются общими по характеру и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями.

Данный раздел будет посвящен производству живых вакцин против бабезиоза, в основном против инфекций *B. Bovis* и *B. bigemina* у крупного рогатого скота. Производство включает инфицирование телят отобранными штаммами и использование инфицированных эритроцитов в качестве вакцины (Bock *et al.*, 2008); или методов культивирования *in-vitro* для получения паразитов для вакцины (Mangold *et al.*, 1996). Телята, используемые для инфицирования данными штаммами или, если речь идет о методах *in-vitro*, используемые в качестве источника сыворотки и эритроцитов для культивирования, должны быть свободными от возбудителей инфекций, которые могут быть переданы через продукты, полученные из их крови. Если речь идет о *B. divergens*, вместо бычьей крови можно использовать кровь инфицированных песчанок (*Meriones unguiculatus*). Доказательства, подтверждающие, что изменения иммуногенности происходят при повторяющихся пассажах на телятах и возможный антигенный дрейф происходит во время длительного поддержания *B. bovis* в культуре, должны быть получены посредством уменьшения числа повторных пассажей или субкультур, полученных перед возвратом к консервированному посевному материалу вакцины. В то время как методы производства *in-vitro* имеют очевидные преимущества с точки зрения благополучия животных, вакцину так же можно успешно производить с использованием производственных систем *in-vivo* в соответствии с правилами обеспечения благополучия животных. В Аргентине по разрешению SENASA (Servicio Nacional de sanidad y Calidad Agroalimentaria, Национальная Служба Безопасности и Качества Сельскохозяйственной Продукции) успешно производится около 400 000 доз вакцины с использованием культуры *in-vitro*, а в Австралии по разрешению APVMA (Управление по Пестицидам и Ветеринарии) производится до 850 000 доз в год с использованием методов *in-vivo*.

Вакцины, содержащие *B. Bovis* и *B. bigemina* можно готовить как в замороженном, так и охлажденном виде в зависимости от потребности, транспортных сетей и наличия жидкого азота или сухого льда. Приготовление вакцины в замороженном виде (Bock *et al.*, 2008; Mangold *et al.*, 1996; Ripano, 1997) позволяет проводить тщательное пост-производственное тестирование каждой партии. Однако ее срок годности значительно

короче после оттаивания, ее производство гораздо дороже и ее значительно труднее транспортировать, чем вакцину в охлажденном виде. Из-за потенциального риска контаминации этих полученных из крови вакцин необходимо проводить контроль качества перед началом и после окончания ее производства, но в эндемичных регионах некоторых стран производство таких вакцин выходит за пределы финансовых возможностей.

## **2. Описание производства вакцины**

### **2.1. Характеристика посевного материала**

#### **2.1.1. Штаммы, имеющиеся в различных странах**

Аттенуированные австралийские штаммы *B. Bovis* и *B. Bigemina* успешно применялись для иммунизации крупного рогатого скота в Африке, Южной Америке и Юго-Восточной Азии (Bock *et al.*, 2008). Имеются в наличии передаваемые клещами и нетрансмиссивные штаммы. Также был разработан штамм *B. Divergens* со сниженной вирулентностью для песчанок (Zintl *et al.*, 2003).

#### **2.1.2. Выделение и очистка местных штаммов**

Штаммы *B. Bovis*, *B. Bigemina* и *B. Divergens* свободные от контаминантов, таких как *Anaplasma*, *Eperythrozoon*, *Theileria*, *Trypanosoma* и различные вирусные и бактериальные возбудители можно легко выделить посредством скармливания инфицированных клещей восприимчивому спленэктомированному крупному рогатому скоту. Векторы и способ передачи у различных видов являются разными, и данные характеристики могут быть использованы для разделения видов (Friedhoff & Bose, 1994).

*Babesia* spp. могут также быть выделены из инфицированного крупного рогатого скота посредством перевивки крови в восприимчивых спленэктомированных телят. Основным недостатком данного метода состоит в трудности отделения *Babesia* spp от таких контаминантов, как *Anaplasma* и *Eperythrozoon*. Выделение *B. divergens* является относительно простой процедурой из-за восприимчивости *Meriones* (Zintl *et al.*, 2003). Поддержание выделенных штаммов *in-vitro* (Jorgensen & Waldron, 1994) может применяться для устранения большинства контаминантов, но не для сепарации *Babesia* spp. Выборочная хемотерапия (например, 1% трипановый синий для искоренения *B. bigemina*) может быть использована для получения чистого *B. Bovis* из смешанной инфекции *Babesia*, в то время как быстрый пассаж на восприимчивых телятах позволит выделить *B. Bigemina*.

#### **2.1.3. Аттенюация штаммов**



Сообщалось о разных способах аттенюации *Babesia* spp. Самый надежный способ ослабления вирулентности *B. Bovis* включает быстрый пассаж штамма на восприимчивых спленэктомированных телятах. Аттенюация не гарантирована, но обычно она достигается после 8-20 пассажей на телятах (Bock *et al.*, 2008). Вирулентность *B. bigemina* ослабляется во время длительного нахождения паразита в латентно инфицированных животных. Данную характеристику можно использовать для получения авирулентных штаммов посредством инфицирования телят, извлечения селезенки через 6-12 недель после заражения и последующего использования паразитов с рецидивом для повторения процедуры (Bock *et al.*, 2008). Аттенюация *B. divergens* для *Meriones* следовала за длительным поддержанием *in-vitro* (Zintl *et al.*, 2003).

Были попытки аттенюировать *Babesia* spp. посредством облучения, но результаты были непостоянными. Подобным образом, поддержание *in-vitro* в модифицированной среде применялось экспериментально.

Авирулентные штаммы должны консервироваться для хранения с целью обеспечения безопасности тестирования и дальнейшего использования в качестве исходного штамма при производстве вакцины.

#### **2.1.4. Приготовление и хранение исходного штамма**

Авирулентные штаммы легко хранить в виде замороженной инфицированной крови в жидком азоте или сухом льде. Диметилсульфоксид (ДМСО) и поливинилпирролидон MW 40000 (Bock *et al.*, 2008) являются рекомендуемыми криоконсерваторами, так как после оттаивания производственного штамма они позволяют осуществлять внутривенное введение.

Для метода с использованием ДМСО инфицированную кровь отбирают и охлаждают до 4°C. Затем в конечную кровь при медленном помешивании добавляют криопротектор (4М ДМСО в ФБР): соотношение криопротектора 1:1 (конечная концентрация ДМСО – 2 М). Данная процедура разведения проводится в ледяной ванне. Разведенную кровь разливают в подходящие контейнеры (например, 5 мл криопробирки) и замораживают как можно быстрее в паровой фазе жидкого азота. Пробирки хранят в жидкой фазе в специальной емкости с целью предотвращения потери жизнеспособности и контаминации. При данном способе хранения *Babesia* spp. остаются жизнеспособными в течение 20 лет.

Было обнаружено, что в отличие от ДМСО нет необходимости работать с консервированными культурами, содержащими поливинилпирролидон в ледяной ванне (Standfast & Jorgensen, 1997).

Хранение до и после оттаивания при комнатной температуре не повлияло на инфекционность. Поливинилпиролон является сложным полимером, который не проникает в интактные клеточные мембраны. Он обладает низкой токсичностью для позвоночных и паразитов. Поливинилпиролон с консервированной культурой является инфекционным при внутривенном введении. Из поливинилпиролон с молекулярным весом 40 000 готовят 20% раствор с ФБР и стерилизуют в автоклаве. Кровь, отобранную у инфицированного теленка, медленно смешивают с равным объемом 20% поливинилпиролон в растворе ФБР для получения конечной концентрации 10% поливинилпиролон. Затем смесь разливают в 5мл криопробирки, замораживают в паровой фазе жидкого азота посредством охлаждения со скоростью 10°C в минуту в течение 15 минут и затем хранят в жидком азоте (Standfast & Jorgensen, 1997).

Культивирование *in-vitro* основано на методе стационарной фазы с использованием микроаэрофильных организмов (Levi & Ristic, 1980). Инфицированную авирулентными штаммами *B. Bovis* или *B. Bigemina* кровь отбирают у спленэктомированных телят и промывают в VYM фосфатном буферном солевом растворе (Vega *et al.*, 1985) для удаления плазмы и лейкоцитной пленки. VYM раствор состоит из CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (16,0 мг), KCl (400,0 мг), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1415,4 мг), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (154.0 мг), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O(1450 мг), NaCl (7077,0 мг) и декстрозы (20,5 г) в 1 литре бидистиллированной деионизированной воды, содержащей 0,25 мМ аденина и 0,50 мМ гуанозина. Затем в базальной среде для культуры, содержащей коммерческую среду M199 и сыворотку здорового КРС (60/40), готовят 5% суспензии инфицированных и неинфицированных эритроцитов. В базальную среду добавляют 18 мМ HEPES (4-[2-гидроксиэтил] пиперазин-1-этансульфоновую кислоту), 10мМ NaHCO<sub>2</sub>, 100 мкг/мл стрептомицин сульфат и 100 ед/мл пенициллин G. Суспензии с зараженными паразитами и нормальными эритроцитами смешивают (1/1), разливают в колбы для культур и инкубируют при атмосфере 90% N<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37°C. После 8-10 субкультур в колбах для культур разного размера, окончательные полные культуры вращают при 1200 г в течение 10 минут при 4°C и удаляют супернатант. Эритроцитную массу, зараженную эритроцитами, осторожно смешивают с равным объемом (1/1) 20% поливинилпиролон в VYM растворе и разливают в 2мл криопробирки. Зараженные паразитами эритроциты замораживают в паровой фазе жидкого азота посредством охлаждения при скорости 10°C в минуту в течение 15 минут и затем хранят в жидком азоте (Standfast & Jorgensen, 1997). Нормальную кровь, отобранную у КРС-донора и используемую в качестве источника сыворотки и незараженных эритроцитов для культуральной среды, дефибринируют при использовании шаров. Эритроциты промывают и хранят в течение

3 недели в VУМ растворе при температуре 4°C, а нормальную сыворотку хранения в замороженном виде при температуре -20°C до тех пор, пока ее не будут использовать.

#### **2.1.5. Приготовление и хранение рабочего посевного материала**

Рабочий посевной материал готовят тем же способом, что и производственный штамм (Раздел С.2.1) с использованием исходного штамма в качестве начального материала.

#### **2.1.6. Валидация безопасности и эффективности рабочего посевного материала**

Пригодность рабочего посевного материала определяют по повторяемости инфекционности у спленэктомированных телят или первоначальных культур и его безопасности и эффективности у неспленэктомированных телят. Повторяемость определяют посредством прививания восприимчивых спленэктомированных телят и наблюдения за развитием паразитов путем исследования окрашенных мазков крови. Препатентный период и период развития паразитов у телят должны совпадать, чтобы была возможность спланировать прививание с определенной степенью уверенности.

Флаконы с рабочим посевным материалом, приготовленные *in-vitro*, оттаивают путем погружения в подогретую до 40°C воду и разливают в культуральную среду. Процесс размножения *in-vitro* начинают с 5% суспензии эритроцитов, которую постепенно повышают до 10%. Рабочий посевной материал считают приемлемым, когда непрерывные культуры, полученные из него, достигают 8-12% эритроцитов, зараженных морфологически нормальными мерозоитами/трофозоитами после третьего субкультивирования и роста на воздухе при атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37°C.

Безопасность и эффективность вакцинного штамма определяют посредством введения в определенное количество взрослых крупных рогатых животных вакцины, приготовленной из эритроцитов телят, которым ввели штамм, или эритроцитов, полученных в результате процесса культивирования *in-vitro*. О безопасности можно судить в результате контроля температуры тела, паразитемии в окрашенных мазках крови и подавлением PCV после вакцинации. Эффективность определяют посредством контроля тех же показателей после введения вакцинированным животным гетерологичного штамма. Чистоту рабочего посевного материала тестируют посредством контроля животных, использованных в тестировании на безопасность, проводимого для обнаружения возможных контаминантов, или посредством тщательного тестирования телят, из которых была получена консервированная культура микроорганизмов (Смотри

Раздел С.2.2.3.). Крупных рогатых животных-доноров неинфицированной крови, используемой для культивирования *in-vitro*, содержат в изолированных загонах и за их состоянием здоровья тщательно следят.

## 2.2. Способ производства

### 2.2.1. Получение замороженного концентрата вакцины

Сначала рабочий посевной материал (5-10мл) быстро оттаивают посредством погружения флаконов в подогретую до 37°C воду. Оттаявший материал используют как можно скорее для заражения восприимчивого, спленектомированного теленка (свободного от потенциальных вакцинных контаминантов) посредством внутривенного введения. Если в качестве криоконсерванта используют ДМСО, то оттаявший рабочий посевной материал нужно держать на льду и вводить в течение 30 минут оттаивания.

Подходящую для вакцины кровь получают посредством контроля мазков яремной крови и отбора требуемого объема крови при достижении соответствующего уровня паразитемии. Уровень паразитемии, равный  $3.5 \times 10^8$ /мл для *B. Bovis* в яремной крови или  $3 \times 10^7$ /мл для *B. Bigemina* обычно является подходящим для получения замороженной вакцины. Если соответствующий уровень паразитемии для *B. Bovis* не получен, то может быть необходим пассаж штамма посредством перепрививки 100-800 мл крови во второго спленектомированного теленка. Не рекомендуется проводить пассаж *B. bigemina* на спленектомированных телятах, так как аттенуированный штамм может повысить вирулентность.

Кровь зараженного теленка-донора отбирают посредством канюлирования яремных вен с использованием в качестве антикоагулянта гепарина, не содержащего консерванта (5 ИЕ гепарин в 1мл крови).

В лаборатории зараженную паразитами кровь хранят при комнатной температуре и смешивают в равных объемах с 3М глицерола в ФБР с добавлением 5ММ глюкозы (итоговая концентрация глицерола в смеси крови равна 1.5 М), которую хранят при температуре 37°C. Затем смесь уравнивают в течение 30 минут при температуре 37°C и разливают в соответствующие контейнеры (например, 5 мл криофлаконы). Флаконы охлаждают при температуре приблизительно 10°C/мин в паровой фазе жидкого азота и после замораживания хранят в жидкой фазе (Vock *et al.*, 2008).

ДМСО можно использовать вместо глицерола в качестве криопротектора. При этом применяется та же процедура, что и при приготовлении исходного вируса (Pirano, 1997).

Когда подвергнутую глицеролизации замороженную вакцину разводят для использования в качестве вакцины, разбавитель должен быть изотоническим и содержать ФБР с 1,5М глицерола и 5 мМ глюкозы. Подобным образом разбавитель, используемый в вакцине, замороженной с ДМСО, должен быть изотоническим. Он должен иметь концентрацию ДМСО в ФБР равную концентрации ДМСО в концентрате вакцины.

Замороженную вакцину, содержащую *B. Bovis* и *B. Bigemina* можно приготовить путем смешивания равных объемов крови, содержащей каждого из паразитов и полученной от разных доноров (Mangold *et al.*, 1996). Тривалентную вакцину, содержащую эритроциты, инфицированные *B. bovis*, *B. bigemina* и *Anaplasma centrale* также производят в Австралии. Эритроциты трех доноров (один для каждого паразита) концентрируют путем центрифугирования и смешивают с раствором глицерола для получения трехвалентного концентрата, который оттаивают и смешивают с разбавителем до использования (Vock *et al.*, 2008).

Рекомендованная доза вакцины после восстановления и разведения равна 1-2 мл в зависимости от местных методик и требований. Но при этом задача состоит в получении минимальной инфицирующей дозы паразитов на основании паразитемии до замораживания.

#### 2.2.2. Получение охлажденной вакцины

Инфекционный материал, используемый в производстве охлажденной вакцины, получают тем же способом, который применяется при производстве замороженной вакцины. Но после отбора он должен быть приготовлен и использован как можно быстрее. Если необходимо получить максимальное количество доз на теленка, то инфекционный материал можно развести для того, чтобы получить требуемое количество паразитов на дозу (обычно от 2,5 до  $10 \times 10^6$ ). Подходящим разбавителем является 10% стерильная бычья сыворотка в сбалансированном соляном растворе, содержащем в 1 литре следующие ингредиенты: NaCl (7,00 г),  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (0,34 г), глюкоза (1,00 г),  $Na_2HPO_4$  (2,52 г),  $KH_2PO_2$  (0,90 г) и  $NaHCO_3$  (0,52 г).

Размножение *in-vitro* выполняют в 225 см<sup>2</sup> матрасах с культурой ткани, где 115 мл готовой культуральной среды разливают так, чтобы глубина составляла 5,0-5,2 мм. Девяносто мл супернатанта ежедневно заменяют свежей средой, а 50-75% зараженных паразитами эритроцитов каждые 48 часов заменяют неинфицированными эритроцитами (субкультура). Зараженные паразитами эритроциты, содержащие *Babesia spp.*, собирают, когда у паразитов наблюдается

типичная морфология и когда достигается максимальный уровень паразитемии внутри эритроцитов. Девяносто процентов основной среды удаляют из каждого матраса так, чтобы не нарушить осевшие эритроциты. Зараженные *Babesia* эритроциты, разведенные в оставшейся среде, затем смешивают с сбалансированным соляным раствором 1/1, сливают в одну бутылку и охлаждают до 5°C до использования. Растворы с каждым видом *Babesia* и с высокой концентрацией паразитов, разводят с таким же сбалансированным соляным раствором, обогащенным 10% бычьей сывороткой для получения концентрации эритроцитов, зараженных *B. bovis* - $10^7$  и *B. bigemina* - $10^7$  на 2мл дозу.

Там где есть обеспокоенность по поводу анаплазмоза, с целью повышения эффективности трехвалентной вакцины против *B. bovis*, *B. Bigemina* и *Anaplasma marginale* в вакцину добавляют *Anaplasma centrale*.

### 2.2.3. Контроль в процессе производства

#### i) **Источники и содержание доноров вакцин**

Необходимо идентифицировать источник доноров, свободных от естественных инфекций *B. babesia*, других болезней, передаваемых клещами, и других возбудителей инфекций, переносимых с кровью. Если подходящего источника нет, то может быть необходимым выращивать телят-доноров в свободных от клещей условиях специально для этой цели.

Телят-доноров необходимо содержать в условиях, когда риск контакта с инфекционными болезнями, клещами и кусающими насекомыми будет сведен к нулю. При отсутствии надлежащих помещений должен быть оценен риск контаминации возбудителями инфекционных болезней, имеющихся в стране. Необходимо взвесить выгоду от местного производства вакцины (по сравнению с импортом соответствующего продукта) и возможные негативные последствия распространения болезни (Vock *et al.*, 2008).

#### ii) **Операция**

У телят, которых будут использовать в качестве доноров, следует удалить селезенку для того, чтобы количество паразитов для получения вакцины было максимальным. Селезенку проще удалять у телят моложе 3 месяцев и лучше всего под общим наркозом.

#### iii) **Скрининг доноров вакцин перед инокуляцией**

Телят-доноров необходимо исследовать на наличие возбудителей всех превалентных в стране инфекций, передаваемых через кровь, включающих *Babesia*, *Anaplasma*, *Theileria*, *Eperythrozoon* и *Trypanosoma*. Это можно осуществить посредством планового исследования окрашенных мазков крови после спленэктомии, а также, что более предпочтительно, посредством проведения серологических тестов до и после карантина. Телят, проявляющих признаки естественного инфицирования любым из этих возбудителей, необходимо отбраковать или необходимо стерилизовать инфекции химическим способом. Кроме того должно быть подтверждено отсутствие других эндемичных в стране инфекционных возбудителей; они могут включать возбудителей энзоотического лейкоза КРС, вирус иммунодефицита КРС, пестивируса КРС, респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота, инфекционного бычьего ринотрахеита, болезни Акабане, вируса Айно, эфемерной лихорадки, блютанга, ящура, *Brucella Abortus*, *Leptospiraspp.*, гидроперикардита, болезни Джембрана, лихорадки долины Рифт, бешенства, нодулярного дерматита, контагиозной бычьей плевропневмонии и чумы. Процедуры тестирования будут зависеть от превалентных в стране болезней и доступности тестов, но должны включать серологию парных сывороток и, в некоторых случаях, выделение вируса или обнаружение антигена или ДНК (Bock *et al.*, 2008; Pipano, 1997).

iv) Контроль паразитемии после инокуляции

Необходимо определить концентрацию паразитов в крови, отобранной для производства вакцины или в эритроцитах, собранных в культуре. Существуют точные методики для определения точного количества паразитов, но концентрацию паразитов можно оценить с достаточной точностью на основании количества эритроцитов и паразитемии (% инфицированных эритроцитов).

v) Отбор крови для вакцины

Перед использованием все оборудование необходимо стерилизовать (например, при помощи автоклавирования). Когда достигнут требуемый уровень паразитемии, кровь собирают в гепарин, используя при этом строгие методы асептики. Наилучшим образом это можно осуществить, когда на телят воздействуют седативными средствами (например, ксилазином) и применяют замкнутую систему отбора.

У шестимесячного теленка можно отобрать до 3 литров сильно инфицированной крови. Если теленок должен остаться в живых, то предусматривается переливание такого же количества крови из подходящего донора (или крови, предварительно отобранной у самого донора). В противном случае теленка необходимо умертвить сразу же после отбора крови.

225 см<sup>2</sup> матрас может обеспечить 1800 дозами при использовании культивирования *in-vitro*. Начиная с одного 225 см<sup>2</sup> матраса, содержащего 11 мл 8-10% эритроцитов, зараженных паразитами, возможно собрать 45 000 доз через 6 дней постоянного роста.

vi) Розлив вакцины

Все процедуры выполняют в соответствующей обстановке, с использованием вытяжного шкафа с ламинарным потоком воздуха и стандартных стерильных методик. Использование механической или магнитной мешалки позволит обеспечить тщательное перемешивание инфицированных эритроцитов и разбавителя во время процесса розлива.

2.2.4. Контроль партии

Иммуногенность, безопасность и стерильность охлажденной вакцины невозможно определить иначе как посредством тщательного исследования доноров вакцины и соблюдения принципов хорошей практики производства. Спецификации замороженной вакцины зависят от стандартов практики, используемой в стране. Далее следуют спецификации для замороженных вакцин, произведенных в Австралии.

i) Стерильность и свобода от контаминации

Стандартные тесты на стерильность проводятся в отношении каждой партии вакцины и разбавителя. Отсутствие контаминантов определяют посредством проведения соответствующего серологического и молекулярного диагностического тестирования крупных рогатых животных доноров на наличие вирусной и бактериальной инфекции. Потенциальные контаминанты включают возбудителей, перечисленных в Разделе С.2.2.3.

2.2.4. Безопасность

Побочные реакции на вакцины крупных рогатых животных, инокулированных во время тестирования на иммуногенность,



можно контролировать посредством измерения уровня паразитемии, температуры и объема осаждённых эритроцитов; или посредством регулярного наблюдения за здоровьем и поведением вакцинированных животных. Детализированный мониторинг обычно имеет отношение к разработке и тестированию штаммов паразитов, которые являются потенциальными кандидатами для производства вакцины. К использованию допускаются только партии с уровнем патогенности равным или ниже предварительно установленного стандарта. Вакцину лучше применять на телятах моложе 1 года.

Нецелевые животные не являются предметом беспокойства. Некоторые аттенуированные вакцинные штаммы *B. Bovis* передаются клещами и как показывает опыт, они могут вернуть вирулентность после передачи клещами. В эндемических ситуациях это имеет небольшие последствия.

После применения вакцины периоды приостановки производства молока и мяса не требуются.

### iii) Иммуногенность

Концентрат замороженной глицеролизованной вакцины оттаивают и разводят 1/10 изотоническим разбавителем (Bock *et al.*, 2008; Ripano, 1997). Затем приготовленную вакцину хранят в течение 8 часов при температуре 4°C. От 5 до 25 восприимчивым крупным рогатым животным (которых содержат на территориях свободных от клещей) подкожно вводят 2мл дозу этой партии вакцины. Затем инокулированных КРС контролируют на наличие жизнеспособных инфекций *Babesia* spp посредством исследования окрашенных мазков крови с использованием методов ПЦР или по наличию признаков сероконверсии. К использованию в рабочем разведении 1/10 допускаются только партии с приемлемой инфекционностью. Ожидается, что более 95% вакцинированного крупного рогатого скота вырабатывает иммунитет к *Babesia* spp. после однократного введения соответствующей дозы ( $1 \times 10^7$  паразитов) охлажденной или замороженной вакцины, которую производят, хранят и транспортируют согласно соответствующим протоколам.

### iv) Длительность иммунитета

Длительный иммунитет обычно вырабатывается после однократной инокуляции. Защитный иммунитет развивается

через 3-4 недели и в большинстве случаев длится, по крайней мере, 4 года (Bock and de Vos., 2001). Имеются сообщения о неудачном применении вакцины против *B. Bovis* и они связаны с выбором вакцинного штамма, наличием гетерологичных полевых штаммов и факторами хозяев (Bock *et al.*, 2008). Существует мало свидетельств снижения иммунитета, связанного со временем (Bock & deVos, 2001).

v) Стабильность

Замороженную вакцину можно хранить в течение 5 лет в жидком азоте. Стерильный разбавитель можно хранить в течение 2 лет в холодильнике. Оттаявшая вакцина быстро теряет иммуногенность и не может быть разморожена еще раз.

vi) Консерванты

До розлива в криопробирки к концентрату вакцины добавляют бензилпенициллин (500 000 ИЕ/литр) и стрептомицин (370 000 мкг/литр). Консервант не применяется.

vii) Использование вакцины

Флаконы с замороженной вакциной нужно оттаивать посредством погружения в предварительно подогретую до 37°C воду. Глицеролизованную вакцину необходимо хранить в прохладном месте и использовать в течение 8 часов (Bock *et al.*, 2008), тогда как вакцину с ДМСО в качестве криопротектора нужно хранить на льду и использовать в течение 15-30 минут во время оттаивания (Pirano, 1997).

Охлажденные вакцины необходимо хранить в холодильнике и использовать в течение 4-7 дней после приготовления, в зависимости от жизнеспособности паразитов и рекомендаций предприятия, производящего вакцины.

Штаммы *B. bovis*, *B. divergens* и *B. bigemina*, используемые в вакцине, могут обладать сниженной вирулентностью, но тем не менее могут быть не полностью безопасными. Практической рекомендацией является ограничение применения вакцины на телятах моложе 1 года, когда неспецифический иммунитет минимизирует риск вакцинных реакций. Если необходимо вакцинировать животных более старшего возраста, существует больший риск возникновения реакций на вакцину. Эти реакции возникают не часто, но особое внимание необходимо уделять ценному племенному крупному рогатому скоту и беременным животным. Их нужно наблюдать ежедневно в течение 3 недель

после вакцинации. В идеале нужно мерить ректальную температуру вакцинированного животного и если поднимается температура, то необходимо провести лечение этих животных. Реакции на *B. bigemina* и *B. Divergens* обычно проявляются на 6-8 день, а на *B. Bovis* на 14-18 день (Bock *et al.*, 2008).

Вакцины против бабезиоза и анаплазмоза обычно применяют параллельно, но другие вакцины одновременно с этими лучше не применять (Bock *et al.*, 2008).

viii) Меры предосторожности

Вакцины против *B. Bovis* и *B. bigemina* не могут инфицировать человека. Однако у людей с удаленной селезенкой были зарегистрированы случаи *B. divergens*. Когда вакцину хранят в жидком азоте, то необходимо соблюдать обычные меры предосторожности, относящиеся к хранению, транспортировке и осуществлению манипуляций с жидким азотом и материалом, подвергнутым глубокой заморозке.

### 2.3. Требования к авторизации

Вопросы, касающиеся безопасности, иммуногенности, стабильности вакцинных штаммов, нецелевых видов и возврата к вирулентности, освещены в предыдущих главах. Вакцина используется только для контроля бабезиоза. Искоренение бабезиоза возможно только при искоренении вектора клещей и/или осуществлении интенсивного химиотерапевтического режима.

## 3. Вакцины, основанные на применении биотехнологий

В настоящее время нет вакцин, основанных на применении биотехнологий.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ANONYMOUS (2006). Complement fixation test for detection of antibodies to *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* – Microtitration test. United States Department of Agriculture (USDA), Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, USA.

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

BOCK R.E., DE VOS A.J. & MOLLOY J.B. (2006). Tick-borne diseases. In: Australian New Zealand Standard Diagnostic Procedures, Faragher J.T., ed. Subcommittee on Animal Health Laboratory Standards  
[http://www.scahls.org.au/\\_data/assets/pdf\\_file/0008/1280852/tick\\_borne\\_diseases.pdf](http://www.scahls.org.au/_data/assets/pdf_file/0008/1280852/tick_borne_diseases.pdf)

BOCK R., JACKSON L., DE VOS A.J. & JORGENSEN W. (2008). Babesiosis of cattle. In: *Ticks: Biology, Disease and Control*, Bowman A.S. & Nuttall P.A., eds. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 281–307.

BONO M.F., MANGOLD A.J., BARAVALLE M.E., VALENTINI B. S., THOMPSON C.S., WILKOWSKY S.E., ECHAIDE I.E., FARBER M.D. & TORIONI DE ECHAIDE S.M. (2008). Efficiency of a recombinant MSA-2c-based ELISA to establish the persistence of antibodies in cattle vaccinated with *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.*, 157, 203–210.

BOONCHIT S., XUAN X., YOKOYAMA N., GOFF W.L., WAGHELA S.D., WAGNER G. & IGARASHI I. (2006). Improved enzyme-linked immunosorbent assay using C-terminal truncated recombinant antigens of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein-1 for detection of specific antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 1601–1604.

BRAYTON K.A., LAU A.O.T., HERNDON D.R., HANNICK L., KAPPEMEYER L.S., BERENS S.J., BIDWELL S.L., BROWN W.C., CRABTREE J., FADROSH D., FELDBLUM T., FORBERGER H.A., HAAS B.J., HOWELL J.M., KHOURI H., KOO H., MANN D.J., NORIMINE, J., PAULSEN I.T., RADUNE D., REN Q., SMITH JR, R.K., SUAREZ C.E., WHITE O., WORTMAN J.R., KNOWLES JR, D.P., MCELWAIN T.F. & NENE V.M. (2007). Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. *PLoS Pathogens*, 3, 1401–1413.

BROWN W.C., NORIMINE J., KNOWLES D.P. & GOFF W.L. (2006). Immune control of *Babesia bovis* infection. *Vet. Parasitol.*, 138, 75–87.

BULING A., CRIADO-FORNELIO A., ASENZO G., BENITEZ D., BARBA-CARRETERO J.C. & FLORIN-CHRISTENSEN M. (2007). A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Vet. Parasitol.*, 147, 16–25.

CRIADO-FORNELIO A. (2007). A review of nucleic acid-based diagnostic tests for *Babesia* and *Theileria*, with emphasis on bovine piroplasms. *Parassitologia(Rome)*, 49, 39–44.

CRIADO-FORNELIO A., BULING A., ASENZO G., BENITEZ D., FLORIN-CHRISTENSEN M., GONZALEZ-OLIVA A., HENRIQUES G., SILVA M., ALONGI A.,

- AGNONE A., TORINA A. & MADRUGA C.R. (2009). Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids. *Vet. Parasitol.*, 162, 200–206.
- DOMINGUEZ M., ECHAIDE I., DE ECHAIDE S.T., WILKOWSKY S., ZABAL O., MOSQUEDA J.J., SCHNITTGER L. & FLORINCHRISTENSEN M. (2012). Validation and field evaluation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Babesia bovis* infections in Argentina. *Clin. Vaccine Immunol.*, 19, 924–928.
- FIGUEROA J.V., CHIEVES L.P., JOHNSON G.S. & BUENING G.M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet. Parasitol.*, 50, 69–81.
- FRIEDHOFF K. & BOSE R. (1994). Recent developments in diagnostics of some tick-borne diseases. In: *Use of Applicable Biotechnological Methods for Diagnosing Haemoparasites. Proceedings of the Expert Consultation, Merida, Mexico, 4–6 October 1993*, Uilenberg G., Permin A. & Hansen J.W., eds. Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 46–57.
- GOFF W.L., JOHNSON W.C., MOLLOY J.B., JORGENSEN W.K., WALDRON S.J., FIGUEROA J.V., MATTHEE O., ADAMS D.S., MCGUIRE T.C., PINO I., MOSQUEDA J., PALMER G. H., SUAREZ C.E., KNOWLES D.P. & MCELWAIN T.F. (2008). Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Babesia bigemina* antibodies in cattle. *Clin. Vac. Immunol.*, 15, 1316–1321
- GOFF W.L., MCELWAIN T.F., SUAREZ C.E., JOHNSON W.C., BROWN W.C., NORIMINE J. & KNOWLES D. P. (2003). Competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on a rhoptry-associated protein 1 epitope specifically identifies *Babesia bovis*-infected cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 10, 38–43.
- GOFF W.L., MOLLOY J.B., JOHNSON W.C., SUAREZ C.E., PINO I., RHALERN A., SAHIBI H., CECI L., CARELLI G., ADARNS D.S., MCGUIRE T.C., KNOWLES D.P. & MCELWAIN T.F. (2006). Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Babesia bovis*. *Clin. Vac. Immunol.*, 13, 1212–1216
- HOLMAN P.J., WALDRUP K.A., DROLESKEY R.E., CORRIER D.E. & WAGNER G.G. (1993). In vitro growth of *Babesia bovis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) erythrocytes. *J. Parasitol.*, 79, 233–237.
- ISEKI H., ALHASSAN A., OHTA N., THEKISOE O.M., YOKOYAMA N., INOUE N., NAMBOTA A., YASUDA J. & IGARASHI I. (2007). Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *J. Microbiol. Methods*, 271, 281–287.
- JORGENSEN W.K. & WALDRON N S.J. (1994). Use of in vitro culture to isolate *Babesia bovis* from *Theileria buffeli*, *Eperythrozoon wenyonii* and *Anaplasma* spp. *Vet. Parasitol.*, 53, 45–51.

- KIM C.M., BLANCO L.B.C., ALHASSAN A., ISEKI H., YOKOYAMA N., XUAN X. & IGARASHI I. (2008). Development of a rapid immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of bovine babesioses caused by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78, 117–121.
- LEVY M.G. & RISTIC M. (1980). *Babesia bovis*: continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture. *Science*, 207, 1218–1220.
- LIU A., GUAN G., DU P., GOU H., LIU Z., LIU J., MA M., YANG J., LI Y., NIU Q., REN Q., BAI Q., YIN H. & LUO J. (2012). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method based on two species-specific primer sets for the rapid identification of Chinese *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol. Int.*, 61, 658–663.
- MANGOLD A.J., VANZINI V.R., ECHAIDE I.E., DE ESCHAIDE S.T., VOLPOGNI M.M. & GUGLIELMONE A.A. (1996). Viability after thawing and dilution of simultaneously cryopreserved vaccinal *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* strains cultured in vitro. *Vet. Parasit.*, 61, 345–348.
- MOLLOY J.B., BOWLES P.M., BOCK R.E., TURTON J.A., KATSANDE T.C., KATENDE J.M., MABIKACHECHE L.G., WALDRON S.J., BLIGHT G.W. & DALGLIESH R.J. (1998). Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bovis* in cattle in Australia and Zimbabwe. *Prev. Vet. Med.*, 33, 59–67.
- MONTENEGRO-JAMES S., TORO M. & GUILLEN A.T. (1992). Field evaluation of an exoantigen-containing *Babesia* vaccine in Venezuela. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 87, Supplement III, 283–288.
- PIPANO E. (1997). Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance. *Trop. Anim. Health Prod.*, 29 (Suppl.), S86–S90.
- SIVAKUMAR T., ALTANGEREL K., BATTSETSEG B., BATTUR B., ABOULAILA M., MUNKHJARGAL T., YOSHINARI T., YOKOYAMA N. & IGARASHI I. (2012). Genetic detection of *Babesia bigemina* from Mongolian cattle using apical membrane antigen-1 gene based PCR assay. *Vet. Parasitol.*, 187, 17–22.
- STANDFAST N.F. & JORGENSEN W.K. (1997). Comparison of the infectivity of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma centrale* for cattle after cryopreservation in either dimethylsulphoxide (DMSO) or polyvinylpyrrolidone (PVP). *Aust. Vet. J.*, 75, 62–63.
- VEGA C.A., BUENING G.M., GREEN T.J. & CARSON C.A. (1985). In vitro cultivation of *Babesia bigemina*. *Am. J. Vet. Res.*, 46, 416–420.
- WALTISBUHL D.J., GOODGER B.V., WRIGHT I.G., COMMINS M.A. & MAHONEY D.F. (1987). An enzyme linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. *Parasitol. Res.*, 73, 126–131.
- ZINTL A., MULCAHY G., SKERRETT H.E., TAYLOR S.M. & GRAY J.S. (2003). *Babesia divergens*: A Bovine Blood Parasite of Veterinary and Zoonotic Importance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16, 622–636.

**NB:** Референтные лаборатории МЭБ по бабезиозу КРС

(Новый список МЭБ можно увидеть в Таблице в Части 4 данного Руководства по наземным животным или на веб-сайте МЭБ:

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

Для получения дальнейшей информации о диагностических тестах, реагентах и вакцинах против бешенства свяжитесь с референтными лабораториями МЭБ.