

Оценка иммуногенности и содержания антигена *A. ovis* экспериментального образца адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины против анаплазмоза овец

Роман Витальевич Глушаков

ООО «ЕвроПак»

Адрес: 115088, город Москва, 3-Й Угрешский проезд, дом 8 строение 9

E-mail: roman_nv@mail.ru

Иван Александрович Василенко

ООО «ЕвроПак»

Адрес: 115088, город Москва, 3-Й Угрешский проезд, дом 8 строение 9

E-mail: zhannadark@mail.ru

Алексей Алексеевич Донских

ООО «ЕвроПак»

Адрес: 115088, город Москва, 3-Й Угрешский проезд, дом 8 строение 9

E-mail: alex.a.donskih@gmail.com

Михаил Павлович Щетинин

ФГБОУ ВО «МГУПП»

Адрес: 125371, город Москва, Волоколамское шоссе, 11

E-mail: shchetininmihail@mgupp.ru

Анаплазмоз овец – кровепаразитарная трансмиссивная болезнь, вызываемая эндоглобулярным внутриэритроцитарным паразитом *Anaplasma*. Основные признаки анаплазмоза – анемия, исхудание, потеря продуктивности и нарушение воспроизводительной функции животных. Перспективным для профилактики анаплазмоза овец является вакцинация их адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакциной. Проведенные исследования позволили оценить иммуногенность экспериментального образца вакцины, изготовленной с использованием препаратов смешанных культур лейкоцитов от иммунизированных животных, и содержание антигена *A. ovis* с помощью ПЦР. Сравнение экспериментальных образцов культурально-клеточной вакцины до и после хранения по показателям иммуногенности и содержанию антигена *A. ovis* с экстраполяцией степени спонтанной инактивации вакцины с реальной длительностью хранения сроком 1 год показало, что вышеуказанные показатели не ухудшились.

Ключевые слова: анаплазмоз овец, *Anaplasma ovis*, вакцинация, вакцина

Введение

Анаплазмоз овец – кровепаразитарная трансмиссивная болезнь, вызываемая эндоглобулярным внутриэритроцитарным паразитом *Anaplasma ovis* Lestoguard, 1924 (порядок Rickettsiales, семейство Anaplasmataceae). Основные признаки анаплазмоза – анемия, исхудание, потеря продуктивно-

сти и нарушение воспроизводительной функции животных. Патологическая картина при анаплазмозе связана с разрушением эритроцитов и нарушением эритропоэза. Степень зараженности эритроцитов, как правило, колеблется в диапазоне 3–40%, но может достигать 80%. Анаплазмоз наносит овцеводству значительный экономический ущерб. Основная эпизоотическая роль в распро-

странении анаплазма овец принадлежит треххозянному клещу *Dermacentor marginatus*, который весной, с первых дней выхода животных на пастбище, а также в третьей декаде августа и до конца октября нападает на них в стадии имаго (Кошкина, Чвалун, Колесников, Мишенина, 2007, с. 59; Кошкина, Колесников, Горячая, 2007, с. 79–83). Поэтому изыскание мер профилактики анаплазма овец, а именно создание вакцины, является актуальным.

Согласно «Инструкции по борьбе с анаплазмозом крупного и мелкого рогатого скота»¹ в целях предупреждения заноса анаплазма в хозяйство необходимо: не допускать ввода в организацию (хозяйство, ферму, отделение) больных анаплазмозом животных; систематически проводить борьбу с клещами на животных, особенно в ранневесенний, летний и осенний периоды; не менее 3–4 раз в год проводить дезинсекцию помещений, дворов, загонов и стоянок животных; уничтожать клещей-переносчиков на пастбищах путем проведения агромероприятий и использования ядохимикатов в соответствии с действующими наставлениями по их применению. При установлении заболевания животных анаплазмозом на неблагополучную организацию (хозяйство, ферму, отару) накладывают ограничения и проводят следующие мероприятия: больных животных отделяют от здорового поголовья, лечат антибиотиками тетрациклинового ряда в соответствии с наставлениями по их применению; всех малоценных, переболевших анаплазмозом животных выбраковывают. Все вышеуказанные мероприятия приводят к существенным экономическим затратам хозяйства. Поэтому появление вакцины против анаплазмоза могло бы решить эти проблемы и было бы перспективным.

Исследования ученых в мире по созданию вакцин шли двумя путями: 1) с применением живых возбудителей (аттенуированные возбудители, возбудитель в минимальной заражающей дозе, малопатогенный – *A. centrale*); 2) с применением инактивированного возбудителя (адъювантные вакцины). Оказалось, однако, что применение для вакцинопрофилактики аттенуированного возбудителя приводит быстро к риверсии биологических свойств и его широкому в последующем распространению в природе. *A. centrale* же, считавшаяся ранее малопатогенной, оказалось патогенной для молодых (6–8 мес.) животных. Перспективнее в такой си-

туации создание адъювантных (инактивированных) вакцин, в качестве адъювантов использованы полный и неполный адъювант Фрейнда, ланолин, минеральные масла (Казаков, 2003, с. 124–128).

Также была показана возможность использования популяции *A. marginale*, выделенной из культуры клеток клеща, в качестве иммуногена для иммунизации голштинских телят. Авторы заключили, что популяция *A. marginale*, полученная из культуры клеток клещей, является перспективной для использования в качестве антигена при разработке более эффективной убитой вакцины против анаплазмоза (Демидова, 2005, с. 160–161; Kocan, Halbur, Blouin, Onet, la Fuente, Garcia-Garcia, Saliki, 2001, с. 151–161).

В ВИЭВ в результате исследований В.Т. Заблоцкого, А.А. Казакова (2003), О.Е. Мальцевой (2004) и В.Т. Заблоцкого, Н.А. Казакова, З.П. Мутузкиной² (2008) была разработана инактивированная эмульгированная вакцина против анаплазмоза крупного рогатого скота, которая используется также и для профилактики анаплазмоза мелкого рогатого скота в связи с тем, что *A. ovis* и *A. marginale* имеют общие антигенные детерминанты (Мальцева, 1998, с. 87–90; Заблоцкий, Казаков, 2003, с. 134–139; Мальцева, 2004).

В США используют живые вакцины, содержащие затухаемые или менее патогенные штаммы *A. marginale* или *A. centrale*, для борьбы с клиническим анаплазмозом (Rogers, Dimmock, de Vos, Rodwell, 1988, с. 285–287). Эти вакцины основаны на принципе иммунитета, при котором устойчивость к повторной инфекции совпадает с сохранением первоначальной инфекции. У крупного рогатого скота, вакцинированного живой вакциной, развиваются стойкие инфекции, которые вызывают пожизненный защитный иммунитет у крупного рогатого скота, так что ревакцинация не требуется (Shkap, Leibovitz, Krigel, Molad, Fish, Mazuz, Fleiderovitz, Savitsky, 2008, с. 277–284). Хотя в целом использование живых вакцин не является законным в США, в настоящее время не существует одобренных Министерством сельского хозяйства США вакцин для защиты от анаплазмоза или снижения тяжести заболевания. Экспериментальная убитая вакцина доступна в 14 штатах США, но нет данных об эффективности этой вакцины (Aubry, Geale, 2011, с. 1–30). Инактивирован-

¹ Инструкция по борьбе с анаплазмозом крупного и мелкого рогатого скота // Ветеринарное законодательство / под общей ред. А.Д. Третьякова. М.: Изд-во «Колос», 1973. Т. 1. С. 366–367.

² Способ изготовления антигена для приготовления вакцины против анаплазмоза крупного и мелкого рогатого скота, способ изготовления вакцины против анаплазмоза, вакцина против анаплазмоза и способ профилактики анаплазмоза крупного и мелкого рогатого скота: пат. 2337706 Рос. Федерация. МПКА61K39/00 / Казаков Н.А., Заблоцкий В.Т., Мутузкина З.П.; опубли. 10.10.2008.

ные вакцины, содержащие очищенные *A. marginale* из эритроцитов являются дорогостоящими в производстве, может иметь потенциал, чтобы вызвать эритролиз после повторного введения, имеют неизвестную эффективность против гетерологичных штаммов, и обычно, требуют ежегодной ревакцинации (Kocan, de la Fuente, Guglielmo, Meléndez 2003, с. 698–712).

Исследование, проведенное Andrew K. Curtis с соавторами (Curtis, Reif, Kleinhenz, Martin, Skinner, Kelly, Jones, Schaut, Reppert, Montgomery, Narasimhan, Anantat, Jaber-Douraki, Coetzee, 2020) показало эффективность набора ушных имплантатов вакцины s.c., которые устанавливались на 21 месяц до начала болезни. В будущем работа может также установить оптимальную адъювантную концентрацию для того, чтобы достичь высокой иммуногенности без отторжения имплантата.

Consuelo Almazán с соавторами (Almazán, Šimo, Fourniol, Rakotobe, Borneres, Cote, Peltier, Mayé, Versillé, Richardson, Bonnet, 2020, p. 1–16) были разработаны синтетические пептидные вакцины для иннервирования нейропептидов слюнных желез *Ixodes ricinus*, которые были протестированы на защитный иммунитет против нимф или личинок, инфицированных *Anaplasma phagocytophilum* у мышей и овец, соответственно.

Несмотря на изыскания ученых в настоящее время не выпускается эффективная вакцина против анаплазмоза мелкого рогатого скота. Поэтому ее производство было бы актуальным. Так как по данным литературы в связи с изменением климата в последние два года на территории Северо-Кавказского и Южного федеральных округов наблюдается резкое увеличение заболеваемости мелкого рогатого скота анаплазмозом (Логвинов, Тохов, Луцук, 2014, с. 115–117). Ранее летальные исходы от анаплазмоза овец в острой фазе встречались в виде исключений, однако в последние годы отмечают неуклонное повышение смертности инфицированных животных, достигающее до 80%. Гибель животных обусловлена анемией и анорексией (Логвинов, Михайленко, Луцук, 2013, с. 142–145).

По данным департамента животноводства и племенного дела Минсельхоза РФ, в настоящее время поголовье овец в РФ превышает 24 млн. голов.

Очевидно, что наличие эффективной отечественной технологии производства вакцины против анаплазмоза на основе перевиваемой культуры клеток позволит в короткий срок произвести и испытать новую вакцину, не создавая риска распространения

инфекционного агента. Реализация целей такой работы способно внести вклад в повышение конкурентоспособности отечественных производителей ветеринарных вакцин, будет способствовать повышению эффективности отечественного овцеводства.

В связи с изложенным, целью работы был контроль качества вакцины, созданной на перевиваемой клеточной линии клеща *D. marginatus*, несущего *A. ovis* в качестве стабильно передаваемого по наследству внутриклеточного паразита и оценка иммуногенности экспериментального образца адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины, изготовленной согласно Лабораторному технологическому регламенту от «11» июня 2019 г. с использованием препаратов смешанных культур лейкоцитов от иммунизированных животных в соответствии с требованиями Лабораторной методики оценки иммуногенной активности препарата клеточной культуры.

В данной статье представлены данные литературы по разработанности вакцин против анаплазмоза мелкого рогатого скота и контроль качества разработанной нами вакцины после определенных условий ее хранения.

Цели исследования. Целью научно-исследовательской работы являлась разработка и предварительная (частичная) валидация методики хранения экспериментального образца адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины против *Anaplasma ovis*, изготовленной с использованием препаратов смешанных культур лейкоцитов от иммунизированных животных в соответствии с требованиями Лабораторной методики оценки иммуногенной активности препарата клеточной культуры.

Литературный обзор

Гранулоцитарный анаплазмоз у сельскохозяйственных животных известен достаточно давно. Первые упоминания о «клещевой лихорадке» коз, овец и телят относятся к 1780 году (Schnabel, 1912; Grøva, 2011). В 1932 году это заболевание было описано у овец в Шотландии (Gordon, Brownlee, Wilson, Macleod, 1932, p. 301–307). В 1940 году в моноцитах и гранулоцитах больных овец был выявлен возбудитель, названный *Ehrlichia phagocytophila* (Gordon, Brownlee, Wilson, 1940, p. 362–363; Woldehivet, 1983, p. 163–175). В 50–70-х годах «пастбищная лихорадка», причиной которой являлась *E. phagocytophila*, была описана у крупного рогатого скота и овец в Англии (Hudson, 1950, p. 3–17; Woldehivet, 1983, p. 163–175), Ирлан-

дии (Collins, Hannan, Ferguson, 1970, p. 162–164; Nair, Cheng, Ganta C.K., Sanderson, Alleman, Munderloh, Ganta R.R., 2016, p. 1–21; Woldehivet, 2010, p. 108–122) и Финляндии (Tuomi, 1967, p. 429–445; Woldehivet, 1983, p. 163–175). В 1994 году в США был открыт гранулоцитарный анаплазмоз человека, описанный под названием «гранулоцитарный эрлихиоз человека» (Chen, Dumler, Bakken, Walker, 1994, p. 589–595). Обнаружение того факта, что причиной ГАЧ является возбудитель, близко родственный возбудителю «клещевой лихорадки» жвачных, а также уникальная способность этих микроорганизмов поражать нейтрофилы и размножаться в них вновь вызвали повышение научного интереса, результатом чего стало появления большого количества информации об их молекулярной биологии и патобиологии (Woldehivet, 2010, p. 108–122). Кульминацией стало обозначение трёх видов как 12 вариантов единого вида *Anaplasma phagocytophilum* (Dumler, Barbet, Bekker, Dasch, Palmer, Ray, Rikihisa, Rurangirwa, 2001, p. 2145–2165), основанное на их генетическом и антигенном родстве, тропности к нейтрофилам и сходной морфологии.

Наиболее важным фактором передачи анаплазм являются иксодовые клещи рода *Ixodes* и *Dermacentor*. В Европе основными природными резервуарами для анаплазм служат рыжая лесная полевка, желтогорлая мышь, обыкновенная бурозубка, а также косуля и благородный олень (Diniz, Breitschwerdt, 2012, p. 244–254). Зараженность полевков на территории Западной Сибири составила 38,9% (Rar, Epikhina, Yakimenko, Malkova, Tancev, Bondarenko, Ivanov, Tikunova, 2014, p. 854–863). Помимо наземных млекопитающих, важную роль в распространении инфицированных клещей могут играть птицы (Bjöersdorff, Bergström, Massung, Haemig, Olsen, 2001, p. 877–879).

Радикальная профилактика, включающая борьбу с переносчиками, дорогостоящая и сложная, а в ряде случаев трудновыполнимая (Никольский, Глухов, 1956, с. 49–56). Лечение ограничено единственно эффективными тетрациклинами. Поэтому естественным было стремление протозоологов создать специфические средства борьбы с анаплазмозом. С этой целью в первую очередь использовали для крупного рогатого скота: инъекции живых возбудителей *A. marginale*, либо аттенуированных, либо малопатогенных штаммов. Как показала практика, применение аттенуированных штаммов анаплазм часто сопровождалось риверсией к исходным биологическим свойствам и, соответственно, к значительному распространению болезни (Казаков, 2003, с. 124–128; Георгиу, 2013, с. 30–34). Второй путь заключался в использовании инактивированных возбудителей (*A. marginale*, *A. ovis*).

Исследования ученых в мире по созданию вакцин шли двумя путями: 1) с применением живых возбудителей (аттенуированные возбудители, возбудитель в минимальной заражающей дозе, малопатогенный – *A. centrale*); 2) с применением инактивированного возбудителя (адъювантные вакцины). Оказалось, однако, что применение для вакцинопрофилактики аттенуированного возбудителя приводит быстро к риверсии биологических свойств и его широкому в последующем распространению в природе. *A. centrale* же, считавшаяся ранее малопатогенной, оказалось патогенной для молодых (6–8 мес.) животных. Перспективнее в такой ситуации создание адъювантных (инактивированных) вакцин, в качестве адъювантов использованы полный и неполный адъювант Фрейнда, ланолин, минеральные масла (Казаков, 2003, с. 124–128).

Также была показана возможность использования популяции *A. marginale*, выделенной из культуры клеток клеща, в качестве иммуногена для иммунизации 11 годовалых голштинских телят, а 11 телят служили контролем для контакта с иммунизированными животными. Дополнительно 10 телят иммунизировали антигеном *A. marginale*, полученным из эритроцитов. Каждая доза вакцины содержала примерно 2×10^{10} *A. marginale* с масляным адъювантом. 2 иммунизации были выполнены подкожно с интервалом в 4 нед., а через 10 недель после 2-й иммунизации животным инъецировали зараженную *A. marginale* кровь. Максимальные титры антител были выявлены через 2 недели после последней иммунизации, они были выше ($P < 0,01$) в группе животных, иммунизированных антигенами из инфицированной культуры клеток по сравнению с группой, вакцинированной антигенами из эритроцитов. У скота, естественно инфицированного *A. marginale*, вырабатывались антитела к обоим антигенам. У животных, иммунизированных антигеном из культуры клеток, и неиммунизированных после контрольного заражения отмечено существенное различие в значениях гематокрита $25,8 \pm 5,9\%$ против $34,7 \pm 10,8\%$ ($P < 0,05$) соответственно, при этом у опытных животных не отмечали клинического анаплазмоза. Авторы заключили, что популяция *A. marginale*, полученная из культуры клеток клещей, является перспективной для использования в качестве антигена при разработке более эффективной убитой вакцины против анаплазмоза (Демидова, 2005, с. 160–161; Kocan, 2001, p. 151–161).

В ВИЭВ в результате исследований В.Т. Заблоцкого, А.А. Казакова (2003), О.Е. Мальцевой (2004) и В.Т. Заблоцкого, Н.А. Казакова, З.П. Мутузкиной (2008) была разработана инактивированная эмульгированная вакцина против анаплазмоза крупно-

го рогатого скота, которая используется также и для профилактики анаплазмоза мелкого рогатого скота в связи с тем, что *A. ovis* и *A. marginale* имеют общие антигенные детерминанты (Мальцева, 1998, с. 87–90; Заблочкий, Казаков, 2003, с. 134–139). Этому предшествовала работа по изучению вирулентных и иммуногенных свойств штаммов анаплазм, выделенных в различных регионах страны. При этом была установлена иммунологическая идентичность изучаемых штаммов возбудителя *A. marginale* (Кадомского, Калининградского, Ставропольского и др.), что позволило готовить вакцину для всей страны из одного штамма возбудителя.

Испытание вакцины в экспериментальных и производственных условиях на крупном рогатом скоте различных пород в возрасте от 2 месяцев и старше показало, что она безвредна, слабореактогенна и высокоиммуногенна. Защищает 85 % привитых животных от клинически выраженного заболевания анаплазмозом. Вакцину вводят подкожно двукратно с интервалом 45 дней. Иммунитет формируется к 45-му дню после ревакцинации и сохраняется в течение 12 месяцев.

О.Е. Мальцевой (2004) была изучена специфичность и напряженность иммунитета при анаплазмозе в зависимости от адъюванта вакцины (смесь из безводного ланолина и легкого минерального масла) Были проведены производственные испытания опытной серии инактивированной эмульгированной вакцины из антигена *A. marginale* на основе универсального адъюванта (ВНИИЗЖ) на крупном рогатом скоте и овцах.

Изучение эффективности и реактогенных свойств опытной серии вакцины против анаплазмоза осуществляли после проверки на стерильность и безвредность. Убедившись, что вакцина не контаминирована бактериальной микрофлорой и безвредна для белых мышей, использовали её для экспериментального испытания на подопытных животных.

Экспериментальные и производственные испытания опытной серии инактивированной эмульгированной вакцины на основе адъюванта (ВНИИЗЖ) на эффективность и реактогенность на молодняке крупного рогатого скота в Гиссарской долине Республики Таджикистан показали, что она в дозах 0,2 мл внутрикожно и 1–2 мл подкожно оказалась реактогенной в дозе 0,2 мл, слабо реактогенной в дозе 1 мл и умеренно реактогенной в дозе 2 мл. Вакцина оказалась слабоэффективной в дозе 0,2 мл и высоко эффективной в дозах 1 и 2 мл и умеренно реактогенной в дозе 1 мл подкожно (Рахимов, 2011).

По данным зарубежных исследований, иммунизация лабораторных мышей против адгезин-связывающих доменов *Anaplasma phagocytophilum* обеспечивает защиту от инфекции (Naimi, Gumpf, Green, Izac, Zellner, Conrad, Marconi, Martin, Carlyon, Palmer, 2020, p.1–36.). Последующее исследование подтвердило, что иммунизация только против связывающего домена AirA или Asp14 была достаточной для снижения бактериальной нагрузки периферической крови у мышей после вызова и выявления антител, ингибирующих клеточную инфекцию *A. phagocytophilum in vitro*.

В США используют живые вакцины, содержащие затухаемые или менее патогенные штаммы *A. marginale* или *A. centrale*, для борьбы с клиническим анаплазмозом (Rogers, Dimmock, de Vos, Rodwell, 1988, p. 285–287). Эти вакцины основаны на принципе иммунитета, при котором устойчивость к повторной инфекции совпадает с сохранением первоначальной инфекции. У крупного рогатого скота, вакцинированного живой вакциной, развиваются стойкие инфекции, которые вызывают пожизненный защитный иммунитет у крупного рогатого скота, так что ревакцинация не требуется (Shkap, Leibovitz, Krigel, Molad, Fish, Mazuz, Fleiderovitz, Savitsky I, 2008, p. 277–284). Хотя в целом использование живых вакцин не является законным в США, в настоящее время не существует одобренных Министерством сельского хозяйства США вакцин для защиты от анаплазмоза или снижения тяжести заболевания. Экспериментальная убитая вакцина доступна в 14 штатах США, но нет данных об эффективности этой вакцины (Aubry, Geale, 2011, p. 1–30). Инактивированные вакцины, содержащие очищенные *A. marginale* из эритроцитов являются дорогостоящими в производстве, может иметь потенциал, чтобы вызвать эритролиз после повторного введения, имеют неизвестную эффективность против гетерологичных штаммов, и обычно, требуют ежегодной ревакцинации (Kocan, de la Fuente, Guglielme, Meléndez, 2003, p. 698–712).

Исследование, проведенное Andrew K. Curtis с соавторами (2020) показало эффективность набора ушных имплантатов вакцины s.c., которые устанавливались на 21 месяц до начала болезни. В будущем работа может также установить оптимальную адъювантную концентрацию для того, чтобы достичь высокой иммуногенности без отторжения имплантата.

Consuelo Almazán с соавт. (2020) были разработаны синтетические пептидные вакцины для иннервирования нейропептидов слюнных желез *Ixodes ricinus*, которые были протестированы на защит-

ный иммунитет против нимф или личинок, инфицированных *Anaplasma phagocytophilum* у мышей и овец, соответственно.

В связи с изменением климата в последние два года на территории Северо-Кавказского и Южного федеральных округов наблюдается резкое увеличение заболеваемости мелкого рогатого скота анаплазмозом овец (Логвинов, Тохов, Луцук, 2014, с. 115–117). Ранее летальные исходы от анаплазмоза овец в острой фазе встречались в виде исключений, однако в последние отмечают неуклонное повышение смертности инфицированных животных, доходящее до 80%. Гибель животных обусловлена анемией и анорексией (Логвинов, Михайленко, Луцук, 2013, с. 142–145).

По данным департамента животноводства и племенного дела Минсельхоза РФ, в настоящее время поголовье овец в РФ превышает 24 млн. голов.

Очевидно, что наличие эффективной отечественной технологии производства вакцины против анаплазмоза на основе перевиваемой культуры клеток позволит в короткий срок произвести и испытать новую вакцину, не создавая риска распространения инфекционного агента. Реализация целей такой работы способно внести вклад в повышение конкурентоспособности отечественных производителей ветеринарных вакцин, будет способствовать повышению эффективности отечественного овцеводства. В связи с изложенным, целью работы был контроль качества вакцины, созданной на перевиваемой клеточной линии клеща *D. marginatus*, несущего *A. ovis* в качестве стабильно передаваемого по наследству внутриклеточного паразита и оценка иммуногенности экспериментального образца адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины, изготовленной согласно Лабораторному технологическому регламенту от «11» июня 2019 г. с использованием препаратов смешанных культур лейкоцитов от иммунизированных животных в соответствии с требованиями Лабораторной методики оценки иммуногенной активности препарата клеточной культуры.

Теоретическое обоснование

Методика хранения экспериментального образца вакцинной субстанции предназначена для обе-

спечения надлежащего хранения полученного опытного экспериментального образца культурально-клеточной вакцины - вакцинной субстанции, необходимой для производства готовой формы инактивированной культурально-клеточной вакцины против анаплазмоза овец *A. ovis* в условиях опытно-промышленного производства.

Методика должна устанавливать требования к помещениям для хранения культурально-клеточной вакцины против анаплазмоза овец, регламентировать условия хранения культурально-клеточной вакцины и распространяться на производителей культурально-клеточной вакцины, организации оптовой торговли, аптечные организации, медицинские и иные организации, осуществляющие деятельность при обращении лекарственных средств, индивидуальных предпринимателей, имеющих лицензию на фармацевтическую деятельность или лицензию на медицинскую деятельность.

Данная методика была разработана с учетом того, что российское законодательство не содержит понятия «ветеринарные препараты». В Законе РФ от 14 мая 1993 г. № 4979–1 «О ветеринарии»³ используется термин «лекарственные средства для животных». Поэтому основным документом, регулирующим отношения по реализации лекарственных средств, в том числе предназначенных для животных, является Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»⁴ (в редакции Федерального закона от 29 ноября 2010 г. № 313-ФЗ, действующей с 1 января 2011 года). Об этом свидетельствуют и нормы Классификатора продукции ОК 005–93 (утвержден постановлением Госстандарта России от 30 декабря 1993 г. №301). В нем ветеринарные препараты входят в группу «Медикаменты, химико-фармацевтическая продукция и продукция медицинского назначения» (код 93 0000).

Выполнение НИР по разработке методики хранения экспериментального образца вакцинной субстанции проводили в ООО «Иннотех».

Целью научно-исследовательской работы являлась разработка и предварительная (частичная) валидация методики хранения экспериментального образца вакцинной субстанции, выполненная в соответствии с Техническими требованиями к Согла-

³ О ветеринарии (с изменениями на 8 декабря 2020 год): Федер. закон [принят Гос. Думой 14. 05.1993]. URL: <http://docs.cntd.ru/document/9004249> (дата обращения: 13.08.2020).

⁴ Об обращении лекарственных средств: Федер. закон [принят Гос. Думой 24. 03.2010]. URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/ (дата обращения: 13.08.2020).

шению №074–11–2018–017. Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

1. Оценка иммуногенности экспериментального образца адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины, изготовленной согласно Лабораторному технологическому регламенту от «11» июня 2019 г. с использованием препаратов смешанных культур лейкоцитов от иммунизированных животных в соответствии с требованиями Лабораторной методики оценки иммуногенной активности препарата клеточной культуры.
2. Оценка содержания антигена *A. ovis* в экспериментальном образце адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины с использованием Лабораторной методики количественного определения *A. ovis* с помощью ПЦР в реальном времени.
3. Закладка экспериментальных образцов адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины.
4. Извлечение и вскрытие экспериментальных образцов адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины.
5. Подготовка и оформление методики хранения экспериментального образца вакцинной субстанции.

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на базе лаборатории ООО «Иннотех» со следующим оборудованием: бокс для работы с патогенами 3-ей группы опасности, роллерные установки, автоклавы, термоциклеры с системой оптической детекции в реальном времени, проточный цитофлуориметр FACS Calibur.

В качестве исходного материала для выполнения работ ООО «Иннотех» были использованы следующие материалы:

1. Экспериментальный образец культурально-клеточной вакцины, наработанный ООО «ЕвроПак» согласно Акту №1 от 13.06.2019 г.;
2. Препараты смешанных культур лейкоцитов от иммунизированных животных;
3. Лабораторный технологический регламент от «11» июня 2019 г.;
4. Лабораторная методика оценки иммуногенной активности препарата клеточной культуры от 05.12.2018 г., разработанная ООО «ГК «НАШ МИР»;
5. Лабораторная методика количественного определения *A. ovis* с помощью ПЦР в реальном

времени от 10 октября 2018 г., разработанная ФГБОУ ВО МГУПП.

Для проведения исследований по оценке иммуногенности экспериментального образца адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины, изготовленной согласно Лабораторному технологическому регламенту от «11» июня 2019 г., использовали препараты смешанных культур лейкоцитов от иммунизированных животных в соответствии с требованиями Лабораторной методики оценки иммуногенной активности препарата клеточной культуры от 05.12.2018 г.

Для проведения исследований для оценки содержания антигена *A. ovis* в экспериментальном образце адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины, изготовленной согласно Лабораторному технологическому регламенту от «11» июня 2019 г., использовали Лабораторную методику количественного определения *A. ovis* с помощью ПЦР в реальном времени от 10 октября 2018 г.

Из очищенной клеточной суспензии объемом 100 мл, полученной со стадии очистки от иммуногенных примесей, с помощью автоматической пипетки номинальным объемом 200 мкл с повышенной точностью отбирали 100 мкл суспензии, обращая внимание на предварительную гомогенизацию суспензии перед отбором пробы. Очистку суммарной геномной ДНК из клеточной суспензии проводили при помощи сорбентного метода, используя реагент ExtractDNA в соответствии с инструкцией. Полученную ДНК растворяли в 10 мкл деионизированной воды. Препараты ДНК хранили при температуре -70°C не более 1 недели. Спектрофотометрический или электрофоретический анализ образцов должен подтверждать, что большинство образцов не содержит характерных полос рибосомной РНК, а представляет собой стохастический набор полос с максимумом концентрации в диапазоне 0,7 т.п.н. Непосредственно перед выделением полученный биоматериал осаждали центрифугированием в течение 5 мин. Из пробирки тщательно удаляли супернатант, представляющий собой раствор фиксатора IntactRNA (латер) и вносят 200 мкл лизирующего раствора (из набора «Проба-ГС»), образец тщательно перемешивали и выдерживали в течение 1 мин при комнатной температуре. Далее в пробирку с образцом вносили 100 мкл водонасыщенного фенола и 100 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1). Содержимое тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, периодически повторяя перемешивание.

Пробирки центрифугировали при 13 000 g в течение 10 мин, органической фазы и интерфазы на поверхности раздела фаз, отбирали супернатант, и переносили в чистую пробирку. Добавляли 200 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1).

Центрифугировали при 13 000 g в течение 5 мин. Отбирали супернатант и переносили в чистую микропробирку объемом 1,5 мл. К супернатанту добавляли чистый изопропиловый спирт объемом 200 мкл (или в пропорции 1:1 по отношению к собранной водной фазе), перемешивали содержимое 5–6-кратным переворачиванием пробирки. Пробирки центрифугировали при 13 000 g в течение 10 мин. Супернатант тщательно удаляли с помощью водоструйного насоса. Осадок промывали 100 мкл 70% этиловым спиртом и высушивали при температуре 50°C при открытой крышке пробирки в течение 5 мин. К осадку добавляли 16,5 мкл деионизированной воды, закрывали крышки пробирок и инкубировали при температуре 50°C в течение 5 мин. Пробирки встряхивали на вортексе, добиваясь полного растворения. Препараты геномной ДНК хранят при температуре –20°C не больше 2 месяцев. Полученные препараты ДНК обрабатывали РНКазой. Для этого к препарату суммарных нуклеиновых кислот объемом 15,5 мкл добавляли препарат панкреатической РНКазы объемом 1 мкл, содержащий 1–5 ед. ферментативной активности. Смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Анализировали в суммарной геномной ДНК наличие специфического ДНК-маркера анаплазм MSP4. Кроме того, проводили оценку содержания суммарной бактериальной ДНК с помощью теста

КВМ (контроль взятия материала), который входит в состав набора «Дентофлор» производства ООО «ДНК-Технология». КВМ представляет собой тест для определения количества 16S-рДНК в биологическом материале.

ПЦР проводили в объеме 20 мкл на термоциклере с оптической системой детекцией ДТ-Прайм (ДНК-Технология, Москва). В реакции использовали по 0,25 мкМ каждого праймера и 5 мкл образца ДНК. Для калибровки ПЦР использовали плазмиду, содержащую амплифицированный фрагмент гена MSP4 *A. ovis* с праймерами Msp4-For1 и Msp4-Rev1 длиной 134 п.н. Стандарты плазмиды привели в форму серийных разведений от 10¹⁰ до 10 копий на образец. После этого проводили ПЦР по вышеописанному протоколу и строили график зависимости порогового цикла Ct от количества плазмиды (копий на образец) (Рисунок 1). С помощью описанных графиков рассчитывали количество бактерий на образец. При этом принимали в расчет, что количество рибосомных оперонов на клетку для *A. ovis* составляет 2. Количество бактериальных тел на образец умножали на 200, с учетом соотношения объемов.

Численность бактериальных тел *A. ovis* в образце выражали в терминах медианы и интерквартильного диапазона. Для определения содержания общего белка в очищенной клеточной суспензии использовали модифицированный метод Лоури с использованием бицинониновой кислоты. Для построения калибровочного графика использовали серию разведений бычьего сывороточного альбумина (Promega), поставляемого в виде раствора

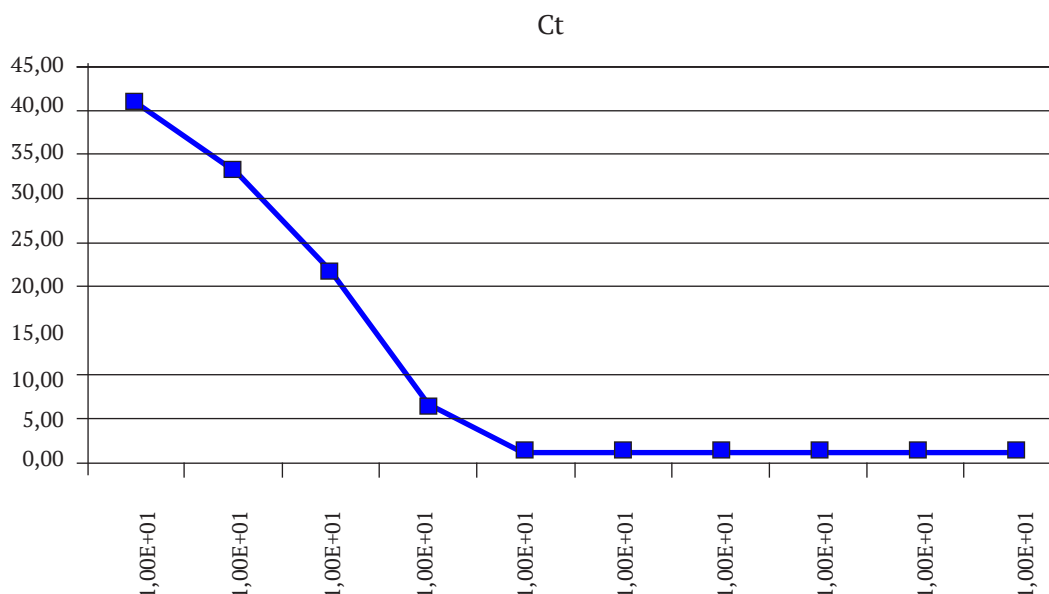


Рисунок 1. Калибровочный график зависимости величины ACt от копииности фрагмента гена MSP4 *A. ovis*, построенный с использованием клонированного в плазмиде фрагмента гена

с концентрацией 10 мг/мл. Для определения общего содержания белка в анализируемом растворе получали рабочий раствор смешением реагента А и реагента В в соотношении 50:1. В микробиологический планшет вносили 10 мкл исследуемого раствора клеточной суспензии. Затем добавляли 200 мкл рабочего раствора реагента. Перемешивали смесь в течение 30 секунд и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Измеряли А595 на планшетном спектрофотометре Униплан (Пикон). Концентрацию общего белка клеточной суспензии определяли по калибровочному графику. С использованием полученных данных измерения содержания бактериальных тел *A. ovis* и общего белка вычисляли следующие величины:

1. Объем суспензии, соответствующий 10 мг общего белка – количество субстанции, необходимое для изготовления 1 дозы ККВ;
2. Содержание специфических антигенов *D. marginatus* и *A. ovis* в расчете на дозу ККВ – 5 мг, не менее.
3. Содержание бактериальных тел *A. ovis* в расчете на дозу ККВ.

Таблица 1

Результаты анализа изменения содержания транскриптов CD3, CD4, CD8 и CD20 с помощью ПЦР в реальном времени в смешанных популяциях лейкоцитов от мышей, иммунизированных эталонным образцом КККВ, после стимуляции ЭО КККВ №1 in vitro

А)

Маркер	Неиммунные животные		Иммунные животные	
	АГ -	АГ +	АГ -	АГ +
CD3	25,8	26,5	27,4	23,5
	26,6	26,6	27,5	23,6
	25,9	26,5	27,3	22,7
CD4	29,2	28,5	29,4	25,6
	28,5	28,5	28,4	25,7
	29,2	28,7	28,5	25,8
CD8	30,4	29,8	29,3	26,7
	29,8	30,0	29,4	26,8
	29,7	30,0	29,5	26,9
CD20	22,5	22,7	21,3	19,9
	22,9	23,0	21,5	20,1
	22,3	22,4	24,4	21,4

Б)

маркер	Неиммунные животные		Иммунные животные	
	Прирост ACt	СКО	Прирост ACt	СКО
CD3	-0,4	0,3	4,1	2,1
CD4	0,4	0,3	3,1	1,5
CD8	0,0	0,2	2,6	1,3
CD20	-0,1	0,2	1,9	1,0

Результаты

Проведенное исследование позволило количественно измерить скорость увеличения численности лимфоцитов в целом, Т-хелперов и В-лимфоцитов в ответ на стимуляцию экспериментальным образцом культурально-клеточной вакцины №1 в стандартной дозировке 45 мг/мл.

Результаты исследований по оценке иммуногенности экспериментального образца адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины представлены в Таблице 1.

В ячейках Таблицы 1 А) приведены величины относительных Ct (за вычетом нормировочного сигнала КВМ), Б) величины прироста относительных Ct (за вычетом нормировочного сигнала КВМ) усредненные для двух пулов, сформированных для каждой группы крыс и среднее квадратичное отклонение, вычисленное для трех повторностей.

Результаты ПЦР теста были воспроизведены с помощью измерения содержания в смешанной по-

Таблица 2

Результаты анализа изменения содержания доли клеток с фенотипом CD3, CD4, и CD20 в смешанных популяциях лейкоцитов от мышей, иммунизированных эталонной КККВ, после стимуляции ЭО №1 *in vitro* в дозировке в дозировке 45 мг/мл. В ячейках таблицы приведено количество сигналов (тыс. за 10 мин. измерения)

Источник СКЛ	Маркер	Без стимуляции АГ		После стимуляции АГ		Прирост	Коэффициент вариации
		Q4	Q3	Q4	Q3		
Неиммунные животные	CD3	276,2	28,9	261,6	44,8	24,9%	5,4%
	CD4	293,3	21,0	252,7	21,5	-5,8%	2,2%
	CD20	266,9	50,7	250,0	48,1	-5,8%	2,8%
Иммунные животные	CD3	234,2	29,0	304,6	96,5	131,7%	4,6%
	CD4	236,8	21,0	297,4	94,8	188,3%	5,2%
	CD20	244,1	38,2	263,6	102,3	87,7%	5,0%

пуляции лейкоцитов клеток с маркерами CD3, CD4 и CD20 методом проточной цитофлуориметрии (Таблица 2).

В совокупности, полученные данные позволили оценить иммуногенность ЭО по интенсивности воздействия ЭО в момент закладки на хранение на клеточную и гуморальную компоненты иммунного ответа с использованием стандартных образцов смешанных культур лейкоцитов, полученных ранее в ходе разработки Лабораторной методики оценки иммуногенной активности препарата клеточной культуры от 05.12.2018 г.

Оценку содержания антигена *A. ovis* в экспериментальном образце адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины проводили с помощью ПЦР по вышеописанному протоколу и строили график зависимости порогового цикла Ct от количества плазмиды (копий на образец) (Рисунок 1).

В ходе разработки настоящей Лабораторной методики было установлено, что выход ПЦР составляет 96,5% от теоретически возможного, т.к. функция зависимости ACt от копийности в диапазоне от 102 до 105 копий на образец описывается функцией LOG1,81. Стандартная ошибка при воспроизведении в трёх параллельных повторностях составила 0,09 цикла.

С использованием построенного калибровочного графика было установлено, что содержание антигена *A. ovis* в экспериментальном образце №1 составляет $1,1 \cdot 10^8$ ф.о.е. в мл (ACt=7,44). Измерение проведено на линейном участке калибровочного графика.

Далее для оценки стабильности экспериментального образца адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины, изготовленного согласно Лабораторному технологическому регламенту от «11» июня 2019 г., была проведена закладка на хранение укупоренных флаконов с экспериментальным образцом вакцинной субстанции 18.06.2019 г.

Закладка на хранение осуществлялась при следующих условиях: Нормативные условия Испытания стабильности: 5 суток; Температура хранения: 4°–6°С; Вид упаковки: Стеклянные флаконы с препаратом, объемом 500 мл.

24 июня 2019 г. по истечении срока хранения экспериментального образца, было проведено извлечение и вскрытие флаконов с экспериментальными образцами адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины, изготовленными согласно Лабораторному технологическому регламенту от «11» июня 2019 г. и заложенными на хранение 18 июня 2019 г.

Из каждого из трех флаконов отбирали два образца объемом 1 мл раствора, помещали в ампулы объемом 5 мл (ГОСТ 2386–73⁵), по чистоте предназначенные для инъекционных лекарственных средств (обработаны в соответствии с Методическими указаниями МУ 42–51–1–93 и МУ 42–51–26–93 с изменениями, внесенными в Методические указания МУ 64–09–001–2002 - утверждены распоряжением Минпромнауки РФ от 15.04.2003 N P-14) и высушивали в вакуумном эксикаторе с показателем остаточного давления не выше 1 мм рт. ст. После испарения жидкости ам-

⁵ ГОСТ 2386–73. Ампулы уловней. Технические условия. М.: Стандартинформ, 1998. 23 с.

пулы трижды взвешивали на аналитических весах CasCaux-220 (точность взвешивания 0,1 мг) с 20-и минутным интервалом, отмечая изменение массы. Данную процедуру повторяли до прекращения уменьшения массы. Процент остаточных органических растворителей определяли по формуле:

$$\%p = \frac{M_n - M_k}{M_n} \cdot 100;$$

M_n – масса ампулы с образцом до вакуумирования;

M_k – масса ампулы с образцом по достижению постоянного веса.

В три ампулы, извлеченные из эксикатора (по одной на каждую закладку, извлеченную из хранения), немедленно заливали 1 мл деионизованного водного ацетонитрила квалификации «для масс-спектрометрии» с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты, растворяли в течение 30 мин. В качестве аналитического метода использовали масс-спектроскопию MALDI-TOF MS/MS/

По 500 мкл раствора вводили в ESI-источник с помощью шприцевого насоса, скорость потока составляла 3 мк/мин. Анализ положительно и отрицательно заряженных ионов проводили при следующих условиях детектирования: давление азота в небулайзере (распылителе) 0,4 Бар (5,8 psi), напряжение на капилляре 4,5 кВ, температура источника 180°C и скорость потока осушающего газа 4,0 л/мин. Инструмент калибровали с помощью 1% калибровочного раствора для ESI (Sigma-Aldrich, Швейцария) в 95% водном AcCN. Точность измерений составляла 2,2 ppm в интервале масс между 270,086255 и 293,894829. Для измерений использовали растворители с содержанием более 98%, предназначенные для LC-MS.

Результаты обработки данных масс-спектрометрического анализа экспериментального образца

культурально-клеточной вакцины представлены в Таблице 3.

Помимо масс-спектрометрического анализа образцов, изъятых из хранения, был так же выполнен анализ экспериментального образца вакцинной субстанции по всем нормативным спецификациям (Таблица 4).

Представленные в Таблицах 3 и 4 данные с использованием методов масс-спектрометрии и спектрофлуориметрии, а также проведенный микробиологический высеv показали, что экспериментальный образец вакцинной субстанции сохраняет заданную стабильность при хранении при нормативных условиях (4–6°C): содержание основного действующего вещества в течение всего гарантийного срока хранения оказывается не ниже установленного значения 98,5%.

Для проведения исследований по оценке иммуногенности экспериментального образца адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины, изготовленной согласно Лабораторному технологическому регламенту от «11» июня 2019 г., после хранения в период с 18.06.2019 по 23.06.2019 г. и изучения стабильности, использовали препараты смешанных культур лейкоцитов от иммунизированных животных в соответствии с требованиями Лабораторной методики оценки иммуногенной активности препарата клеточной культуры от 05.12.2018 г.

Результаты проведения испытаний представлены в Таблице 5.

В ячейках Таблицы 5 А) приведены величины относительных S_t (за вычетом нормировочного сигнала КВМ), Б) величины прироста относительных S_t (за вычетом нормировочного сигнала КВМ) усредненные для двух пулов, сформированных

Таблица 3

Результаты оценки гомогенности экспериментального образца вакцинной субстанции после хранения при нормативных условиях (4–6°C) в течение 5 суток, с применением масс-спектрометрии

Номер экспериментального образца, заложенного на хранение 18.06.2019 г.	Содержание основного вещества до закладки на хранение, %	Содержания основного вещества после окончания хранения по данным масс-спектрометрии, %	Расчётное содержание основного вещества после хранения в течение 12 мес. при 4–6°C
1		98,58	98,58
2	98,59±0,1	98,57	98,57
3		98,57	98,31
Итого:	98,59±0,1	98,57±0,1	98,51

Таблица 4

Стабильность – соответствие спецификации экспериментального образца вакцинной субстанции после хранения при нормативных условиях в течение 5 суток

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Визуальный	Слабо желтый прозрачный раствор с характерным запахом
Подлинность	ИК (Фурье) спектроскопия	Соответствие эталонному спектру, определяемое с помощью ПО Orus
Однородность массы	ГФ XIII	В соответствии с требованиями
Посторонние примеси	Масс-спектрометрия	Любая единичная неидентифицированная примесь – не более 0,5 %; сумма примесей – не более 1,5 %.
Однородность дозирования:	Спекторфлуориметрия	Отклонения в однородности дозирования должны соответствовать требованиям ОФС.1.4.2.0008.15
Микробиологическая чистота	ГФ XIII	Категория 3А
Количественное определение	масс-спектрометрия	От 47,5 до 52,5
Маркировка		В соответствии с НД
Хранение		При температуре 4–6°C в
Срок годности		1 год

Таблица 5

Результаты анализа изменения содержания транскриптов CD3, CD4, CD8 и CD20 с помощью ПЦР в реальном времени в смешанных популяциях лейкоцитов от мышей, иммунизированных эталонным образцом ККВ, после стимуляции ЭО ККВ №2 *in vitro*

А)

маркер	Неиммунные животные		Иммунные животные	
	АГ -	АГ +	АГ -	АГ +
CD3	25,7	26,1	27,9	23,8
	26,7	27,0	28,1	24,0
	25,7	26,1	26,8	22,8
CD4	29,2	28,9	29,0	25,9
	28,6	28,3	28,0	25,0
	29,4	29,1	28,3	25,3
CD8	30,4	30,3	28,9	26,0
	29,9	29,8	29,1	26,2
	29,9	29,9	29,3	26,4
CD20	22,5	22,6	21,0	19,3
	23,1	23,3	21,5	19,8

Б)

маркер	Неиммунные животные		Иммунные животные	
	Прирост АСt	СКО	Прирост АСt	СКО
CD3	-0,3	0,4	4,1	2,0
CD4	0,3	0,3	3,0	1,5
CD8	0,1	0,2	2,9	1,4
CD20	-0,1	0,4	1,8	2,0

Таблица 5

В)

Маркер	Неиммунные животные		Иммунные животные	
	Изменение АСt	СКО	Изменение АСt	СКО
CD3	-1,93%	3,39%	-1,33%	-1,33%
CD4	-2,69%	0,95%	-1,42%	-1,42%
CD8	0,78%	1,39%	1,29%	1,29%
CD20	3,24%	2,14%	-1,97%	9,36%

Таблица 6

Результаты анализа изменения содержания доли клеток с фенотипом CD3, CD4, и CD20 в смешанных популяциях лейкоцитов от мышей, иммунизированных ЭО, после стимуляции ЭО *in vitro* в дозировке в дозировке 45 мг/мл

А)

Источники СКЛ	Маркер	Без стимуляции АГ		После стимуляции АГ		Прирост	Коэффициент вариации
		Q4	Q3	Q4	Q3		
Неиммунные животные	CD3	275,2	28,4	266,3	45,2	28,0%	5,1%
	CD4	293,7	21,3	258,5	21,8	-4,9%	2,6%
	CD20	265,4	50,0	245,2	48,5	-5,3%	2,4%
Иммунные животные	CD3	233,9	29,4	300,0	97,7	130,5%	4,3%
	CD4	237,2	20,8	293,8	92,5	183,8%	5,0%
	CD20	245,7	38,7	261,8	100,2	82,6%	5,7%

Б)

Источник СКЛ	Маркер	Отношение иммуногенности ЭОН ² к ЭОН ¹
Неиммунные животные	CD3	-1,29%
	CD4	1,50%
	CD20	8,22%
Иммунные животные	CD3	0,91%
	CD4	2,38%
	CD20	5,79%

для каждой группы крыс и среднее квадратичное отклонение, вычисленное для трех повторностей, В) сравнение показателей, полученных при исследовании ЭО №1 и ЭО №2.

Результаты ПЦР теста были воспроизведены с помощью измерения содержания в смешанной популяции лейкоцитов клеток с маркерами CD3, CD4 и CD20 методом проточной цитофлуориметрии (Таблица 6).

В ячейках Таблицы 6 приведено: (А) количество сигналов (тыс. за 10 мин измерения); (Б) сравне-

ние показателей, полученных при исследовании ЭО №1 и ЭО №2.

При оценке содержания антигена *A. ovis* в экспериментальном образце адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины после хранения в период с 18.06.2019 по 23.06.2019г., изучения стабильности и оценки иммуногенности с помощью ПЦР в реальном времени от 10 октября 2018 г. пришли к выводу, что содержание антигена *A. ovis* в экспериментальном образце №2 составило 1,51x10⁸ ф.о.е. в мл (АСt=7,36). Измерение проведено на линей-

ном участке калибровочного графика. Изменение содержания *A. ovis* в ЭО №2 составило +4,7% по сравнению с ЭО №1.

Обсуждение

В результате контакта с микроорганизмами во время инфекционного заболевания развивается иммунитет к ним. Иммунопрофилактика позволяет выработать иммунитет до естественного контакта с возбудителем. Иммунопрофилактика – метод индивидуальной или массовой защиты животных от заболеваний путём создания или усиления искусственного иммунитета. Она подразделяется на неспецифическую и специфическую. Активная специфическая иммунопрофилактика – создание искусственного активного иммунитета путем введения вакцин, используется для профилактики:

- инфекционных заболеваний до контакта организма с возбудителем. При инфекциях с длительным инкубационным периодом, активная иммунизация позволяет предупредить заболевание даже после заражения бешенством либо после контакта с больными инфекцией;
- отравлений ядами (например, змеиными);
- неинфекционных заболеваний: опухолей (например, гемобластозов), атеросклероза⁶.

Все вакцины, кроме генно-инженерных, гетерогенны по своему антигенному составу. При введении корпускулярных вакцин (живых или убитых) появляются продукты их распада, отличающиеся по физико-химическим свойствам. Образуются олигомеры, мономеры и низкомолекулярные фрагменты. Последние способны взаимодействовать со специфическими рецепторами иммуно-компонентных клеток, не вызывая иммунного ответа. Кроме того, очень крупные молекулы антигена с высокой степенью валентности также могут быть толерогенными. Менее гетерогенными являются анатоксины и высокоочищенные микробные фракции, используемые в качестве вакцин.

Иммуногенность полных антигенов, входящих в состав вакцин, зависит от размера и полимерности их молекул, иммуногенность гаптенов — от их эпитопной плотности на молекуле носителя. Низкополимерный антиген может вызывать не только слабый, но и качественно иной характер иммун-

ного ответа по сравнению с высокополимерным антигеном.

С точки зрения молекулярной и клеточной иммунологии вакцина должна удовлетворять следующим требованиям:

- вакцина должна активировать вспомогательные клетки (макрофаги, дендритные клетки, клетки Лангерганса), участвующие в процессе и представлении антигена.
- она должна содержать эпитопы для Т- и В-клеток, обеспечивающие необходимое соотношение гуморального и клеточного иммунитета.
- она должна легко подвергаться процессированию, ее эпитопы должны обладать способностью взаимодействовать с антигенами гистосовместимости I и/или II класса.
- она должна индуцировать образование регуляторных клеток (Т-хелперов), эффекторных клеток (киллеров, Т-эффекторов ГЗТ, антилообразующих клеток) и клеток иммунологической памяти.

Идеальная вакцина должна соответствовать двум основным требованиям: она должна быть безопасной и высокоэффективной. Она должна вводиться один раз и обеспечивать пожизненный иммунитет у 100% привитых. Таких вакцин пока нет. Несмотря на большие успехи в области совершенствования существующих вакцин и разработки новых препаратов, длительность иммунитета, возникающего после введения большинства вакцин, мала даже при условии многократного введения одной и той же вакцины. Следует отметить, что у иммунизированных животных определенная степень специфической защиты остается и после исчезновения циркулирующих антител.

Сила иммунного ответа зависит от двух основных факторов: свойств макроорганизма и особенностей антигенов, используемых для иммунизации. Иммуногенность антигенов, получаемых из возбудителей инфекционных болезней, неодинакова. Наиболее иммуногенны экзотоксины и поверхностные антигены микроорганизмов. Иммуногенность вакцины во многом зависит от того, насколько удачно выбраны антигены для конструирования препарата. При недостаточной его иммуногенности используют неспецифические иммуностимуляторы (адъюванты). В практике вакцинации в качестве иммуностимуляторов используют гидроокись алюминия, фосфат алюми-

⁶ Канашкова Т.А., Шабан Ж.Г., Черношей Д.А., Крылов И.А. Специфическая иммунопрофилактика и иммунотерапия инфекционных заболеваний: учебно-методическое пособие. Минск: БГМУ, 2009. 84 с.

ния, фосфат кальция, полиоксидоний и белковые носители.

Трудности в создании высокоэффективных вакцин связаны также с особенностями макроорганизма, его генотипа, фенотипа, с существованием двух видов иммунитета (гуморального и клеточного), которые регулируются разными субпопуляциями клеток-хелперов (Тх1 и Тх2). Поствакцинальный иммунитет складывается из двух видов иммунных реакций: гуморального и клеточного. Отсутствие циркулирующих антител еще не является доказательством слабости иммунитета, при новой встрече с антигеном иммунный ответ развивается за счет иммунологической памяти. Кроме того, в основе резистентности к некоторым видам инфекций лежат клеточные механизмы, поэтому вакцины, используемые для профилактики этих инфекций, должны формировать клеточный иммунитет.

Иммуногенность вакцин составляет основу ее эффективности. Как правило, корпускулярность вакцин (живых, убитых) обеспечивает необходимую иммуногенность, в остальных случаях часто приходится использовать дополнительные методы повышения иммуногенности вакцин.

Крайне важно, чтобы вакцины вызывали Т-зависимый иммунный ответ. В противном случае ответ будет кратковременным, а повторное введение вакцины не будет вызывать вторичный ответ. Первичный и вторичный иммунный ответ отличаются друг от друга по динамике формирования иммунитета. Вторичный иммунный ответ недостаточно выражен, если для иммунизации используется слабый антиген, если в организме присутствуют пассивно введенные или активно приобретенные антитела.

Способность быстро реагировать на повторный контакт с антигеном организм приобретает благодаря иммунологической памяти. Она характерна для клеточного и гуморального иммунитета, зависит от формирования Т- и В-клеток памяти. Иммунологическая память развивается после перенесенной инфекции или вакцинации и сохраняется длительное время (microbiology.com.ua).

Кроме того, нельзя нарушать условия хранения вакцин. На первом, втором и третьем уровнях «холодовой цепи» для распаковывания, хране-

ния, упаковки и подготовки для дальнейшего транспортирования ИЛП используются холодильные камеры (комнаты). Такие холодильники обладают стабильностью температурного режима и четко держат температуру от +2°C до +8 °C. В Холодильниках должны быть перенавешиваемые дверцы без полок, встроенный термометр с дисплеем для визуального контроля температуры и температурная звуковая сигнализация.

В помещении, где находятся холодильники для ИЛП должна поддерживаться температура не выше +20 °C⁷.

Анализ полученных данных исследуемых образцов до хранения и подвергнутых хранению свидетельствует о том, что культурально-клеточной вакцины до и после хранения по показателям иммуногенности и содержанию антигена *A. ovis* с экстраполяцией степени спонтанной инактивации вакцины с реальной длительностью хранения на номинальный срок (1 год) показало, что в результате хранения вышеуказанные показатели не ухудшились.

Выводы

В результате НИР по проекту в период с 29 апреля по 28 июня 2019 г. Исполнителем выполнены задачи, соответствующие требованиям договора:

1. Проведена оценка иммуногенности экспериментального образца адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины;
2. Проведена оценка содержания антигена *A. ovis* в экспериментальном образце адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины;
3. Осуществлена закладка экспериментальных образцов адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины;
4. Проведено извлечение и вскрытие экспериментальных образцов адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины; Изучена стабильности экспериментального образца вакцинной субстанции при хранении в нормативных условиях;
5. Проведена оценка иммуногенности экспериментального образца адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины;

⁷ Воронова И. Хранение иммунобиологических лекарственных препаратов в аптеке [Электронный ресурс]. URL: <https://pharmznanie.ru/article/rabota-v-apteke/hranenie-immunobiologicheskikh-lekarstvennih-preparatov-v-apteke> (дата обращения: 10.08.2020).

6. Проведена оценка содержания антигена *A. ovis* в экспериментальном образце адсорбированной инактивированной культурально-клеточной вакцины;
7. Подготовлена и оформлена методика хранения экспериментального образца вакцинной субстанции.

Сравнение экспериментальных образцов культурально-клеточной вакцины до и после хранения по показателям иммуногенности и содержанию антигена *A. ovis* с экстраполяцией степени спонтанной инактивации вакцины с реальной длительностью хранения сроком 1 год показало, что вышеуказанные показатели не ухудшились.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке субсидии Министерства науки и высшего образования РФ по Соглашению № 074-11-2018-017 от 29 мая 2018 г.

Литература

- Георгиу Х.Г. Разработка способа получения анаплазменного антигена для серологической диагностики анаплазмоза овец // Ветеринария и кормление. 2013. № 6. С. 30–34.
- Демидова Л.Д. Исследование иммуногенности для крупного рогатого скота инактивированной вакцины против *Anaplasma marginale*, полученной на культуре клеток клещей *Ixodes scapularis* // Ветеринария. 2005. № 2. С. 160–161.
- Заблоцкий В.Т., Казаков Н.А. Вакцинопрофилактика анаплазмоза овец // Труды Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко. М., 2003. Т. 73. С. 134–139.
- Казаков Н.А. Анаплазмоз овец, меры профилактики и борьбы // Ветеринарная патология. 2003. № 1(5). С. 124–128.
- Кошкина Н.А., Колесников В.И., Горячая Е.В. Влияние анаплазмоза на репродуктивную функцию овцематок // Российский паразитологический журнал. 2007. № 2. С. 79–83.
- Кошкина Н.А., Чвалун В.А., Колесников В.И., Мишенина Е.В. Влияние латентного анаплазмоза на показатели иммунитета овцематок // Ветеринарная патология. 2007. № 2(21). С. 59–63.
- Логвинов А.Н., Михайленко В.В., Луцук С.Н. Морфологические изменения в плаценте овец при анаплазмозе // Вестник АПК Ставрополя. 2013. № 3(11). С. 142–145.
- Логвинов А.Н., Тохов Ю.Г., Луцук С.Н. Обработка пастбищ против иксодовых клещей // Вестник АПК Ставрополя. 2014. № 4(16). С. 115–117.
- Мальцева О.Е. Анаплазмоз крупного рогатого скота в Рязанской области (меры профилактики) // Ветеринария. 1998. № 2. С. 87–90.
- Мальцева О.Е. Анаплазмоз рогатого скота в Центральном регионе Российской Федерации: эпизоотология, вакцинопрофилактика, химиотерапия и меры борьбы: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2004. 173 с.
- Никольский М.Н., Глухов В.Ф. Акарацидные эмульсии для борьбы с пастбищным клещом на крупного рогатого скота // Ветеринария. 1956. № 3. С. 49–56.
- Рахимов Ф.Ф. Эпизоотология и иммунопрофилактика анаплазмоза крупного рогатого скота и овец в Гиссарской долине Республики Таджикистан: автореф. дис. ... канд. ветер. наук. М., 2011. 125 с.
- Almazán C., Šimo L., Fourniol L., Rakotobe S., Borneres J., Cote M., Peltier S., Mayé J., Versillé N., Richardson J., Bonnet S. Multiple antigenic peptide-based vaccines targeting ixodes ricinus neuropeptides induce a specific antibody response but do not impact tick infestation // Pathogens. 2020. Vol. 9, issue 11. P. 1–16. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110900>
- Aubry P., Geale D.W. A review of bovine anaplasmosis // Transbound and Emerging Diseases. 2011. Vol. 58, issue 1. p. 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>
- Bjöersdorff A., Bergström S., Massung R.F., Haemig P.D., Olsen B. Ehrlichia-infected ticks on migrating birds // Emerging Infectious Diseases. 2001. Vol. 7, issue 5. P. 877–879. <https://doi.org/10.3201/eid0705.017517>
- Chen S.M., Dumler J.S., Bakken J.S., Walker D.H. Identification of a granulocytotropic ehrlichia species as the etiologic agent of human disease // Journal of Clinical Microbiology. 1994. Vol. 32, issue 3. p. 589–595. <https://doi.org/10.1128/JCM.32.3.589-595.1994>
- Collins J.D., Hannan J., Ferguson A.R. Tick-borne fever in Ireland // Irish Veterinary Journal. 1970. No. 24. P.162–164.
- Curtis A.K., Reif K.E., Kleinhenz M.D., Martin M.S., Skinner B., Kelly S.M., Jones D.E., Schaut R.G., Reppert E.J., Montgomery S.R., Narasimhan B., Anantatat T., Jaber-Douraki M., Coetzee J.F. Development of a subcutaneous ear implant to deliver an anaplasmosis vaccine to dairy steers // Journal of Animal Science. 2020. Vol. 98, issue 6, skaa165. <https://doi.org/10.1093/jas/skz392>
- Diniz P., Breitschwerdt E. *Anaplasma phagocytophilum* infection (canine granulocytotropic anaplasmosis) // Infectious diseases of the dog and cat / ed. by Craig E. Greene. 4th ed. St. Louis: Elsevier, 2012. p. 244–254.

- Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y., Rurangirwa F.R. Reorganization of genera in the families rickettsiaceae and anaplasmataceae in the order rickettsiales: unification of some species of ehrlichia with anaplasma, cowdria with ehrlichia and ehrlichia with neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of ehrlichia equi and 'hge agent' as subjective synonyms of ehrlichia phagocytophila // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001. Vol. 51, issue 6. P. 2145–2165. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>
- Gordon W.S., Brownlee A. Wilson D.R., Macleod J. Tick-borne fever: a hitherto undescribed disease of sheep // *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*. 1932. Vol. 45. p. 301–307. [https://doi.org/10.1016/S0368-1742\(32\)80025-1](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(32)80025-1)
- Gordon W.S., Brownlee D.R. Wilson studies on louping ill, tickborne fever and scrapie // *Proceedings of the 3rd International Congress of Microbiology*. New York: American Association for the Advancement of Science, 1940. p. 362–363.
- Grøva L. Tick-borne fever in sheep - production loss and preventive measures. PhD (Biology) thesis. Oslo, 2011. 64 p.
- Hudson J.R. The recognition of tick-borne fever as a disease of cattle // *British Veterinary Journal*. 1950. No. 106. p. 3–17.
- Kocan K.M., Halbur T., Blouin E.F., Onet V., la Fuente J., Garcia-Garcia J.C., Saliki J.T. Immunization of cattle with anaplasma marginale derived from tick cell culture // *Veterinary Parasitology*. 2001. Vol. 102, issue 1–2. p. 151–161. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00519-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00519-2)
- Kocan K.M., de la Fuente J., Guglielmone A.A., Meléndez R.D. Antigens and alternatives for control of anaplasma marginale infection in cattle // *Clinical Microbiology Reviews*. 2003. Vol. 16, issue 4. p. 698–712. <https://doi.org/10.1128/cmr.16.4.698-712.2003>
- Naimi W.A., Gumpf J.J., Green R.S., Izac J.R., Zellner M.P., Conrad D.H., Marconi R.T., Martin R.K., Carlyon J.A., Palmer G.H. Immunization against anaplasma phagocytophilum adhesin binding domains confers protection against infection in the mouse model // *Infection and Immunity*. 2020. Vol. 88, issue 10. <https://doi.org/10.1128/IAI.00106-20>
- Nair A.D.S., Cheng C., Ganta C.K., Sanderson M.W., Alleman A.R., Munderloh U.G., Ganta R.R. Comparative experimental infection study in dogs with ehrlichia canis, e. chaffeensis, anaplasma platys and a. phagocytophilum // *PLoS One*. 2016. p. 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148239>
- Rar V.A., Epikhina T.I., Yakimenko V.V., Malkova M.G., Tancev A.K., Bondarenko E.I., Ivanov M.K., Tikunova N.V. Genetic variability of anaplasma phagocytophilum in ticks and voles from ixodes persulcatus/ixodes trianguliceps sympatric areas from Western Siberia, Russia // *Ticks and Tick-Borne Diseases*. 2014. Vol. 5, issue 6. P. 854–863. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.008>
- Rogers R.J. Dimmock C.K., de Vos A., Rodwell B. Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced in vivo against bovine babesiosis and anaplasmosis // *Australian Veterinary Journal*. 1988. Vol. 65, issue 9. P. 285–287. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1988.tb16144.x>
- Schnabel M. Udkast til en beskrivelse over hardanger. samlet og sammenskrevet af sal. markus schnabels efterladte papirer ved Hans Strøm. Nordheimsund: Hordalands Folkeblads Trykkeri, 1912. 75 p.
- Shkap V., Leibovitz B., Krigel Y., Molad T., Fish L., Mazuz M., Fleiderovitz L., Savitsky I. Concomitant infection of cattle with the vaccine strain anaplasma marginale s centrale and field strains of a marginale // *Veterinary Microbiology*. 2008. Vol. 130, issue 3–4. P. 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.02.013>
- Tuomi J. Experimental studies on bovine tick-borne fever. clinical and haematological data, some properties of the causative agent, and homologous immunity // *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*. 1967. Vol. 70, issue 3. P. 429–445. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1967.tb01311.x>
- Woldehivet Z. The natural history of anaplasma phagocytophilum // *Veterinary Parasitology*. 2010. Vol. 167, issue 2–4. P. 108–122. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.013>
- Woldehivet Z. Tick-borne fever: A review // *Veterinary Research Communications*. 1983. Vol. 6. P. 163–175. <https://doi.org/10.1007/BF0221491>

Evaluation of the Immunogenicity and Antigen Content of *A. Ovis* of an Experimental Sample of the Adsorbed Inactivated Culture-Cell Vaccine Against Sheep Anaplasmosis

Roman V. Glushakov

LLC "EuroPack"

115088, Moscow, 3rd Ugreshsky proezd, house 8, building 9

E-mail: roman_nv@mail.ru

Ivan A. Vasilenko

LLC „EuroPack“

115088, Moscow, 3rd Ugreshsky proezd, house 8, building 9

E-mail: zhannadark@mail.ru

Alexey A. Donskikh

LLC "EuroPack"

115088, Moscow, 3rd Ugreshsky proezd, house 8, building 9

E-mail: alex.a.donskikh@gmail.com

Mikhail P. Shchetinin

FSBEI HE "MGUPP"

125371, Moscow, Volokolamskoe highway, 11

E-mail: shchetininmihail@mgupp.ru

Sheep anaplasmosis is a blood-parasitic vector-borne disease caused by the endoglobular intra-erythrocyte parasite *Anaplasma*. The main signs of anaplasmosis are anemia, emaciation, loss of productivity and violation of the reproductive function of animals. Vaccination with an adsorbed inactivated culture-cell vaccine is promising for the prevention of sheep anaplasmosis. The conducted studies made it possible to evaluate the immunogenicity of an experimental sample of a vaccine made using preparations of mixed cultures of leukocytes from immunized animals, and the content of the *A. ovis* antigen using PCR. Comparison of experimental samples of culture-cell vaccine before and after storage in terms of immunogenicity and *A. ovis* antigen content with extrapolation of the degree of spontaneous inactivation of the vaccine with a real storage duration of 1 year showed that the above indicators did not deteriorate.

Keywords: sheep anaplasmosis, *Anaplasma ovis*, vaccination

References

- Demidova L.D. Issledovanie immunogenosti dlya krupnogo rogatogo skota inaktivirovannoi vaksiny protiv *Anaplasma marginale*, poluchenoj na kul'ture kletok kleshchei *Ixodes scapularis*. (SShA) [Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture]. *Veterinariya. Referativnyi zhurnal [Veterinary Parasitology]*, 2005, no. 2, pp. 160–161.
- Georgiu Kh.G. Razrabotka sposoba polucheniya anaplazmennogo antigena dlya serologicheskoi diagnostiki anaplazmoza ovets [Development of a method for obtaining *Anaplasma* antigen for serological diagnosis of anaplasmosis in sheep]. *Veterinariya i kormlenie [Veterinary and feeding]*, 2013, no. 6, pp. 30–34.
- Kazakov N.A. Anaplazmoz ovets, mery profilaktiki i bor'by [Anaplasmosis of sheep, prevention and control measures]. *Veterinarnaya patologiya [Veterinary pathology]*, 2003, no. 1(5), pp. 124–128.
- Koshkina N.A., Chvalun V.A., Kolesnikov V.I., Mishenina E.V. Vliyanie latentnogo anaplazmoza na pokazateli immuniteta ovtsematok [Influence

- of latent anaplasmosis on indicators of immunity of ewes]. *Veterinarnaya patologiya [Veterinary pathology]*, 2007, no. 2(21), pp. 59–63.
- Koshkina N.A., Kolesnikov V.I., Goryachaya E.V. Vliyanie anaplazmoza na reproduktivnyuyu funktsiyu ovtsematok [The effect of anaplasmosis on the reproductive function of ewes]. *Rossiiskii parazitologicheskii zhurnal [Russian parasitological journal]*, 2007, no. 2, pp. 79–83.
- Logvinov A.N., Mikhailenko V.V., Lutsuk S.N. Morfologicheskie izmeneniya v platsente ovets pri anaplazmoze [Morphological changes in the placenta of sheep with anaplasmosis]. *Vestnik APK Stavropol'ya [Bulletin of the Agroindustrial Complex of Stavropol]*, 2013, no. 3(11), pp. 142–145.
- Logvinov A.N., Tokhov Yu.G., Lutsuk S.N. Obrabotka pastbishch protiv iksodovykh kleshchei [Treatment of pastures against ixodid ticks]. *Vestnik APK Stavropol'ya [Bulletin of the Agroindustrial Complex of Stavropol]*, 2014, no. 4(16), pp. 115–117.
- Mal'tseva O.E. Anaplazmoz krupnogo rogatogo skota v Ryazanskoj oblasti (mery profilaktika) [Anaplasmosis of cattle in the Ryazan region (prevention measures)]. *Veterinariya [Veterinary]*, 1998, no. 2, pp. 87–90.
- Mal'tseva O.E. Anaplazmoz rogatogo skota v Tsentral'nom regione Rossijskoi Federatsii: Epizootologiya, vaktsinoprofilaktika, khimioterapiya i mery bor'by. Avtoref. dis. kand. biol. nauk [Anaplasmosis of cattle in the Central region of the Russian Federation: Epizootology, vaccine prevention, chemotherapy and control measure. Abstract of Ph.D (Biology) thesis]. Moscow, 2004. 173 c.
- Nikol'skii M.N., Glukhov V.F. Akaratsidnye emul'sii dlya bor'by s pastbishchnom kleshcham na krupnogo rogatogo skota [Acaricidal emulsions for the control of pasture ticks on cattle]. *Veterinariya [Veterinary]*, 1956, no. 3, pp. 49–56.
- Rakhimov F.F. Epizootologiya i immunoprofilaktika anaplazmoza krupnogo rogatogo skota i ovets v Gissarskoj doline Respubliki Tadjikistan. Avtoref. dis. kand. biol. nauk [Epizootology and immunoprophylaxis of anaplasmosis in cattle and sheep in the Gissar valley of the Republic of Tajikistan. Abstract of Ph.D (Biology) thesis]. Moscow, 2011. 125 p.
- Zablotskii V.T., Kazakov N.A. Vaktsinoprofilaktika anaplazmoza ovets [Vaccine prophylaxis of anaplasmosis in sheep]. *Trudy Vserossijskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta eksperimental'noi veterinarii imeni K.I. Skryabina i Ya.R. Kovalenko [Scholarly works All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Ya.R. Kovalenko]*, 2003, vol. 73, pp. 134–139.
- Almazán C., Šimo L., Fourniol L., Rakotobe S., Borneres J., Cote M., Peltier S., Mayé J., Versillé N., Richardson J., Bonnet S. Multiple Antigenic Peptide-Based Vaccines Targeting Ixodes Ricinus Neuropeptides Induce a Specific Antibody Response but Do Not Impact Tick Infestation. *Pathogens*, 2020, vol. 9, issue 11, pp. 1–16. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110900>
- Aubry P., Geale D.W. A Review of Bovine Anaplasmosis. *Transbound and Emerging Diseases*, 2011, vol. 58, issue 1, pp. 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>
- Bjöersdorff A., Bergström S., Massung R.F., Haemig P.D., Olsen B. Ehrlichia-Infected Ticks on Migrating Birds. *Emerging Infectious Diseases*, 2001, vol. 7, issue 5, pp. 877–879. <https://doi.org/10.3201/eid0705.017517>
- Chen S.M., Dumler J.S., Bakken J.S., Walker D.H. Identification of a Granulocytotropic Ehrlichia Species as the Etiologic Agent of Human Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994, vol. 32, issue 3, pp. 589–595. <https://doi.org/10.1128/JCM.32.3.589-595.1994>
- Collins J.D., Hannan J., Ferguson A.R. Tick-Borne Fever in Ireland. *Irish veterinary journal*. 1970, no. 24, pp.162–164.
- Curtis A.K., Reif K.E., Kleinhenz M.D., Martin M.S., Skinner B., Kelly S.M., Jones D.E., Schaut R.G., Reppert E.J., Montgomery S.R., Narasimhan B., Anantatat T., Jaber-Douraki M., Coetzee J.F. Development of a Subcutaneous Ear Implant To Deliver an Anaplasmosis Vaccine to Dairy Steers. *Journal of Animal Science*, 2020, vol. 98, issue. 6, skaa165. <https://doi.org/10.1093/jas/skz392>
- Diniz P., Breitschwerdt E. Anaplasma Phagocytophilum infection (Canine Granulocytotropic Anaplasmosis) *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Edited by Craig E. Greene. 4th ed. St. Louis: Elsevier, 2012. pp. 244–254.
- Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y., Rurangirwa F.R. Reorganization of Genera in the Families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the Order Rickettsiales: Unification of Some Species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, Descriptions of Six New Species Combinations and Designation of Ehrlichia Equi And 'Hge Agent' as Subjective Synonyms of Ehrlichia Phagocytophila. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, vol. 51, issue. 6, pp. 2145–2165. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>
- Gordon W.S., Brownlee A. Wilson D.R., Macleod J. Tick-Borne Fever: A Hitherto Undescribed Disease of Sheep. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*. 1932, vol. 45, pp. 301–307. [https://doi.org/10.1016/S0368-1742\(32\)80025-1](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(32)80025-1)
- Gordon W.S., Brownlee D.R. Wilson Studies on Louping Ill, Tickborne Fever and Scrapie. *Proceedings of the 3rd International Congress of Microbiology*. New

- York: American Association for the Advancement of Science, 1940. 362 p.
- Grøva L. Tick-Borne Fever in Sheep - Production Loss and Preventive Measures. Abstract of Ph.D (Biology) thesis. Oslo, 2011. 64 p.
- Hudson J.R. The Recognition of Tick-Borne Fever as a Disease of Cattle. *British Veterinary Journal*. 1950, no. 106, pp. 3–17.
- Kocan K.M., Halbur T., Blouin E.F., Onet V., la Fuente J., Garcia-Garcia J.C., Saliki J.T. Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. *Veterinary parasitology*, 2001, vol. 102, no. 1–2, pp. 151–161. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00519-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00519-2)
- Kocan K.M., de la Fuente J., Guglielmone A.A., Meléndez R.D. Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003, vol. 16, issue 4, pp. 698–712. <https://doi.org/10.1128/cmr.16.4.698-712.2003>
- Naimi W.A., Gumpf J.J., Green R.S., Izac J.R., Zellner M.P., Conrad D.H., Marconi R.T., Martin R.K., Carlyon J.A., Palmer G.H. Immunization Against *Anaplasma Phagocytophilum* Adhesin Binding Domains Confers Protection Against Infection in the Mouse Model. *Infection and Immunity*, 2020, vol. 88, issue 10, pp.1–36. <https://doi.org/10.1128/IAI.00106-20>
- Nair A.D.S., Cheng C., Ganta C.K., Sanderson M.W., Alleman A.R., Munderloh U.G., Ganta R.R. Comparative Experimental Infection Study in Dogs with *Ehrlichia Canis*, *E. Chaffeensis*, *Anaplasma Platys* and *A. Phagocytophilum*. *PLoS One*, 2016, pp. 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148239>
- Rar V.A., Epikhina T.I., Yakimenko V.V., Malkova M.G., Tancev A.K., Bondarenko E.I., Ivanov M.K., Tikunova N.V. Genetic Variability of *Anaplasma Phagocytophilum* in Ticks and Voles from *Ixodes Persulcatus/Ixodes Trianguliceps* Sympatric Areas from Western Siberia, Russia. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2014, vol. 5, no. 6, pp. 854–863. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.008>
- Rogers R.J., Dimmock C.K., de Vos A., Rodwell B. Bovine Leucosis Virus Contamination of a Vaccine Produced in Vivo against Bovine Babesiosis and Anaplasmosis. *Australian Veterinary Journal*. 1988, vol. 65, issue 9, pp. 285–287. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1988.tb16144.x>
- Schnabel M. Udkast til en beskrivelse over Hardanger. Samlet og sammenskrevet af Sal. Markus Schnabels efterladte papirer ved Hans Strøm [Draft description of Hardanger. Collected and compiled by Sal. Markus Schnabel's surviving papers by Hans Strøm]. Nordheimsund: Hordalands Folkeblads Trykkeri, 1912. 75 p.
- Shkap V., Leibovitz B., Krigel Y., Molad T., Fish L., Mazuz M., Fleiderovitz L., Savitsky I. Concomitant Infection of Cattle With The Vaccine Strain *Anaplasma Marginale* S Centrale and Field Strains of a *Marginale*. *Veterinary Microbiology*, 2008, vol. 130, issue 3–4, pp. 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.02.013>
- Tuomi J. Experimental Studies on Bovine Tick-Borne Fever. Clinical and Haematological Data, Some Properties of the Causative Agent, and Homologous Immunity. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 1967, vol. 70, pp. 429–445. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1967.tb01311.x>
- Woldehivet Z. The Natural History of *Anaplasma Phagocytophilum*. *Veterinary Parasitology*, 2010, vol. 167, issue 2–4, pp. 108–122. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.013>
- Woldehivet Z. Tick-Borne Fever: A Review. *Veterinary Research Communications*, 1983, vol. 6, pp. 163–175. <https://doi.org/10.1007/BF02214910>