

BABÉSIOSE BOVINE

RÉSUMÉ

La babésiose bovine est une maladie transmise par les tiques aux bovins, due à un protozoaire, *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens* et d'autres espèces. *Boophilus spp.*, le vecteur principal de *B. bovis* et *B. bigemina*, sont présents dans les pays tropicaux et subtropicaux. Le vecteur principal de *B. divergens* est *Ixodes ricinus*. Il existe d'autres vecteurs importants comme *Haemaphysalis* et *Rhipicephalus spp.*

Identification de l'agent pathogène : la présence du parasite dans les animaux morts peut être mise en évidence par des examens en microscopie de frottis sanguins ou de calques de cerveau, rein, foie, et rate, tant que la décomposition n'est pas avancée. Les étalements sont fixés dans du méthanol, colorés avec 10 % de Giemsa pendant 20 à 30 min et examinés à un grossissement de 800 à 1 000 fois sous huile à immersion. Dans le cas d'animaux vivants, des films fins ou épais de sang peuvent être prélevés de capillaires par exemple au bout de la queue. Des épreuves sensibles d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) permettent de détecter et de différencier les espèces de *Babesia* chez les bovins.

Épreuves sérologiques : l'épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) est la plus couramment employée pour la détection d'anticorps anti-*B. bovis* et *B. divergens*, mais la méthode immuno-enzymatique (ELISA) est de plus en plus utilisée. L'épreuve d'IFI est utilisée pour la détection d'anticorps anti-*B. bigemina*, mais des réactions croisées rendent difficile le diagnostic de l'espèce.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : des vaccins vivants ou atténués de souches de *B. bovis*, *B. bigemina* ou *B. divergens* sont produits dans plusieurs pays à partir de sang d'animaux donneurs infectés. Les vaccins sont disponibles sous formes congelées ou refroidies. La production de vaccin congelé est habituellement recommandée parce qu'elle permet le contrôle tout au long de la phase de post-production de chaque lot. Le risque de contamination de ce vaccin dérivé de sang rend le contrôle qualité essentiel mais qui peut être très coûteux.

Les vaccins utilisant des *Babesia* vivantes ne sont pas entièrement sûrs. Une recommandation pratique est de limiter leur utilisation aux veaux, quand l'immunité non-spécifique minimisera les risques de réaction à la vaccination. Quand des animaux plus vieux doivent être vaccinés, le risque de réactions doit être surveillé et un traitement à l'aide d'un babesiacide doit être administré si besoin est.

L'immunité protectrice se développe en 3 à 4 semaines et dure pour plusieurs années après une vaccination unique.

A. INTRODUCTION

La babesiose bovine est due à des parasites protozoaires du genre *Babesia*, de l'ordre des *Piroplasmida*, du phylum des *Apicomplexa*. Parmi les espèces infectant les bovins, 2 – *Babesia bovis* et *B. bigemina* – sont réparties dans le monde entier avec une importance majeure en Afrique, Asie, Australie et Amérique centrale et du Sud. *Babesia divergens* est économiquement importante dans certaines parties d'Europe.

Le vecteur de la *Babesia* est la tique (18). *Boophilus microplus* est le vecteur principal de *B. bigemina* et *B. bovis* et est présent dans les pays tropicaux et subtropicaux. Le vecteur de *B. divergens* est *Ixodes ricinus*. Les autres vecteurs importants sont *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus* et d'autres *Boophilus spp.* *Babesia bigemina* a la répartition la plus étendue.

Généralement, *B. bovis* est plus pathogène que *B. bigemina* et *B. divergens*. Les infections sont caractérisées par une forte fièvre, une ataxie, une anorexie, un syndrome de choc circulatoire et parfois des signes nerveux en raison de la séquestration des érythrocytes infectés dans les capillaires cérébraux. Dans la phase aiguë, la parasitémie maximum (pourcentage d'érythrocytes infectés) dans le sang circulant est inférieure à 1 %. Ce n'est pas le cas pour les infections à *B. bigemina*, où la parasitémie peut être supérieure à 10 % et peut même atteindre 30 %. Dans les infections à *B. bigemina*, les signes cliniques majeurs sont la fièvre, une hémoglobinurie et une anémie. La séquestration intravasculaire d'érythrocytes infectés n'a pas lieu dans les infections à *B. bigemina*. La parasitémie et l'apparence clinique de l'infection à *B. divergens* sont similaires à l'infection due à *B. bigemina* (20).

Les animaux infectés développent une immunité de longue durée contre la réinfection avec la même espèce de parasite. Des degrés de protection croisée d'animaux immuns pour *B. bigemina* contre une infection suivante par *B. bovis* existent. Les veaux présentent rarement de signes cliniques de la maladie après infection quelque soit l'espèce de *Babesia* en cause ou le statut immunologique de la mère (8, 10, 11).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

La méthode traditionnelle d'identification de l'agent dans des animaux infectés se fait par l'examen microscopique d'étalement de sang coloré, par exemple par du Giemsa. La sensibilité de cette technique est telle qu'elle permet de détecter des parasitémie aussi faible que 1 parasite pour 10^7 globules rouges (6). La différenciation entre espèces est bonne pour des étalements fins, mais est moins bonne pour les étalements épais. Cette technique est habituellement adaptée à la détection dans le cas d'infections aigus, mais pas pour la détection de porteurs pour lesquels la parasitémie est en général faible. L'identification du parasite et de l'espèce peut être améliorée en utilisant une coloration fluorescente, comme l'acridine orange plutôt que le Giemsa (19). Une méthode quantitative sur la fraction leucocytaire a été développée qui colore à l'acridine orange les parasites dans des tubes capillaires pour mettre en évidence la présence de *Plasmodium* dans du sang humain et elle pourrait être aussi utilisée pour détecter *Babesia* dans le cas de parasitémie faible, mais la différenciation de l'espèce restera probablement difficile (6).

Les échantillons provenant d'animaux vivants doivent être prélevés à partir de capillaires, comme ceux du bout de l'oreille ou de la queue, puisque *B. bovis* est plus fréquente dans les capillaires sanguins. *Babesia bigemina* et *B. divergens* sont uniformément distribués dans tous les vaisseaux sanguins. S'il n'est pas possible d'obtenir des gouttes de sang frais à partir de sang capillaire, du sang stérile provenant de la jugulaire peut être collecté avec un anticoagulant comme l'EDTA (acide tétra-acétique éthylène diamine) à 1 mg/ml. L'héparine peut altérer la couleur caractéristique du marquage et n'est donc pas recommandée. Les échantillons doivent être conservés au frais, de préférence à 5°C, jusqu'à ce qu'ils soient livrés au laboratoire, de préférence quelques heures après leur collecte. Les étalements fins de sang sont séchés à l'air, fixés dans du méthanol absolu pendant 1 min, et colorés dans une solution de Giemsa à 10 % pendant 20 à 30 min. Il est préférable de les colorer juste après les avoir préparés afin d'obtenir une bonne définition de la coloration. Les étalements épais sont réalisés en plaçant une petite goutte (approximativement 50 µl) de sang sur une lame propre. La goutte est alors séchée à l'air, fixée à la chaleur à 80°C pendant 5 min et colorée dans une solution de Giemsa à 10 % pendant 15 à 20 min. Les étalements de sang non colorés ne doivent pas être stockés avec des solutions de formol qui peuvent altérer la qualité de la coloration.

Les échantillons provenant d'animaux morts sont de fins étalements de sang, ou des étalements à partir, par ordre de préférence, du cortex cérébral, de rein, de foie, de rate et de moelle osseuse. Les étalements d'organe sont réalisés en pressant une lame propre sur une surface de l'organe fraîchement sectionné ou en écrasant un petit morceau de tissu entre 2 lames de microscopes de telle sorte qu'un film de tissu soit présent sur chaque lame. L'étalement est alors séché à l'air (en le réchauffant un peu, dans les climats humides), fixé pendant 5 min dans du méthanol absolu et coloré pendant 20 à 30 min dans une solution de Giemsa à 10 %. Cette méthode est utilisée pour le diagnostic des infections à *B. bovis* mais n'est pas valable si les échantillons sont prélevés 24 h ou plus après la mort de l'animal. Cependant les parasites peuvent souvent être détectés dans le sang veineux prélevé dans la région des membres un ou plusieurs jours suivant la mort.

Tous les étalements colorés sont examinés sous huile à immersion en utilisant un oculaire x8 et un objectif x60. *Babesia bovis* est un petit parasite, habituellement localisé au centre de l'érythrocyte. Il mesure approximativement entre 1 et 1,5 µm de long, 0,5 et 1,0 µm de large et est souvent rencontré par paires situés en angle obtus l'un par rapport à l'autre. *Babesia divergens* est aussi un petit parasite, de morphologie similaire à *B. bovis*. Cependant, les paires en angle obtus sont localisées au bord de l'érythrocyte. *Babesia bigemina* est beaucoup plus long et est rencontré par paires à angle aigu l'un par rapport à l'autre. *Babesia bigemina* a typiquement une forme de poire, mais de nombreuses formes uniques sont rencontrées. Il mesure de 3 à 3,5 µm de long et 1 à 1,5 µm de large et les formes par paire ont souvent 2 points rouges discrets dans chaque parasite

(*B. bovis* et *B. divergens* n'en ont qu'un). Dans les cas aigus, la parasitémie à *B. bovis* seul peut atteindre 1 % mais avec *B. bigemina* et *B. divergens* des taux de parasitémie plus élevés sont la norme. Des films de sang épais sont particulièrement utiles pour le diagnostic d'infections à *B. bovis* à bas niveau, tout comme le sont les étalements à partir d'organes (1).

Des sondes ont été utilisées pour détecter l'ADN de certaines espèces de *Babesia* mais généralement elles ne sont pas plus sensibles que l'observation directe au microscope et les applications pour le diagnostic de routine sont limitées (19). Des essais d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) se sont révélés très sensibles particulièrement pour la détection de *B. bovis* et *B. bigemina* chez les bovins (7, 11, 17, 35). Des niveaux de détection aussi faibles que 3 érythrocytes parasités dans 20 µl ont été annoncés (36). Un certain nombre de techniques de PCR permettant la détection et la différenciation des espèces de *Babesia* dans des infections ont été décrites (7, 35). Des épreuves de PCR permettant de différencier les isolats de *B. bovis* ont été décrits (5). Cependant, les épreuves de PCR ne sont pas adaptées à des tests à grande échelle et ne sont pas prêtes de remplacer les épreuves sérologiques comme méthode de choix pour les études épidémiologiques. Les épreuves de PCR sont utiles comme épreuves de confirmation et dans certains cas pour des épreuves édictées par la réglementation.

Les méthodes de culture *in vitro* ont été utilisées pour prouver la présence de *Babesia* spp. dans des cas d'infections (22) et *B. bovis* a été clonée en culture. La parasitémie minimum détectable par cette méthode dépendra, des équipements disponibles et de l'habileté de l'opérateur (6) mais peut être aussi faible que 10^{-10} (19), ce qui en fait une méthode très sensible pour prouver l'infection. Un atout est sa spécificité de 100 %.

La confirmation de l'infection chez un animal suspect peut aussi être réalisée par transfusion d'approximativement 500 ml de sang de la jugulaire à un veau splénectomisé, exempt de *Babesia* ; le veau est alors suivi pour la détection de l'infection. Cette méthode est lourde et chère et évidemment pas applicable à un diagnostic de routine. Des gerbilles de Mongolie (*Meriones unguiculatus*) peuvent cependant être utilisées pour mettre en évidence la présence de *B. divergens*.

2. Épreuves sérologiques

L'épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) est largement utilisée pour détecter les anticorps de *Babesia* spp. Mais l'épreuve pour *B. bigemina* est très peu spécifique. Des réactions croisées avec les anticorps anti-*B. bovis* dans l'épreuve contre *B. bigemina* sont un problème particulier dans les régions où les 2 espèces coexistent. L'épreuve d'IFI a le désavantage de ne pouvoir être réalisée que sur un faible nombre d'échantillons et de la subjectivité de sa lecture. Une méthode immuno-enzymatique (ELISA) internationalement validée pour le diagnostic de *B. bovis* a été développée (13, 29, 38) mais, malgré les efforts de plusieurs investigateurs dans différents laboratoires, il n'y a pas encore d'ELISA validé de manière similaire pour *B. bigemina*. Les ELISAs pour la détection des anticorps de *B. bigemina* sont typiquement peu spécifiques. Dans une étude (16), un antiserum anti *B. bigemina* réagit de manière non spécifique avec le fibrinogène. Cependant, un test ELISA développé récemment et validé en Australie (30) apporte des espoirs considérables. En l'absence d'une autre épreuve efficace pour *B. bigemina*, le protocole pour ce test a été introduit ici. Des tests ELISA ont aussi été développés pour *B. divergens* (9) en utilisant de l'antigène dérivé de culture, mais il ne semble pas qu'un test ait été validé internationalement.

a) Méthode immuno-enzymatique pour *Babesia bovis*

La préparation d'antigène est basée sur une technique décrite par Waltisbuhl *et al.* (38). Le sang infecté (habituellement entre 5 et 10 % de parasitémie) est collecté sur EDTA à partir d'un veau splénectomisé. Le sang est lavé 3 fois dans 5 volumes de solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) et les cellules infectées sont alors concentrées par lyses différentielles des cellules non infectées dans une solution hypotonique. Les cellules infectées sont plus résistantes à la lyse que les non infectées. Une série de solutions salines hypotoniques de 0,35 à 0,5 % de NaCl avec un pas de 0,025 % sont préparées. Afin de déterminer la meilleure concentration, 5 volumes de chaque solution saline sont ajoutés à un volume de globules rouges qui sont agités légèrement puis déposés pendant 5 min.

Les mélanges sont alors centrifugés et les surnageants sont aspirés. Un volume égal de plasma (provenant du sang originel) est ajouté à chaque tube contenant les globules rouges et le contenu des tubes est alors mélangé. De fins étalements sont alors préparés à partir de ces suspensions de cellules sanguines ; ils sont fixés au méthanol et colorés au Giemsa. Ces étalements sont examinés au microscope pour déterminer la concentration de solution saline qui lyse le plus de globules rouges non infectés mais qui laisse intacts les globules rouges infectés. Il peut être possible d'arriver à un taux d'infection supérieur à 95 % dans les globules rouges restant intacts. L'agrégat de globules rouges est alors lysé avec la solution saline optimale et centrifugé. Le culot (contenant plus de 95 % de globules rouges infectés) est lysé dans de l'eau distillée à 4°C et les parasites sont culottés à 12 000 *g* pendant 30 min. Le culot est lavé 3 fois dans du PBS par re-suspension et centrifugation à 4°C. Il est alors suspendu dans 1 ou 2 volumes de PBS à 4°C et soniqué dans des volumes appropriés en utilisant une puissance moyenne pendant 60 à 90 secondes. Le matériel

soniqué est ultracentrifugé (105 000 *g* pendant 60 min à 4°C) et le surnageant est récupéré. Il est mélangé avec un volume égal de glycérol et stocké dans des tubes de 2 à 5 ml à –70°C. Un stockage de courte durée à –20°C est possible pour les tubes de travail.

• **Protocole**

- i) 100 µl de l'antigène dilué de 1/400 à 1/1 600 dans un tampon carbonate pH 9,6 est ajouté à chaque puits d'une microplaque de 96 puits en polystyrène. La plaque est recouverte et incubée une nuit à 4°C.
- ii) L'antigène est éliminé et les puits sont bloqués pendant 2 h à température ambiante par 200 µl d'une solution à 2 % de caséinate de sodium dilué dans le tampon carbonate.
- iii) Après blocage, les puits sont rincés brièvement avec du PBS contenant 0,1 % de Tween 20 (PBST) et 100 µl de sérum de bovin dilué au 1/100 dans le tampon PBST contenant soit 5 % de sérum normal de chevaux ou 5 % de lait en poudre écrémé. Les plaques sont incubées pendant 2 h à température ambiante.
- iv) L'étape de lavage consiste en un bref lavage avec le PBST, suivi de 3 lavages de 5 min avec le même tampon, sous agitation rapide, suivie d'un bref rinçage.
- v) Ensuite, 100 µl d'IgG anti-bovin marquée à la peroxydase et diluée de manière appropriée dans du PBST contenant du sérum de cheval ou du lait écrémé sont ajoutés aux plaques qui sont agitées pendant 30 min à température ambiante (NB : certaines marques de lait écrémé peuvent contenir des immunoglobulines qui peuvent interférer avec le conjugué IgG anti-bovin)
- vi) Les puits sont lavés comme décrits dans l'étape iv et 100 µl de substrat peroxydase (ABTS [2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique acid)]) sont ajoutés dans chaque puits. La réaction doit se continuer jusqu'à ce que l'absorbance d'un témoin positif fort inclus sur chaque plaque approche 1. À ce stade, l'absorbance à 414 nm est lue dans un lecteur de microplaques.

Pour contrôler les variations interplaques, un témoin positif et négatif est inclus dans chaque plaque (38). Les sérums à tester sont gradués en fonction du témoin positif. Les résultats ELISA sont exprimés en pourcentage de ce témoin positif (pourcentage de positivité). Les valeurs positive et négative doivent donc être déterminées dans chaque laboratoire en testant autant de témoins positifs et négatifs connus possible.

Chaque lot d'antigène et de conjugué doit être titré en utilisant une répartition en damier. L'enzyme la plus adaptée au meilleur marquage pour le conjugué est la peroxydase de raifort. L'ABTS ou la benzidine de tétraméthyl (TMB) sont des substrats convenables. Avec ce test, il est possible de détecter des anticorps au moins 4 ans après une seule infection. Il y doit y avoir entre 95 et 100 % de réactions positives avec des sérums d'animaux infectés par *B. bovis*, 1 à 2 % de réactions positives avec des sérums négatifs et moins de 2 % de faux positifs avec des sérums d'animaux infectés par *B. bigemina*.

b) Méthode immuno-enzymatique pour *Babesia bigemina*

Le test ELISA est basé sur l'antigène immunodominant de 58 kDa identifié chez un certain nombre de groupes d'isolats de *B. bigemina* provenant d'Australie, d'Amérique Centrale et du Texas, des États-Unis d'Amérique, d'Égypte et du Kenya (30). Un anticorps monoclonal (D6) (Tick Fever Research Centre, Qld, Australie) dirigé contre cet antigène a été utilisé pour développer un test d'inhibition compétitive par ELISA (30). L'antigène utilisé dans cette épreuve est un peptide de 26 kDa (Tick Fever Research Centre, Qld, Australie), codé par un fragment de 360 pb du gène p58, exprimé dans *Escherichia coli* et purifié par affinité. Cet antigène peut également être utilisé pour un test ELISA indirect, mais des réactions croisées avec des anticorps contre *B. bovis* peuvent être attendues.

• **Protocole**

- i) L'antigène recombinant de 26 kDa est dilué dans du tampon carbonate à 0,1 M à pH 9,6 à une concentration approximative de 2 µg/ml et 100 µl sont ajoutés à chaque puits d'une microplaque de 96 puits. Les plaques sont incubées une nuit à 4°C.
- ii) L'excès d'antigène est éliminé et les puits sont alors bloqués pendant 1 h à température ambiante avec 200 µl d'une solution à 2 % de caséinate de sodium dans le tampon carbonate.

- iii) Après un bref rinçage ($3 \times 200 \mu\text{l}$) avec du PBS contenant 0,1 % de Tween 20 (PBST), 100 μl de sérum non dilué sont ajoutés à chaque puits. Les plaques sont incubées 30 min à température ambiante sous agitation lente.
- iv) Les plaques sont alors lavées avec du PBST ($5 \times 200 \mu\text{l}$, chaque lavage est effectué pendant 5 min sous agitation), 100 μl d'anticorps monoclonal D6 marqué à la peroxydase et dilué à 0,03 $\mu\text{g/ml}$ dans du PBST contenant 2 % de lait en poudre écrémé sont ajoutés à chaque puits. Les plaques sont incubées à température ambiante pendant 30 min sous agitation lente.
- v) Les plaques sont lavées à nouveau. 100 μl du substrat de la peroxydase TMB sont ajoutés à chaque puits et les plaques sont incubées dans le noir jusqu'à ce que l'absorbance des puits témoins approche 1. À ce stade, la réaction est stoppée par l'addition de 50 μl d'acide sulfurique 1 M et l'absorbance est lue à 450 nm. Les témoins positifs et négatifs doivent être inclus dans chaque plaque.

Le pourcentage d'inhibition (PI) est calculé pour chaque épreuve par rapport au témoin conjugué seul ($\text{PI} = 100 - [100 \times \text{absorbance lors de l'épreuve/témoin de l'absorbance du conjugué}]$). Les valeurs seuil doivent être déterminées pour chaque laboratoire en testant autant de sérums positifs et négatifs qu'il est possible.

La spécificité de l'ELISA a été estimée à 97 % et la sensibilité de détection des anticorps issus de bovins expérimentalement infectés est de 95,7 % (30).

c) Épreuve d'immunofluorescence indirecte

- **Préparation de l'antigène**

Les lames d'antigène sont préparées à partir de sang pris à la jugulaire, idéalement quand la parasitémie est entre 2 et 5 %.

Le sang est collecté dans un tube contenant un anticoagulant adéquat (citrate de sodium ou EDTA) puis est ensuite lavé au moins 3 fois dans 5 à 10 volumes de PBS pour éliminer les protéines plasmatiques contaminantes et, en particulier, les immunoglobulines de l'hôte. Après les lavages, les globules rouges infectés sont suspendus dans 2 volumes de PBS dans lequel a été ajouté 1 % de sérum albumine bovine (BSA). La BSA est utilisée pour faire adhérer les globules rouges à la lame. De préférence, un film d'une seule épaisseur de sang est fait en plaçant une goutte de sang sur la lame propre qui est ensuite étalée dans une cytotrifugeuse. Cette procédure rend uniforme les étalements. Alternativement, de fins films de sang peuvent être effectués par la technique conventionnelle (en traînant la goutte de sang avec une autre lame). Les films sont séchés à l'air libre et fixés pendant 5 min dans un four à 80°C. Les films de sang fixés sont hermétiquement recouverts (avec une feuille d'aluminium ou une feuille brune autocollante) et sont stockés à -70°C jusqu'à utilisation (conservation maximale de 5 ans).

- **Protocole**

Les sérums à tester et les témoins sont dilués au 1/30 dans du PBS. Les sérums peuvent être utilisés avec ou sans inactivation par la chaleur à 56°C pendant 30 min. Les lames sont divisées en 8 à 10 sections avec un stylo à huile pour produire des divisions hydrophobes. Pour chaque carré testé, 5 à 10 μl de chaque dilution de sérum sont ajoutés à la micropipette. Les préparations sont ensuite incubées à 37°C pendant 30 min dans une chambre humide. Pour les témoins, des dilutions de sérums faiblement positifs et négatifs sont utilisées sur chaque lame.

Après l'incubation, les lames sont rincées 1 fois dans du PBS, puis 2 fois 10 min avec du PBS et enfin dans un bain d'eau. Une dilution appropriée de l'anticorps IgG anti-bovin marqué à l'isothiocyanate fluorescéine (commerciallement disponible) est alors ajoutée dans chaque carré à tester. Chaque nouveau lot de conjugué doit être titré, les gammes de travail sont en général entre 1/400 et 1/1 200. Les anticorps conjugués de lapin et de poulet sont habituellement plus appropriés pour cette étude que les anticorps de chèvre. Les lames avec le conjugué sont incubées à température ambiante pendant 30 min puis lavées comme décrit. Les lames sèches sont montées avec des lamelles dans un mélange de Glycérol/PBS 1:1, et examinées en microscopie fluorescente standard. Un opérateur compétent peut examiner approximativement 150 échantillons par jour.

d) Autres épreuves

D'autres épreuves sérologiques ont été décrites récemment et comprennent un ELISA sur membrane (31) un ELISA sur lame (25), et des épreuves d'agglutination au latex (3, 26). Ces épreuves présentent des

niveaux acceptables de sensibilité et de spécificité pour *B. bovis* et, également pour *B. bigemina* dans le cas de l'ELISA sur membrane. Cependant, aucune de ces épreuves n'a été adoptée pour utilisation lors de diagnostics de routine dans des laboratoires autres que ceux qui les ont développés et validés. L'adaptabilité de ces épreuves au diagnostic de routine est de ce fait inconnue.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Les bovins développent une immunité de longue durée après une première infection par *B. bovis*, *B. divergens* ou *B. bigemina*. Cette caractéristique a été exploitée dans certains pays pour immuniser les bovins contre la babésiose (8, 14, 27, 34). La plupart de ces vaccins vivants contiennent des souches de *Babesia* spécialement sélectionnées, principalement *B. bovis* et *B. bigemina*, et sont produits dans des installations de production supportées par les gouvernements, en tant que service auprès des industries du bétail, en particulier en Australie, Argentine, Afrique du Sud, Israël et l'Uruguay. Un vaccin expérimental contre *B. divergens* préparé à partir de sang infecté de gerbilles a aussi été utilisé avec succès en Irlande (21).

Un vaccin inactivé de *B. divergens* est préparé en Autriche à partir de sang de veaux infectés (15), mais peu d'informations concernant le niveau et la durée de l'immunité sont disponibles. Des vaccins expérimentaux contenant des antigènes produits *in vitro* ont également été développés (2, 32), mais le niveau et la durée de la protection contre une infection hétérologue sont flous. Des protéines parasitaires ont été caractérisées et des progrès ont été faits concernant le développement de sous-unités vaccinales (11, 33). Aucune sous-unité vaccinale n'est encore commercialement disponible.

Les lignes directrices pour la production de vaccins vétérinaires sont données dans le Chapitre I.1.7., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices données ici et dans le Chapitre I.1.7. sont générales et peuvent être modifiées selon les impératifs nationaux ou régionaux.

Cette partie traitera de la production de vaccins vivants contre les babésioses et principalement ceux contre l'infection des bovins avec *B. bovis* et *B. bigemina*. Leur production implique l'infection de veaux avec des souches sélectionnées et l'utilisation de sang comme vaccin (8, 12, 14). Les veaux utilisés pour l'infection avec ces souches doivent être indemnes de tout autre agent infectieux qui pourrait être transmis par les produits dérivés du sang. Dans le cas de *B. divergens*, le sang de gerbilles infectées (*Meriones unguiculatus*) peut être utilisé à la place du sang de bovin. Les méthodes de culture *in vitro* ont également été utilisées pour produire des parasites pour la fabrication de vaccin (24, 27). Cependant le coût relativement élevé de la production à partir de culture et la possibilité de dérive antigénique pendant le maintien en culture, font que la culture en masse de *Babesia* spp. est impraticable dans la plupart des laboratoires.

Les vaccins contre *Babesia bovis* et *B. bigemina* peuvent être préparés sous formes congelée ou réfrigérée selon la demande, les systèmes de transports et la disponibilité en azote liquide ou en carboglace. La préparation de vaccins congelés est préférée (12, 14, 27, 34), car cela permet le contrôle post-production de chaque lot. Cependant, elle est plus coûteuse et le transport est plus difficile que pour les vaccins réfrigérés. Le risque potentiel de contamination de ces vaccins dérivés de sang fait que le contrôle post-production est essentiel, mais le coût de la production peut de ce fait dépasser les moyens financiers de certains pays en zones d'enzootie (14). La création de facilités de production fournissant un marché annuel de moins de 50 000 doses ne peut souvent se faire sans support financier.

1. Gestion des semences

a) Caractéristiques des semences

- **Souches disponibles au plan international**

Des souches atténuées de *B. bovis* et *B. bigemina* ont été utilisées efficacement pour immuniser des bovins en Afrique, Amérique du Sud et Asie du Sud-Est (12, 14). Des souches transmises ou non par les tiques sont disponibles. Une souche de *B. divergens* à virulence atténuée pour les gerbilles a également été développée (39).

- **Isolation et purification de souches locales**

Des souches de *B. bovis*, *B. divergens* et *B. bigemina* qui sont exemptes de contaminations par des agents tels que *Anaplasma*, *Eperythrozoon*, *Theileria*, *Trypanosoma* et d'autres agents bactériens ou viraux sont isolées le plus rapidement en nourrissant des tiques sur des bovins splénectomisés. Les vecteurs et les modes de transmission de ces espèces sont différents, et ces caractéristiques peuvent être utilisées pour séparer les espèces (18).

Babesia spp. peut également être isolée à partir de bovin infecté par inoculation à des veaux splénectomisés. Un des inconvénients majeurs de cette technique est la difficulté pour séparer les *Babesia* spp. des contaminants tels que *Anaplasma* et *Eperythrozoon*. L'isolement de *B. divergens* est relativement simple du fait de la sensibilité des gerbilles (21). Le maintien *in vitro* des souches isolées (23) peut être utilisé pour éliminer la majorité des contaminants, mais pas pour séparer les espèces de *Babesia* spp. Une chimiothérapie sélective peut être utilisée pour obtenir *B. bovis* pure à partir d'un mélange, alors que des passages rapides sur des veaux permettront l'isolement de *B. bigemina* (1).

- **Atténuation des souches**

Différents moyens d'atténuation des espèces de *Babesia* spp. ont été décrits. La méthode la plus fiable pour diminuer la virulence de *B. bovis* est basée sur des passages rapides de la souche sur des veaux splénectomisés. L'atténuation n'est pas garantie mais est effective en général après 8 à 20 passages sur veau (8).

La virulence de *B. bigemina* diminue pendant le maintien prolongé du parasite chez des animaux infectés latents. Cette caractéristique a été utilisée pour obtenir des souches avirulentes sur des veaux infectés, en les splénectomisant après 3 mois et ensuite en ré-utilisant les parasites restant selon la même procédure (8).

L'atténuation de *B. divergens* pour les gerbilles est obtenue après maintien *in vitro* sur de longues périodes (39).

L'atténuation des espèces de *Babesia* spp. par irradiation a été essayée mais les résultats sont variables. Semblablement, le maintien *in vitro* dans des milieux modifiés a été utilisé expérimentalement.

Les souches avirulentes doivent être conservées sous forme stable pour les tests d'innocuité et pour l'utilisation future comme inoculum de base pour la production de vaccins.

b) Préparation et conservation des lots de semence primaire

Les souches avirulentes sont conservées sous forme de sang infecté dans de l'azote liquide ou de la carboglace. Le diméthyl sulphoxide (DMSO) (28) et la polyvinylpyrrolidone MW 40 000 (37) sont les cryoconservateurs recommandés, car ils permettent une administration intraveineuse après décongélation de l'inoculum. Les détails de la technique de congélation dans le DMSO sont décrits ailleurs (28).

Brièvement : le sang est collecté et refroidi à 4°C. Le cryoconservateur (4 M DMSO dans du PBS) est ajouté en remuant doucement à un rapport final sang/conservateur de 1:1 avec une concentration finale de DMSO de 2 M. Cette procédure est réalisée dans un bain de glace, le sang dilué est distribué dans des tubes appropriés (cryotubes de 5ml) et congelé dès que possible, dans la phase gazeuse d'un container à azote liquide. Les tubes sont stockés dans la phase liquide pour prévenir la perte de viabilité et les contaminations. Congelé selon cette procédure, les lots d'inoculum de base de *Babesia* peuvent être stockés pendant 20 ans.

c) Préparation et conservation du lot de semence de travail

L'inoculum de travail est préparé selon la même procédure que l'inoculum de base (Section C.1.b.), l'inoculum de base étant le matériel de départ.

d) Validation de l'innocuité et de l'efficacité du lot de semence de travail

L'utilisation de l'inoculum de travail est déterminée en inoculant un nombre convenable de bovins sensibles avec le vaccin préparé et ensuite en infectant ces bovins avec une souche virulente et une souche hétérologue. L'innocuité et l'efficacité sont déterminées en déterminant la fièvre, la parasitémie sur des frottis sanguins et sur des cellules concentrées. La pureté de l'inoculum de travail est testée en recherchant chez le bovin utilisé pour les tests d'innocuité des contaminants possibles comme mentionné dans la section C.4.b.

2. Méthode de fabrication

a) Production de concentré de vaccin congelé

Premièrement, 5 à 10 ml d'inoculum de travail sont rapidement décongelés par immersion des tubes dans un bain préchauffé à 40°C. Le matériel décongelé est conservé dans la glace et utilisé dès que possible (dans les 30 min si du DMSO est utilisé) pour infecter un veau sensible, splénectomisé (exempt de contaminant vaccinal potentiel) par inoculation intraveineuse.

Le sang convenant pour la vaccination est récolté par ponction à la jugulaire quand une parasitémie souhaitable est obtenue. Une parasitémie de 1×10^8 /ml (approximativement 2 % de parasitémie dans le sang de la jugulaire) est habituellement adéquat pour la production de vaccins. Si une parasitémie suffisante pour *B. bovis* n'est pas obtenue, le passage de la souche par inoculation de 100 à 500 ml de sang dans un second veau splénectomisé est parfois nécessaire. Le passage de *B. bigemina* n'est pas recommandé.

Le sang du donneur infecté est collecté à la jugulaire en utilisant de l'héparine comme anticoagulant (5 Unité Internationale (UI) d'héparine/ml de sang).

Au laboratoire, le sang parasité est mélangé à un volume de glycérol 3 M dans du PBS supplémenté avec 5 mM de glucose (concentration finale de glycérol, 1,5 M) à 37°C. Le mélange est équilibré à 37°C pendant 30 min puis est réparti dans des tubes adéquats (des cryotubes de 5 ml). Les tubes sont refroidis de 10°C/min dans les vapeurs de l'azote liquide. Quand ils sont congelés, ils sont conservés dans la phase liquide de l'azote liquide (12, 14).

Du DMSO peut être utilisé comme cryopréservateur à la place du glycérol. Le protocole est le même que celui de la préparation de l'inoculum de travail (34).

Si le vaccin congelé glycérolé doit être dilué, le diluant doit être iso-osmotique et consiste en du PBS contenant 1,5 M de glycérol et 5 mM de glucose. De même, le diluant utilisé pour des vaccins cryopréservés dans du DMSO doit être iso-osmotique et doit contenir la même concentration de DMSO dans du PBS.

Les vaccins congelés contenant *B. bovis* et *B. bigemina* peuvent être préparés (27) en mélangeant un nombre égal de parasites obtenus à partir de différents donneurs.

La dose de vaccin recommandée après reconstitution varie de 1 à 2 ml selon les pratiques locales et les besoins.

b) Production de vaccin réfrigéré

Le matériel infectieux utilisé dans la production de vaccin réfrigéré est obtenu de la même manière que pour celui du vaccin congelé, mais doit être utilisé dès que possible après collecte. Il est nécessaire d'obtenir le maximum de doses par veau, le matériel infectieux peut être dilué pour avoir le nombre requis de parasites par dose (habituellement entre 2,5 à 10×10^7). Le diluant est 10 % de sérum de bovin stérile dans une solution saline contenant les ingrédients suivants (par litre) : NaCl (7,00 g), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,34 g), glucose (1,00 g), Na_2HPO_4 (2,52 g), KH_2PO_4 (0,90 g), et $NaHCO_3$ (0,52 g).

Le sang contenant *B. divergens* doit être dilué dans la solution de Hanks. Si on n'a pas besoin de diluant, du dextrose citrate ou du phosphate dextrose citrate peuvent être utilisés comme anticoagulant, à un ratio de un volume pour 4 volumes de sang afin de donner la quantité de glucose nécessaire à la survie des parasites.

3. Contrôle en cours de fabrication

a) Sources et maintien des donneurs pour la fabrication des vaccins

Une source de donneurs indemnes d'infection naturelle à *Babesia*, d'autres maladies transmises par les tiques et d'autres infections transmises par le sang, doit être identifiée. Si une source convenable n'est pas accessible, il peut être nécessaire d'élever spécifiquement dans ce but des veaux donneurs dans des conditions exemptes de tiques.

Les veaux donneurs doivent être maintenus dans des conditions garantissant la prévention de l'exposition à des maladies infectieuses, des tiques ou des insectes piqueurs. En absence de telles conditions, le risque de contamination par des agents infectieux présents dans le pays impliqué doit être estimé et les bénéfices d'une production locale de vaccin (opposée à l'importation de produit adéquat) doivent être pesés par rapport aux possibles conséquences de la dissémination de maladies (8).

b) Chirurgie

Les veaux donneurs doivent être splénectomisés pour permettre l'obtention d'une quantité maximale de parasites nécessaires à la production du vaccin. Le mieux est l'utilisation de jeunes veaux sous anesthésie générale.

c) Criblage des donneurs avant inoculation

Les veaux donneurs doivent être examinés pour détecter les agents infectieux transmissibles par le sang et présents dans le pays : *Babesia*, *Anaplasma*, *Theileria*, et *Trypanosoma*. Cela peut être pratiqué par examen de routine sur des étalements sanguins après splénectomie et aussi préférentiellement par des épreuves sérologiques avant et après quarantaine. Les veaux montrant des infections naturelles avec l'un de ces agents doivent être éliminés. L'absence d'autres agents infectieux enzootiques, dans le pays doit également être confirmée ; ces agents incluent les agents de la leucose bovine enzootique, le virus de l'immunodéficience bovine, le pestivirus bovin, la rhinotrachéite bovine infectieuse, la maladie d'Akabane, la fièvre des trois jours, la bluetongue, la fièvre aphteuse et la peste bovine. Les protocoles pour les épreuves dépendront de la prévalence des maladies dans le pays concernés et la disponibilité de ces épreuves, toutefois, elles doivent inclure de la sérologie (sur des paires de sérum) et dans certains cas l'isolement du virus, la détection de l'antigène ou de l'ADN (12, 34).

d) Suivi de la parasitémie après inoculation

Il est nécessaire de déterminer la concentration des parasites dans le sang collecté pour les vaccins. Il existe des techniques pour déterminer le nombre de parasites (1), mais la concentration parasitaire peut être estimée en comptant les globules rouges et la parasitémie (% de globules rouge infectés).

e) Collecte du sang pour les vaccins

Tout le matériel doit être stérilisé avant emploi (par autoclavage par exemple). Le sang est collecté sur héparine dans des conditions d'asepsie strictes quand la parasitémie voulue est obtenue. Il est préférable de donner un sédatif aux veaux (xylazine) et d'utiliser des systèmes courts de collecte du sang.

On peut collecter jusqu'à 3 litres de sang infecté à partir d'un veau de 6 mois. Si le veau doit survivre, il est conseillé de le transfuser avec un volume similaire de sang provenant d'un donneur adéquat. Alternativement, le veau peut être tué immédiatement après la collecte du sang.

f) Aliquots des vaccins

Toutes les procédures doivent être effectuées dans un environnement adéquat : sous hotte à flux laminaire, en utilisant des techniques standard de stérilisation. L'utilisation d'un agitateur mécanique ou magnétique assurera le bon mélange du sang tout le long du processus de fabrication.

4. Contrôle des lots

L'efficacité, l'innocuité, la stérilité des lots de vaccin ne peuvent être déterminées dans le cas des vaccins réfrigérés, et la spécification des vaccins congelés dépend du code de procédure des pays impliqués. Ce qui suit regroupe les spécifications pour la production de vaccin congelé en Australie.

a) Stérilité et absence de contaminants

Les tests standards de stérilité sont utilisés pour chaque lot de vaccin et de diluant. L'absence de contaminant est déterminée par des épreuves sérologiques appropriées à partir de bovins donneurs et en inoculant des lymphocytes de donneurs à des moutons chez qui l'apparition d'une infection virale est suivie. Les contaminants potentiels incluent les agents de la leucose enzootique bovine, la rhinotrachéite bovine infectieuse, le pestivirus bovin, la fièvre des trois jours, la maladie d'Akabane, le virus Aino, la bluetongue, *Brucella abortus* et *Leptospira*, la fièvre aphteuse, la rage, la fièvre de la vallée du Rift, la peste bovine, la pleuropneumonie contagieuse bovine, la cowdriose, la maladie de Jembrana et les espèces pathogènes de *Theileria* et de *Trypanosoma* (12, 14).

b) Innocuité

Les réactions vaccinales des bovins inoculés dans le test d'activité (voir Section C.4.c.) sont surveillées en mesurant la parasitémie, la fièvre et la diminution du volume globulaire. Seuls les lots ayant un pouvoir pathogène égal ou inférieur à un standard prédéterminé sont débloqués pour leur utilisation.

c) Activité

Le concentré de vaccin glycérolé est décongelé et dilué au 1/5 avec le diluant isotonique (12, 14). Le vaccin préparé est alors incubé pendant 8 h à 30°C et 5 bovins sont inoculés par voie sous-cutanée avec une dose de 2 ml chacun. Les bovins inoculés sont alors examinés pour détecter l'infection par l'examen des frottis sanguins. Seuls les lots hautement infectieux sont conservés pour être utilisés à une dilution de 1/5.

d) Durée de l'immunité

Une inoculation suffit en général pour conférer une immunité de longue durée. Des échecs ont été rapportés avec le vaccin *B. bovis* (4) et sont dus au choix de la souche vaccinale, la présence de souches hétérologues sur le terrain et les facteurs de l'hôte. Il y a peu de preuves de chute de l'immunité avec le temps (8).

e) Stabilité

Quand il est stocké dans l'azote liquide, le vaccin peut se conserver pendant 5 ans. Le diluant stérile peut être conservé pendant 2 ans au réfrigérateur. Le vaccin décongelé perd rapidement son efficacité et ne peut pas être recongelé.

f) Agents de conservation

De la pénicilline (500 000 UI/litre) et de la streptomycine (370 000 µg/litre) sont ajoutés au vaccin au moment de sa distribution.

g) Utilisation du vaccin

Dans le cas de vaccins congelés, les tubes doivent être décongelés par immersion dans de l'eau préchauffée à 40°C. Le vaccin glycérolé doit être gardé au froid et utilisé dans les 8 h (9, 10) alors que le vaccin contenant du DMSO doit être conservé sur de la glace pilée et utilisé dans les 15 à 30 min (34).

Le vaccin réfrigéré doit être conservé au réfrigérateur et utilisé dans les 4 à 7 jours après sa préparation, selon la viabilité des parasites.

Les souches de *B. bovis*, *B. divergens* et *B. bigemina* utilisées dans les vaccins doivent avoir une virulence réduite mais ne sont pas complètement sans danger. Il est donc recommandé de limiter la vaccination aux veaux, quand l'immunité non spécifique minimisera les risques des réactions à la vaccination. Si des animaux plus vieux doivent être vaccinés, il existe un risque de réactions sévères. Ces réactions sont peu fréquentes mais les élevages précieux de reproducteurs ou de femelles gestantes doivent être observés avec attention chaque jour pendant 3 semaines après la vaccination. Idéalement, la température rectale des veaux vaccinés doit être prise et les animaux doivent être traités si une fièvre se développe. Les réactions à *B. bigemina* et *B. divergens* apparaissent habituellement entre les jours 6 et 8 et celles à *B. bovis* entre les jours 10 et 16 après la vaccination (8).

Dans la plupart des cas, une immunité protectrice apparaît après 3 à 4 semaines et dure au moins 4 ans.

Les vaccins contre la babésiose et l'anaplasmosse sont souvent utilisés en même temps mais il n'est pas recommandé d'utiliser d'autres vaccins en même temps (8).

h) Précautions d'emploi et mise en garde

Les vaccins anti-*Babesia bovis* et anti-*B. bigemina* ne sont pas infectieux pour les hommes. Cependant des cas à *B. divergens* ont été rapportés chez des individus splénectomisés. Quand le vaccin est stocké dans l'azote liquide, les précautions d'usage concernant le stockage, le transport, la manutention de matériel congelé, sont appliquées.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir Section C.4.b.

b) Activité

Voir Section C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANON (1984). Ticks and Tick-borne Disease Control. A Practical Field Manual, Vol. 11. Tick-borne Disease Control. Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), Rome, Italy.

2. BENITEZ M.T., MONTENEGRO-JAMES S., RAMOS P., APONTE J., OBREGON J.M. & ARENAS E.L. (1996). Producción semi-industrial de vacuna anti-babesiosis origen cultivado *in vitro*. *Vet. Tropical*, **21**, 59–74.
3. BLANDINO T., ALVAREZ M., LARRAMENDI R., GOMEZ E. & ALONSON M. (1991). Elaboración y evaluación de un antígeno de *Babesia bovis* para la prueba de aglutinación en latex. *Rev. Salud Animal.*, **13**, 177–179.
4. BOCK R.E., DE VOS A.J., LEW A., KINGSTON T.G. & FRASER I.R. (1995). Studies on failure of T strain live *Babesia bovis* vaccine. *Aust. Vet. J.*, **72**, 296–300.
5. BOCK R.E., LEW A.E., MINCHIN C.M., JESTON P.J. & JORGENSEN W.K. (2000). Application of PCR assays to determine the genotype of *Babesia bovis* parasites isolated from cattle with clinical babesiosis soon after vaccination against tick fever. *Aust. Vet. J.*, **78**, 179–181.
6. BOSE R., JORGENSEN W.K., DALGLIESH R.J., FRIENDHOFF K.T. & DE VOS A.J. (1995). Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol.*, **57**, 61–74.
7. CALDER J.A.M., REDDY G.R., CHIEVES L., COURTNEY C.H., LITTELL R., LIVENGOOD J.R., NORVAL R.A.I., SMITH C. & DAME J.B. (1996). Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 2748–2755.
8. CALLOW L.L. (1984). Animal Health in Australia, Vol. 5. Protozoal and Rickettsial Diseases. Australian Bureau of Animal Health, Australian Government Publishing Service, Canberra, Australia.
9. CHAUVIN A., L'HOSTIS M., VALENTIN A., PRECIGOUT E., CESBRON-ZEGGANE N. & GORENFLOT A. (1995). *Babesia divergens*: an ELISA with soluble parasite antigen for monitoring the epidemiology of bovine babesiosis. *Parasite*, **2**, 257–262.
10. CHRISTENSSON D.A. (1987). Clinical and serological response after experimental inoculation with *Babesia divergens* of newborn calves with and without maternal antibodies. *Acta Vet. Scand.*, **28**, 381–392.
11. DALGLIESH R.J. (1993). Babesiosis. In: Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections. K.S. Warren, ed. Blackwell, Oxford, UK, 352–383.
12. DALGLIESH R.J., JORGENSEN W.K. & DE VOS A.J. (1990). New Australian vaccines for the control of babesiosis and anaplasmosis in the world cattle trade. *Trop. Anim. Health Prod.*, **22**, 44–52.
13. DE ECHAIDE S.T., ECHAIDE I.E., GAIDO A.B., MANGOLD A.J., LUGARES C.I., VANZINI V.R. & GUGLIELMONE A.A. (1995). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay kit to detect *Babesia bovis* antibodies in cattle. *Prev. Vet. Med.*, **24**, 277–283.
14. DE VOS A.J. & JORGENSEN W.K. (1992). Protection of cattle against babesiosis in tropical and subtropical countries with a live, frozen vaccine. In: Tick Vector Biology: Medical and Veterinary Aspects, Fivaz B., Petney T. & Horak I., eds. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 159–174.
15. EDELHOFER R., KANOUT A., SCHUH M. & KUTZER E. (1998). Improved disease resistance after *Babesia divergens* vaccination. *Parasitol. Res.*, **84**, 181–187.
16. EL-GAYSH A., SUNDQUIST B., CHRISTENSSON D.A., HILALI M. & NASSER A. M. (1996). Observations on the use of ELISA for detection of *Babesia bigemina* specific antibodies. *Vet. Parasitol.*, **62**, 51–61.
17. FIGUEROA J.V., CHIEVES L.P., JOHNSON G. S. & BUENING G. M. (1992). Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2576–2582.
18. FRIEDHOFF K.T. (1988). Transmission of *Babesia*. In: Babesiosis of Domestic Animals and Man, Ristic M., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 23–52.
19. 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.
20. FRIEDHOFF K.T., GANSE-DUMRATH D., WEBER C. & MULLER I. (1989). Epidemiology and control of *Babesia divergens* infections in northern Germany. In: Proceedings of Eighth National Veterinary Haemoparasite Disease Conference, Hidalgo R.J., ed. Louisiana State University, Baton Rouge, USA, 441–449.

21. GRAY J.S., KAYE B., TALTY P.J. & MCSWEENEY C. (1995). The field use of a gerbil-derived and drug controlled live vaccine against bovine babesiosis in Ireland. *Irish Vet. J.*, **48**, 358–362.
22. HOLMAN P.J., FRERICHS W.M., CHIEVES L. & WAGNER G.G. (1993). Culture confirmation of carrier status of *Babesia caballi*-infected horses. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 698–701.
23. JORGENSEN W.K. & WALDRON N S.J. (1994). Use of *in vitro* culture to isolate *Babesia bovis* from *Theileria buffeli*, *Eperythrozoon wenyoni* and *Anaplasma* spp. *Vet. Parasitol.*, **53**, 45–51.
24. JORGENSEN W.K., WALDRON S.J., MCGRATH J., ROMAN R.J., DE VOS A.J. & WILLIAMS K.E. (1992). Growth of *Babesia bigemina* parasites in suspension cultures for vaccine production. *Parasitol. Res.*, **78**, 423–426.
25. KUNG'U M.W. & GOODGER B.V. (1990). A slide enzyme-linked assay (SELISA) for the diagnosis of *Babesia bovis* infections and for the screening of *Babesia*-specific monoclonal antibodies. *Int. J. Parasitol.*, **20**, 341–345.
26. MADRUGA C.R., KESSLER R.H., SCHENK M.A.M., HONER M.R. & MIQUITA M. (1995). Analise de testes de congulinacao rapida para deteccao de anticorpos contra *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, **47**, 649–657.
27. 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.
28. MELLORS L.T., DALGLIESH R.J., TIMMS P., RODWELL B.J. & CALLOW L.L. (1982). Preparation and laboratory testing of a frozen vaccine containing *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma centrale*. *Res. Vet. Sci.*, **32**, 194–197.
29. 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.
30. MOLLOY J.B., BOWLES P.M., JESTON P.J., BRUYERES A.G., BOWDEN J.M., BOCK R.E., JORGENSEN W.K., BLIGHT G.W. & DALGLIESH R.J. (1998). Development of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle in Australia. *Parasitol. Res.*, **84**, 651–656.
31. MONTENEGRO-JAMES S., GUILLEN T. & TORO M. (1992). Dot-ELISA para diagnostico serologico de la anaplasmosis y babesiosis bovina. *Rev. Cientifica [FCV de Luz.]*, **2**, 23.
32. MONTENEGRO-JAMES S., TORO M., LEON E., GUILLEN A.T., LOPEZ R. & LOPEZ W. (1992). Immunisation of cattle with an inactivated polyvalent vaccine against anaplasmosis and babesiosis. *Ann. NY Acad. Sci.*, **653**, 112–121.
33. MUSOKE A.J., PALMER G.H., McELWAIN T.F., NENE V. & MCKEEVER D. (1996). Prospects for subunit vaccines against tick-borne diseases. *Br. Vet. J.*, **152**, 621–639.
34. PIPANO E. (1981). Frozen vaccine against tick fevers of cattle. In: XI International Congress on Diseases of Cattle, Haifa, Israel. Mayer E., ed. Bregman Press, Haifa, Israel, 678–681.
35. SALEM G.H., LIU X.-J., JOHNSRUDE J.D., DAME J.B. & ROMAN REDDY G. (1999). Development and evaluation of an extra chromosomal DNA-based PCR test for diagnosing bovine babesiosis. *Mol. Cell. Probes*, **13**, 107–113
36. SPARANGAO O. (1999) Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species. *J. Vet. Parasitol.*, **13**, 83–92.
37. 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 polyvinyl pyrrolidone (PVP). *Aust. Vet. J.*, **75**, 62–63.
38. 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.
39. WINGER C.M., CANNING E.U. & CULVERHOUSE J.D. (1989). A strain of *Babesia divergens* attenuated after long-term culture. *Res. Vet. Sci.*, **46**, 110–113.

*
* *