

## הערכת עמידות של בקר מבוגר מפני קדחות קרצית לאחר חיסון חוזר - 2005

ע"י:

ורדה שקאפ	חטיבה לפרזיטולוגיה, מכון וטרינרי, בית דגן
זלמן הנקין	המחלקה למשאבי טבע, מכון וולקני, בית דגן
בני לייבוץ	חטיבה לפרזיטולוגיה, מכון וטרינרי, בית דגן
מולד תיא	חטיבה לפרזיטולוגיה, מכון וטרינרי, בית דגן
פיש לאה	חטיבה לפרזיטולוגיה, מכון וטרינרי, בית דגן
קריגל יורי	חטיבה לפרזיטולוגיה, מכון וטרינרי, בית דגן
סוויצקי איגור	חטיבה לפרזיטולוגיה, מכון וטרינרי, בית דגן
הררי יוסי	שה"מ/ בע"ח
מזוז מונוקה	חטיבה לפרזיטולוגיה, מכון וטרינרי, בית דגן
פליידרוביץ לודמילה	חטיבה לפרזיטולוגיה, מכון וטרינרי, בית דגן

### תקציר

המחלות הנגרמות ע"י חד- תאיים המטפילות כדורות דם אדומות של בקר ומועברות על ידי קרציות (*בבזיה ביגמינה*, *ב.בוביס* ו*תיילריה אנולטה*) מהוות מכשול כלכלי רב בתעשיית הבקר באזורים רבים בעולם, לרבות ישראל. הדברה יעילה של המחלות הללו מבוססת על חיסון מונע עם תרכיבים המכילים טפילים ממויירים וחיים. התרכיב מוזרק פעם בחיי הבהמה, כאשר חסינות נתמכת ונמשכת ע"י חשיפתו של הבקר השוהה בשדה לקרציות מודבקות בטפילי קדחות. בהעדר חשיפה מתמדת בחלק מהבקר החסינות נחלשת או יורדת ובקר זה נעשה רגיש להדבקות חוזרות לקרציות שנושאות טפילים אלימים. לא ידוע משך חסינותו של בקר אשר חוסן בצעירותו ולא נחשף לטפילים בשדה. בקר באזור אנדמי שחוסן לפני ארבע שנים נמצא שלילי ברובו הן בבדיקות סרולוגיות והן ב PCR. לכן, בוצע בחלק מהבקר חיסון חוזר נגד בבזיוזיס ותיילריוזיס. בעבודה הנוכחית נעשה מעקב ברמת נוגדנים ונשאות טפילי *בבזיה* ו*תיילריה* לאחר חיסון חוזר. מתוצאות שהתקבלו עולה ששנתיים אחרי חיסון חוזר רוב העדר נושא טפילים ונוגדנים *לבבזיה ביגמינה*. תוצאות דומות נמצאו בקבוצת ביקורת, דבר שמצביע על חשיפת הבקר לקרציות נגועות בשדה. כמחצית הבקר שחוסן נגד *ב.בוביס* נושא DNA טפילי, וכמעט כל העדר חיובי סרולוגית. לעומת זאת, בקבוצת ביקורת אחוז נשאים של הטפילים הנו מזערי, למרות שהבקר הנו בעל רמה סבירה של נוגדנים ייחודיים. בהעדר תחלואה מבבזיוזיס יתכן שלגבי *ב.בוביס* פיתח בקר "חיסון סטרילי", שמשך חסינותו קצרה יחסית. חיסון חוזר נגד *תיילריה* לא שינה ממצאים הנמוכים ב PCR ולא נצפתה עליה בכייל נוגדנים בעקבות הזרקת טפילים הומולוגיים. נראה גם שבמהלך השנה לא היתה הוקעה בקרציות נגועות *בתיילריה*. שני תרכיבי *תיילריה*, שיגרתי וזה שהוכן מזן טפילים שונה, מכילים טפילים ממויירים.

### מבוא

טפילי דם חד- תאיים, *בבזיה ותיילריה*, והרקטסיות מסוג *אנפלזמה* המועברים על ידי קרציות למיניהן, גורמים לקבוצת מחלות בבקר הקרויות "קדחות הקרצית". קדחות הקרצית כוללות בבזיוזיס, הנגרמת

על-ידי טפילי בבזיה בוביס או בבזיה ביגמינה. תיילריוזיס הנגרמת על-ידי תיילריה אנולטה, ואנפלזמוזיס, הנגרמת ע"י אנפלזמה מרגינלה. המחלות מאופיינות בהתפתחות אנמיה קשה, איבוד משקל, ירידה בתנובת החלב, עיכוב בהתפתחות ואף לתמותה. בישראל המחלות הללו גורמות נזקים כבדים למשק הבקר לבשר. להפחתת נזקים מקדחות קרצית מבצעים המשקים פעולות הדברה כימית נגד קרציות, אך הדברה כימית של הקרציות העולות וניזונות על הבקר או על מכרסמים במרעה יקרה יחסית, דורשת ריכוז הבקר במשק, איננה מתאימה כאשר מעבירים בקר ממקום אחד למשנהו, יעילותה מקומית בלבד ולזמן קצר יחסית. כמו כן לחומרי הדברה יש השלכות שליליות על איכות הסביבה ובריאות הציבור והמגמה היום להפחית ככל שניתן שימוש בחומרי הדברה.

להדברת קדחות קרצית בישראל ובמספר מדינות בעולם הסובלות ממחלות אלה נהוג לחסן בקר פעם אחת בחיים בתקופת הגמילה, בגיל 6-9 חודשים. התרכיבים המשמשים לחיסון מכילים טפילים חיים, ממויירים והם יעילים ומגינים על הבקר בחשיפה לקרציות נגועות בטפילים אלימים. סוגיית משך החסינות של הבקר בעקבות חיסון טרם הוכרעה, דווח על אורכי זמן שונים בספרות מדעית הנעים בין 3-4 שנים ועד מספר חודשים בלבד. בשנים האחרונות במספר משקים של בשר לבקר נרשמה תחלואה והתפרצויות קשות בקרב בקר שחוסן בעבר. במספר משקים חלה בקר זמן קצר יחסית לאחר חיסון. לתופעה זו תתכנה מספר סיבות: אי חשיפה ממושכת לקרציות נגועות, הופעת זנים של טפילים בעלי שונות אנטיגנית, ירידה ברמת העמידות של הבקר המבוגר שחוסן בעבר. בקר שלא נחשף להוקעה בקרציות נגועות הופך לרגיש להדבקות עם טפילים אלימים. בארבע שנים האחרונות בוצע מעקב לאחר עמידותו להדבקות חוזרות בבזיוזיס של עדר בקר לבשר שחוסן נגד גורמי קדחות והרועה באזור אנדמי. בעדר זה לא נצפתה תחלואה במשך 3 שנות המעקב, עם זאת מבדיקות מעבדתיות נמצא שאצל רוב הפרות בעדר היו מבחני PCR שליליים, דבר שהצביע עם רמה נמוכה של נשאות טפילים, ובנוסף אצל רוב הבקר לא נמצאו נוגדנים סגוליים לשתי הבזיות. לאור עובדה זו ובהסתמך על ידע שהצטבר לגבי מצב של premunition כגורם לחסינות בקר, חוסן בקר זה שנית בטפילי בבזיה ביגמינה, בוביס ותיילריה אנולטה על מנת לברר באם ניתן למנוע תחלואה מקדחות ע"י חיסון חוזר.

### מטרות המחקר:

1. מעקב קליני ומעבדתי לגילוי DNA טפילי (של בבזיה ותיילריה).
2. קביעת רמת חיסון הומורלי ע"י בדיקת רמת נוגדנים סגוליים לטפילים האלה.
3. פיתוח תרכיב הטרוולוגי לחיסון חוזר נגד תיילריה.

### פירוט הניסויים ותוצאות

דגימות דם מבקר נגוע נאספו למבחנות המכילות EDTA ונשטפו ב-PBS ע"י סירכוזים ב-800xg. לאחר סילוק תאי דם לבנים ונסיוב נשטפו תאי דם אדומים 3 פעמים והוקפאו ב-70 מ"צ עד הפקת דנ"א. לאחר ההפשרה, סולק ההמוגלובין שהשתחרר מהתאים אדומים ע"י 3-4 שטיפות ב-PBS וסירכוז נוסף ב-10,000 סל"ד למשך 5 דקות. מהמשקע שהכיל טפילים וממברנות של תאים אדומים הופק דנ"א טפילי. הפקת חומצות גרעין מטפילים נעשתה בעזרת ערכה (Puregene) extraction kit DNA לפי הוראות היצרן. דם מעגל לא מודבק שעובד באותם התנאים שימש כבקורת שלילית. ה-DNA נשמר ב-20 מ"צ עד לשימוש.

לגילוי *בניזיה בוביס* תוכננו שני זוגות תחלים, התחלים שנבחרו ל והתבססו על רצפים של גן המקודד לחלבוני המעטפת של המרוזויטים (GenBank accession number M38218) Mishra et al. (1992) לגילוי טפילי *ב.ביגמינה* בעזרת PCR תוכננו תחלים שהיו מבוססים על פרסום רצפים ע"י Mishra et al. (1992), מ GenBank accession number M5185. רצפים אלה מקודדים לחלבונים של המרוזויטים המתרבים בכדוריות דם אדומות.

לגילוי טפילי *תיילריה אנולטה* תוכננו תחלים מרצפים שמקודדים למרוזויטים Tamsi-I mRNA allele אשר פורסמו ע"י d'Oliveira (1995) GenBank , accession number (U22887)

### **nested PCR לאנפלזמה מרגינלה וא. צנטרלה**

לביצוע nested PCR תוכננו שני זוגות תחלים. התחלים שנבחרו כדי לאבחן הדבקה באנפלסמה מרגינלה התבססו על רצף ספציפי של אנפלזמה מרגינלה המבוסס על הגן MSP1b של א.מרגינלה (GenBank accession no M59845)(Camacho-Nuez et al., 2000) לגילוי א.צנטרלה המשמשים לחיסון שגרתי של בקר בשדה ולהבדלה מהדבקות עם א. מרגינלה בוצעו המבחנים עם תחלים מהרצף הספציפי של א.צנטרלה mpb58.seg כפי שתואר ע"י (Shkap et al., 2002).

### **מבחן ה-PCR**

מבחני ה-PCR בוצעו בריכוז הסופי של 10ng-5 דנ"א גנומי כל מרכיב בתערובת בנפח של 25 מק"ל וכללו:  $0.004\mu\text{M}$  מכל תחל חיזוני,  $0.5\mu\text{M}$  מהתחלים הפנימיים,  $0.5\text{mM}$  של  $1\times$  dNTP, PCR בופר,  $2.5\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$  ו  $0.75$  יחידות של Takara Ex Taq. הכמות המוגבלת של התחלים החיצוניים מפרידה בין שני המחזורים של ההגברה. שלב ראשון כלל דנטורציה של 95 מעלות במשך 3 דקות ולאחר מכן 14 מעגלים של 94 מעלות 50 שניות, 60 מעלות 50 שניות, 72 מעלות 50 שניות, ועוד 26 מעגלים של 94 מעלות במשך 50 שניות, 49 מעלות 30 שניות, 72 מעלות 30 שניות ושלב סופי נוסף של 72 מעלות במשך 5 דקות. תוצרי ההגברה נבדקו ע"י הרצתם בגיל אגרוז ב  $0.8\%$  עד  $1.5\%$  בהתאמה לגודל המקטע המצופה.

### **מבחנים סרולוגיים**

נוכחות הנוגדנים ורמתם בדם הבקר נבדקו בעזרת מבחן ה IFA כפי שתואר בספרות המדעית (Goldman et al., 1972). האנטיגנים לבדיקות הנוגדנים של כל הטפילים הוכנו במעבדה לפרזיטולוגיה, פרט למבחן cELISA לבדיקות א.צנטרלה. כל החומרים למבחן זה פותחו והועברו לישראל באדיבותו של דר' Molloy מאוסטרליה (Molloy et al., 2001).

## מעקב פרזיטולוגי

במהלך השנה שחלפה נערכו ביקורים במשק בו מתבצע מעקב אחר שני גזעי בקר לבשר עיקריים: הדראוטמסטר מאוסטרליה ובקר מעורב מקומי. כמו כן, היו בעדר כ-15 ראשי בקר מגזע באלדי שחוסן שנכללו במחקר זה. מכל הבקר נלקחו משטחי דם, דגימות לסרולוגיה ו-PCR.

## תוצאות:

### חיסון חוזר נגד בבזיוזיס

במהלך שנת העבודה האחרונה לא נצפתה תחלואה או תמותה מקדחות קרצית. במשטחי דם לא נמצאו טפילי דם בעדר פרט, עם זאת נמצאו א. צנטרלה בכ 10% מהבקר. בטבלה 1 ניתן לראות תוצאות בדיקה סרולוגית של בקר שבחלקו הגדול חוסן שנית עם טפילים הטרולוגיים (מזן שונה מזה שהיה בתרכיב). עשרים בהמות לא חוסנו שנית ושימשו כקבוצת ביקורת. מהתוצאות שהתקבלו נראה שהזרקת תרכיבים לא תרמה מספרית להעלאת מספר הבהמות הנושאות נוגדנים ל. ביגמינה, אחוז חיוביים סרולוגית בקבוצה שחוסנה וזאת של הביקורת 61% ו-60% בהתאמה. מעניין לציין שלגבי ב. בוביס אחוז הבקר עם כייל נוגדנים סגוליים היה אף במקצת נמוך יותר לעומת קבוצת ביקורת. יש לציין שבקר בעדר זה נשאר נושא של נוגדנים לשני סוגי הבבזיות מעל 80% שלוש שנים לאחר חיסון ראשוני. רמה כה גבוהה של בקר חיובי מצביעה על חשיפת העדר לקרציות נגועות בטפילי ב. ביגמינה. הנחה זו נתמכת ע"י תוצאות של מבחני PCR שהראו כי לפני חיסון חוזר הנשאות של טפילי ב. ביגמינה הייתה בקרב 70% מהבקר. לעומת זאת, תוצאות בדיקות PCR ל. בוביס לפני חיסון חוזר הראו רק 20% חיוביים. נראה איפה שלפני חיסון חוזר הבקר היה רגיש להדבקות עם קרציות. בטבלה 2 מוצגות תוצאות של בדיקות PCR שנעשו על 63 בהמות שחוסנו שנית ו-13 פרות ביקורת עד 9 חודשים לאחר חיסון חוזר. התוצאות מראות ירידה במס' בעלי חיים חיוביים הן ל. ביגמינה (33%) ול. בוביס 23% מתוך המחסונות, ומתוך קבוצת הביקורת רק מחצית מבע"ח נשארו חיוביים ל. ביגמינה, ו 7% בלבד ל. בוביס. בטבלה 3 שבה מסוכמות תוצאות סרולוגיות נראה כי רוב בע"ח 98% היו בעלי כייל חיובי לשתי ה בבזיות 7 עד 9 חודשים לאחר חיסון. תוצאות אלה מחזקות ממצאים קודמים על כך שתגובה חיסונית הומורלית נמשכת בבקר זמן מה ללא נוכחות טפילים, מצב של חיסון "סטרילי" שתואר באוסטרליה ובדרום אפריקה. על פי De Waal, (1996) בבקר שטופל עם תכשירים רפואיים (chemosterilization of infection) נשמרה חסינות ל. בוביס במשך יותר מ 3 שנים, ואילו ל. ביגמינה בקר הפך לרגיש 16 לאחר טיפול. לאור העובדה שכמעט כל הבקר חיובי סרולוגית עם כייל נוגדנים משמעותי ניתן להסיק שחסינות העדר לבבזיוזיס היא ברמה סבירה. מבדיקות מעבדתיות שבוצעו שנתיים לאחר חיסון חוזר נמצא (טבלה 4), מספר חיוביים ב- IFA ל. ביגמינה ירד מ 98% ל- 78.3%, ואילו ל. בוביס נמצאו 94.5% ראשי בקר עם כייל יחודי לטפיל זה. תוצאות ב PCR מצביעים על חוסר ההוקעה בטפילי ב. בוביס בשדה, כי מספר בע"ח נושאי DNA טפילי ירד הן בקבוצה שחוסנה שנית, והן בקבוצת ביקורת. עם זאת, נשמרה תגובה הומורלית כמעט בכל העדר.

טבלה 1. תוצאות בדיקות סרולוגיות לנוכחות נוגדנים פלואורסצנטים (IFA) בבקר שנה לאחר חוסן חוזר בתרכיבים נגד טפילי בבזיוה (n=86)

בע"ח	שנבדקו	עם כייל נוגדנים לב.ביגמינה (%)	עם כייל נוגדנים לב.בוביס (%)
חוסנו שנית	66	54 (61)	62 (72)
לא חוסנו שנית	20	12 (60)	16 (80)

טבלה 2. תוצאות בדיקות ב PCR כ- 18 חודשים לאחר חיסון חוזר נגד בבזיוזיס ( n=76 )

תוצאות המבחנים ב- PCR	סה"כ חוסנו שנית ( n = 63 )	סה"כ בקבוצת ביקורת ( n = 13 )
% חיוביים לב.ביגמינה	33	50
% חיוביים לב.בוביס	23	7

טבלה 3. התפלגות כייל נוגדנים ב IFA בבקר 18 חודשים לאחר חיסון חוזר (n=49)

סוג הטפילים	אחוז הבקר עם כייל נוגדנים			% סה"כ חיוביים
	שילי	1: 64	1: 256	
ב.בוביס	1	28	20	98
ב.ביגמינה	1	18	30	98

טבלה 4. תוצאות בדיקות סרולוגיות ו PCR שנתיים אחרי חיסון חוזר.

תוצאות המבחנים ב PCR (%)	בקר שקיבל חיסון חוזר (n=43)	בקר בקבוצת ביקורת (n=8)
חיוביים לב.ביגמינה	60.4	87.5
חיוביים לב.בוביס	46.5	12.5
תוצאות המבחנים ב IFA (%)	בקר שקיבל חיסון חוזר (n=74)	בקר בקבוצת ביקורת (n=11)
חיוביים לב.ביגמינה	78.3	54.5
חיוביים לב.בוביס	94.5	100

#### חיסון חוזר נגד תיילריזיס

בעדר של משק גונן שהיה במעקב מספר שנים אחרי חיסון נגד כל גורמי קדחות נמצא שאחרי 3 שנים הרוב המכריע של הבקר שלילי לטפילי תיילריה סרולוגית וב-PCR. בדומה לחיסון נגד בזזיות, העדר הוזרק שנית עם תרכיב תיילריה המכיל אותו זן שהיה בחיסון הראשוני. עשרים בע"ח לא חוסנו ושימשו כביקורת. מתוך 54 דגימות נסיונים שנבדקו סרולוגית שנה אחרי חיסון חוזר נמצאו 17% חיוביים לתיילריה, ומתוך 11 נסיונים של בקר ביקורת 2 נמצאו חיוביים (18%). ב-PCR התקבלו תוצאות דומות, עם 23% חיוביים בבקר שהוזרק בפעם נוספת. רמת הנשאים בעדר היה דומה (עד 20% חיוביים) בהשוואה לבקר נשא טפילים או נוגדנים לתיילריה לפני חיסון חוזר. נראה איפה שהזרקתו של תרכיב ההומולוגי לא תרם לעליה במספר בקר חיובי סרולוגית או ב-PCR. על מנת לבחון יעילות חיסון עם זן הטרולוגי הוכנו תרכיבים מזו המשמש לחיסון שגרתי (זן T) ובנוסף מזן אחר (זן K). שני התרכיבים הוזרקו בשדה לקבוצת בני בקר צעירים. במהלך המעקב (סה"כ 51 בשתי קבוצות) אף אחד מבע"ח שהוזרקו לא פיתח סימני מחלה, שני התרכיבים, השגרתי וזה החדש, מכילים טפילים ממויירים. הבדיקות סרולוגיות שבוצעו כחצי שנה אחרי חיסון הראו ש 59% מהבקר שקיבל חיסון K היה חיובי עם כיל ברמה של 1:64 ו 1:256. לעומת זאת, בקר שחוסן עם תרכיב שגרתי מזן T לרוב היה שלילי סרולוגית, רק ב- 54% נמצאו נוגדנים בכיל של 1:64 בלבד. בתיילרוזיס, רמת הנוגדנים איננה מהווה מדד למידת חסינותו של בע"ח, בספרות המדעית תואר שבקר עם כיל של 1:16 היה עמיד להוקעה עם קרציות נגועות (Shkap and Pipano, 2000). במבחני PCR 82% מהבמות היו חיוביים בעקבות חיסון עם זן K ו- 62.5% בעקבות תרכיב שיגרתי (טבלה 5). תוצאות PCR מעידות שהרוב המכריע של בקר הנו נשא טפילי תיילריה, ונראה שטפילים בתרכיב מזן K נשארים בבהמות זמן ארוך יותר

בהשוואה לטפילים בתרכיב מזן T. נראה שבקר בשתי הקבוצות לא נחשף להוקעה בקרציות נגועות *תניילריה*, עם זאת, כאמור מספר נמוך של בע"ח חיוביים סרולוגית אינו בהכרח מדד לחסינות הבקר בעדר לתיילריוזיס. תגובה חיסונית ל*תניילריה* מבוססת בעיקר על תגובה תאית (Preston et al., 1999; Shkap and Pipano, 2000). נשאות לטפילי *תניילריה* בבע"ח אינה בהכרח מעידה על נוכחות נוגדנים באותה בהמה (Darghouth et al., 1996). כך גם לפי תוצאות עבודה הנוכחית, יותר בע"ח הם נושאי DNA טפילי (חיוביים ב-PCR) מאשר חיוביים סרולוגית. לממצאים אלה יש משקל רב לגבי הערכת חסינותו של העדר בפני תיילריוזיס.

טבלה 5. תגובות בקר להזרקת תרכיבים מי שני זנים שונים נגד *תניילריה אנולטה* חצי שנה לאחר חיסון

תרכיב מזן :	מס' בהמות שחוסנו	חיוביים סרולוגית (%)	חיוביים ב-PCR (%)
T	33	54	62.5
K	40	59	82

#### מסקנות והשלכותיהן על המשך ביצוע המעקר

- על פי התוצאות שהתקבלו במהלך השנה האחרונה נראה ששנתיים אחרי חיסון חוזר רוב העדר נושא טפילים ונוגדנים ל*תניילריה ביגמינה*. תוצאות דומות נמצאו בקבוצת ביקורת, דבר שמצביע על חשיפת הבקר לקרציות נגועות בשדה.
- כמחצית הבקר שחוסן נגד *בוביס* נושא DNA טפילי, וכמעט כל העדר חיובי סרולוגית. לעומת זאת, בקבוצת ביקורת אחוז הנשאים של הטפילים הנו מזערי, למרות שהבקר עם רמת נוגדנים ייחודיים סבירה. בהעדר תחלואה מבביוזיס יתכן שלגבי *בוביס* פיתח הבקר "חיסון סטרילי", שמשך חסינותו קצרה יחסית.
- חיסון חוזר נגד *תניילריה* לא שינה ממצאים הנמוכים ב-PCR או סרולוגיים בעקבות הזרקת טפילים הומולוגיים. נראה גם שבמהלך השנה לא היתה הוקעה בקרציות נגועות ב*תניילריה*.
- שני תרכיבי *תניילריה*, שיגרתיו וזה שהוכן מזן טפילים חדש, מכילים טפילים ממויירים.

#### רשימת פרסומים:

Darghouth, M., Bouattour, a., Ben Miled, L. and Sassi, L. 1996. Diagnosis of *Theileria annulata* infection of cattle in Tunisia: comparison of serology and blood smears. Vet. Res., 27: 613-621.

- D'Oliveira C., Vandermerve M., Habela M., Jacquet P. & Jongejan F. (1995).  
Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. J.  
Clin. Microbiol., 33, 2665–2669.
- DeWaal, D., 1996. Vaccination against babesiosis. Acta Parasit. Turcica. 20, 487-  
499.
- Camacho, M., Suarez, C. and Palmer, G. 1998. Polymorphism in the  
*Anaplasma marginale* msp 1-b gene family. EMBL/GenBank/DDBJ  
databases, Unpublished.
- Goldman, M., Pipano, E., Rosenberg, A. 1972. Fluorescent antibody test for  
*Babesia bigemina* and *Babesia berbera*. Res. Vet. Sci., 13: 77-81.
- Mishra, V., McElwain, T., Dame, J. and Stefens, E. 1992. Isolation, sequence  
and differential expression of the p58 gene family of *Babesia bigemina*.  
Mol. Biochem. Parasitol., 53: 149-158.
- Molloy, J., Bock, R., Templeton, J., Bruyeres, A., Bowles, P., Blight, G.,  
Jorgensen, W. 2001. Identification of antigenic differences that  
discriminate between cattle vaccinated with *Anaplasma centrale* and  
cattle naturally infected with *Anaplasma marginale*. Int. J. Parasitol.,  
31, 179-186.
- Preston, P., Hall, R., Galss, E., Campbell, J., Darghouth, M., Ahmed, J., Shiels,  
R., Spooner, R., Jongejan, F., Brown, C. 1999. Innate and adaptive  
immune responses co-operate to protect cattle against *Theileria*  
*annulata*. Parasitol. Today, 15, 7: 268-274.
- Shkap, Varda and Pipano E. 2000. Culture-derived parasites in vaccination of  
cattle against tick-borne diseases Ann. N.Y. Acad. Science, 916: 154-  
171.