

LA RESPUESTA INMUNE CELULAR EN ANAPLASMOSIS BOVINA

CARLOS RAMÓN BAUTISTA GARFIAS

*Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias
en Parasitología Veterinaria
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y
Agropecuarias. SAGAR. Apartado Postal 206,
CIVAC 62500, Cuernavaca, Morelos.*

I.	Introducción	315
II.	Invasión de la célula huésped	316
III.	Respuesta inmune del huésped	317
	1. Innata o natural	317
	2. Adquirida o inmunitaria	318
	a) Humoral	318
	b) Celular	318
IV.	Inmunoprofilaxis	321
V.	Conclusiones	321
	Referencias	324

I. Introducción

La anaplasmosis es una enfermedad que se caracteriza por provocar anemia severa, abortos y alta mortalidad en el ganado vacuno. El agente etiológico es la bacteria intraeritrocítica obligada *Anaplasma marginale*, la cual es transmitida biológicamente en la naturaleza por garrapatas de la familia ixodidae y mecánicamente por dípteros hematófagos de la familia *Tabanidae* (24). La prevalencia de la enfermedad en zonas ganaderas con

climas tropicales o subtropicales generalmente excede el 50%, inclusive se ha informado de prevalencias del 90% en Sudamérica y en Australia (36,41). Por el contrario, la prevalencia en áreas más templadas frecuentemente es menor al 50% (26). En este contexto, durante los últimos 10 años en la República Mexicana, se han determinado, por medio de serología prevalencias del 9, 33.3, 56 y 93.3% en las zonas: Altiplano, Costera del Golfo, Norte de Veracruz y Oriente de Yucatán respectivamente (1, 19,43). En el estado de Yucatán, se demostraron prevalencias de entre 50 (animales de 3 meses a 36 meses de edad) y 76% (bovinos adultos de mas de tres años de edad) por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (17).

La anaplasmosis es responsable de pérdidas importantes en la ganadería de México. Tan sólo en 1980 (13) se estimaron pérdidas por mas de tres mil millones de pesos considerando costos de tratamientos, bajas de producción en animales convalecientes, mortalidad y abortos. En costos actuales, dicha cifra representaría aproximadamente 400 millones de pesos.

II. Invasión de la célula huésped

En el huésped vertebrado, *Anaplasma* infecta eritrocitos maduros ocurriendo la formación de una vacuola derivada del eritrocito alrededor del parásito (18). Cada *Anaplasma* tiene un diámetro de 0.55 a 0.85 μm y contiene agregados granulares densos en un protoplasma electrón-lucido, todo encerrado en una membrana doble de 40 a 50 nm de grosor (23). Dentro del eritrocito, la bacteria se replica por fisión binaria para formar hasta ocho organismos individuales dentro de una sola vacuola (40). Los anaplasmas salen del eritrocito utilizando un mecanismo no bien definido, pero aparentemente no lítico, e infectan eritrocitos adicionales (17). Después de la infección de un huésped rumiante,

el número de eritrocitos infectados se incrementa aparentemente al doble entre cada 24 y 48 horas. La infección se hace patente microscópicamente de dos a seis semanas después de la transmisión, dependiendo del número de organismos transmitidos y de la virulencia del aislado. En el pico de la infección más del 75% de los eritrocitos pueden ser infectados y se desarrolla una anemia severa que persiste durante una a dos semanas. Los animales susceptibles pierden peso significativamente y pueden abortar si están preñados. Se ha informado de hasta 36% de mortalidad en ganado con infección aguda (2). Los eritrocitos infectados con *Anaplasma* son rápidamente eliminados de la sangre con forma se desarrolla la inmunidad. Después de recuperarse de la infección aguda, los animales permanecen infectados con un bajo número, microscópicamente no visible, de anaplasmas en la sangre (24). El número de eritrocitos infectados en esta infección persistente, denominado estado de portador, varía dramáticamente (de $>0.000025\%$ a $<0.0025\%$) tanto entre animales portadores como temporalmente en un individuo (15). Esta variación puede influenciar significativamente la eficiencia de la transmisión por artrópodos a partir de animales individuales (24).

III. Respuesta inmune del huésped

1. *Innata o natural*

No se conoce mucho sobre este aspecto, pero probablemente se debe a características genéticas del individuo, así como a la raza y a la edad. En este contexto, se sabe que la anaplasmosis generalmente es moderada en becerros de hasta un año de edad; aguda pero raramente fatal en animales de hasta dos años de edad; aguda y ocasionalmente fatal en bovinos de hasta tres años de edad e hiperaguda y frecuentemente fatal en animales de más de tres años de edad. Cabe señalar que las crisis agudas

comúnmente se presentan de manera inesperada, sin haber existido una evidencia previa de la enfermedad (39).

2. *Adquirida o inmunitaria*

a) *Humoral*

Las infecciones por *A. marginale* en vacunos inducen una respuesta inmune tanto humoral como celular, aunque la primera probablemente desempeña un papel menor en la protección (39). En este orden, se ha informado que el suero de animales convalescientes da reacciones positivas a anticuerpos *anti-A. marginale* en diferentes pruebas serológicas como aglutinación, fijación del complemento e inmunofluorescencia indirecta; sin embargo, la transferencia de suero de animales inmunes a animales susceptibles no confiere protección contra la anaplasmosis (39). En este sentido, los anticuerpos opsonizantes de bovinos inmunizados con la proteína-I principal de superficie purificada (MSP-I) aumentan significativamente la fagocitosis *in vitro* de la cepa Florida de *Anaplasma marginale* mediada por macrófagos de bovino (10). Cabe señalar, sin embargo, que algunos anticuerpos producidos en la anaplasmosis bovina reaccionan con eritrocitos intactos de animales libres de *Anaplasma* (37), de tal forma que la fagocitosis de eritrocitos aparentemente no infectados, como se observa con frecuencia, puede ser causada por una respuesta autoinmune debido a alteraciones de la membrana de los eritrocitos provocadas por *Anaplasma* (37).

b) *Celular*

El papel crítico del bazo y funciones celulares "suprimibles" sugieren que la inmunidad protectora no es, como ya se indicó, estrictamente humoral. La inmunidad protectora en otras infecciones por rickettsias depende de la fagocitosis y muerte

llevadas a cabo por macrófagos activados (28,29). La fagocitosis, un mecanismo clave en la inmunidad contra *A. marginale*, puede ser adversamente afectado tanto por la esplenectomía (22) como por la supresión de la función de los linfocitos (12). En este orden, antígenos crudos de *A. marginale* han sido utilizados para evaluar algunos aspectos de la respuesta inmune celular de los bovinos contra esta rickettsia (8,9,11). Las pruebas utilizadas para tal propósito han sido la Inhibición de la migración de leucocitos en tubo capilar (MIF) y la Transformación blastoide (TB) (9); sin embargo, dichas técnicas sólo demostraron en forma muy limitada el papel de la inmunidad celular en la resistencia de los bovinos contra *A. marginale*; sobre todo si se considera que se utilizaron antígenos muy crudos. En este sentido, es difícil tener una idea aproximada del papel de los linfocitos, sobre todo T, en la respuesta inmune celular de *Bos taurus* y *B. indicus* contra dicho microorganismo.

En otras infecciones por organismos relacionados, se ha señalado el papel protector de la inmunidad celular; por ejemplo, en los casos de *Cowdria ruminantium* (14, 46), *Rickettsia tsutsugamushi* (28,29); *Ehrlichia risticii* (47, 48); asimismo, en protozoarios como *Theileria parva* (5) y especies de *Plasmodium* (45) y otros protozoarios parásitos (44).

Por otra parte, se ha señalado que los linfocitos THI (una subclase de linfocitos T cooperadores que producen principalmente IL-2 e IFN- γ) probablemente desempeñan un papel importante en la protección contra microorganismos patógenos intracelulares (42). En este sentido, se ha sugerido que las células NK y los macrófagos representan el brazo primitivo de la respuesta inmune celular, dependiente del IFN- γ contra patógenos intracelulares (20). Similarmente, se ha propuesto el uso de clones de células T cooperadoras como sondas para identificar antígenos de hemoparásitos (por ejemplo, *Babesia* spp) y caracterizar la

respuesta inmune protectora, lo cual podría facilitar la identificación de inmunógenos protectores (6.7).

De igual manera se ha demostrado que por medio del uso de anticuerpos monoclonales (Acm) es factible identificar distintos tipos celulares como los linfocitos T. del sistema linfoide del bovino (25). En el caso de anaplasmosis bovina. en un estudio en el que se utilizaron Acm (anti-BoCD2+, anti-BoCD4+ y anti-BoCD8+) en la técnica de citofluorometría de flujo de rayo láser. (4) se observó que los niveles de linfocitos BoCD4+ (T cooperadores) de sangre periférica en un animal recién recuperado. por medio del tratamiento con tetraciclinas era 9.5% arriba del límite normal máximo para esta clase de linfocitos (25-35%) (27.21). mientras que el nivel de BoCD8+ (T supresores/citotóxicos) estaba dentro de los límites mínimo y máximo normales (15-25%) (27.21) para esta clase de linfocitos.

Posteriormente el animal mencionado recayó y el nivel de BoCD4+ disminuyó mientras que el de BoCD8+ se conservó dentro de los límites considerados como normales. Cuando el bovino fue tratado otra vez con tetraciclinas la parasitemia disminuyó aumentando el nivel de BoCD4+ arriba del límite normal máximo sin que se alterase el nivel de BoCD8+. En este trabajo se sugirió que los linfocitos T BoCD4+ desempeñan un papel importante en la respuesta inmune de los bovinos contra *A. marginale* (4). Después en otro animal recién recuperado de anaplasmosis. se apreció un aumento de BoCD4+ del 27.4% arriba del límite máximo normal mientras que el nivel de BoCD8+ se encontraba dentro de los límites normales (Bautista *et al* datos no publicados).

Estas observaciones concuerdan con las de otros investigadores, (11) quienes señalan que animales infectados por primera vez con *A. marginale* virulento muestran una respuesta inmune celular elevada (determinada por medio de pruebas *in vitro*) que generalmente coincide con el desarrollo de signos clínicos. Una

vez que los animales son tratados y se recuperan de la fase aguda de la infección, estos presentan una inmunidad celular vigorosa y quedan clínicamente protegidos (11).

En relación con lo anterior, en la Figura 1 se presenta el probable modo de acción de la respuesta inmune de *Bos taurus* y *B. indicus* contra la infección por *A. marginale*.

IV. Inmunoprofilaxis

Se ha señalado que la incapacidad para cultivar *Anaplasma in vitro* ha impedido el desarrollo de vacunas efectivas (24). Hasta la fecha, la inmunización se practica por medio de la premunización (infección y tratamiento) o de la infección con cepas atenuadas de *Anaplasma* (39,49). En este orden, la identificación de antígenos de superficie de *Anaplasma* inductores de protección y la clonación y expresión de estos antígenos en *E. coli* recombinante proporcionan las bases para el desarrollo de vacunas no vivas (30). Dos proteínas de superficie la MSP-I (*major surface protein-1*) y la MSP-2 (*major surface protein-2*) han mostrado de manera particular que inducen protección en ganado vacuno inmunizado (32,33,34). Ambas proteínas de superficie comparten epitopos comunes con *A. centrale* y con varios aislados de *A. marginale* de África, Asia, Norteamérica y Sudamérica (35). Los genes que codifican las proteínas de superficie han sido expresadas en *E. coli* recombinante (3,30). No obstante lo anterior, se ha señalado que los mecanismos por medio de los cuales las proteínas MSP inducen protección aún son desconocidos (31).

V. Conclusiones

Con base en lo anterior, se concluye que para el desarrollo adecuado de agentes vacunales para controlar la anaplasmosis

bovina (por ejemplo, el uso de las proteínas de superficie, MSP) es necesario estudiar detalladamente la respuesta inmune protectora de *Bos indicus* y *B. taurus* contra *A. marginale*, lo cual por el momento se desconoce; sin embargo, las evidencias disponibles sugieren que la inmunidad celular desempeña un papel preponderante.

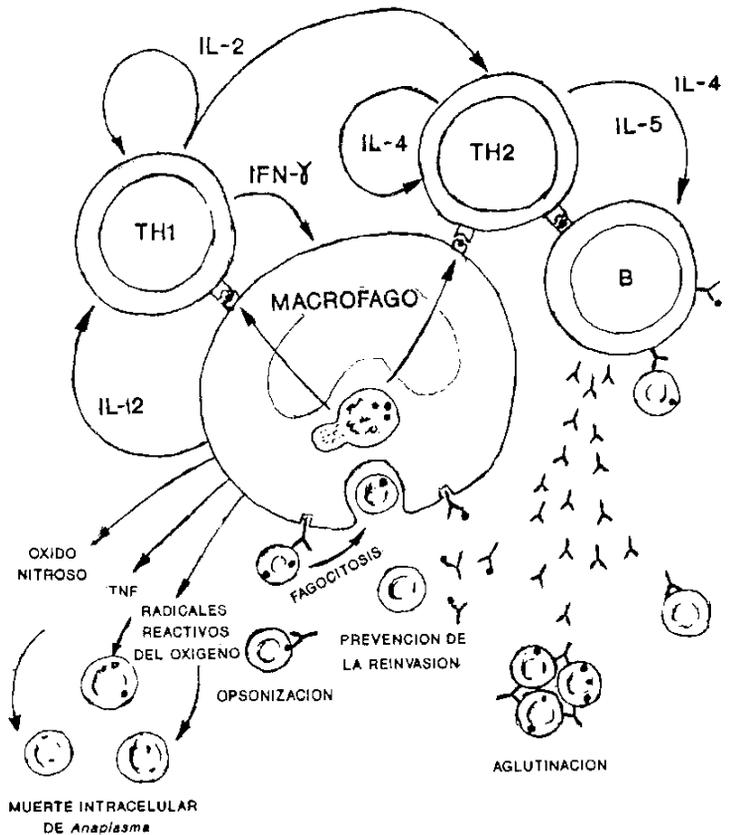


Fig. 1. Probable modo de acción de la respuesta inmune de *Bos taurus* y *B. indicus* contra la infección por *A. marginale*

Abreviaciones: IL-2, interleucina 2; IL-4, interleucina 4; IL-5, interleucina 5; IL-12, interleucina 12; TH1, linfocito T cooperador tipo 1; TH2, linfocito T supresor /citotóxico; B, linfocito B; TNF, factor de necrosis tumoral; IFN- γ . Una vez que un macrófago fagocita un eritrocito infectado con *A. marginale*, lo procesa y después presenta péptidos del organismo (ilustrado en forma de esferita) en la molécula de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) (dibujada sobre la superficie del macrófago) a los linfocitos TH I y TH2. Simultáneamente, el linfocito B, por medio de inmunoglobulinas de membrana ("Y"s sobre la membrana del linfocito B) detecta eritrocitos infectados con *Anaplasma* (dibujados como células pequeñas con esferitas dentro) y anaplasmas libres, los procesa y presenta sobre la molécula de clase II del CPH al linfocito TH2. El linfocito TH1 produce IL-2 que activa TH1 y TH2, además produce el IFN- γ que activa macrófagos y éstos a su vez producen IL-12 (que actúa sobre los TH I), óxido nítrico, TNF y radicales reactivos del oxígeno que provocan la muerte intracelular del organismo. En el caso del linfocito TH2, éste produce IL-4 e IL-5 que activan a los linfocitos B para que produzcan anticuerpos (dibujados como "Y"s), los cuales actúan opsonizando eritrocitos infectados contribuyendo a la fagocitosis, pero también pueden pegarseles, por reacción cruzada, a eritrocitos normales no infectados (eritrocito de abajo a la derecha). Además, los anticuerpos pueden prevenir la invasión de eritrocitos normales y aglutinar eritrocitos infectados. La fagocitosis de éstos también activa a los macrófagos.

Referencias

1. Aboytes Torres, R., Fernández Ruvalcaba, M., Reza Guevara, L.C., García de la Peña, J., Canto Alarcón, G.J.: Estudio serológico para la detección de anticuerpos contra *A. marginale* en ganado de lidia mediante la prueba de fijación del complemento en microplaca. *Tec. Pec. Mix.* 52: 105-109, 1986.
2. Alderink, F.J., Dietrich, R.: Anaplasmosis in Texas: epidemiologic and economic data from a questionnaire survey. En: *Proceedings of the Seventh National Anaplasmosis Conference*. Hidalgo, R.J., Jones, E.W. (ed.). Starkville, MI: Mississippi State University Press, pp. 27-44, 1981.
3. Barbet, A.F., Palmer, G.H., Myler, P.J., McGuire, T.e.: Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the Am 105L gene. *Infect. Immun.* 55: 2428-2435, 1987.
4. Bautista, G. C.R., Soto, e., Alvarado, A. F. J., García, T.O. y Rodríguez, C. S.: Estudio preliminar de la fluctuación de linfocitos T (BoCD4+, BoCD8+) en anaplasmosis bovina. *Vet. Mix.* 26 (Supl. num. 2): 25, 1995.
5. Brown, W.e., Sugimoto, e., Conrad, P.A., Grab, O.A.: Differential response of bovine T cell lines to membrane and soluble antigens of *Theileria parva*. *Parasite Immunol. I I:* 567-583, 1989.
6. Brown, W.e., Zhao, S., Woods, V.M., Oobbelaere, O.A.E., Rice-Ficht, A.e.: *Babesia bovis*-specific CD+ T cell clones from immune cattle express either the Th0 or Th I profile of cytokines. *Revue Elev. Med. Vit. Pays Trop.* 46: 65-69, 1993.
7. Brown, W.e., Rice-Ficht, A.e.: Use of helper T cells to identify potential vaccine antigens of *Babesia bovis*. *Parasitol. Today* 10: 145-149, 1994.
8. Buening, G.M.: Cell-mediated immune responses in calves with anaplasmosis. *Am. J Vet. Res.* 34: 757-763, 1973.

9. Buening, G.M.: Cell-mediated immune response in anaplasmosis as measured by a micro cell-mediated cytotoxicity assay and leukocyte migration-inhibition test. *Am. J. Vet. Res.* 37: 1215-1218, 1976.
10. Cantor, G.H., Pontzer, C.H., Palmer, G.H.: Opsonization of *Anaplasma marginale* mediated by bovine antibody against surface protein MSP-I. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 37: 343-350, 1993.
- II. Carson, C.A., Sells, D.M., Ristic, M.: Cell-mediated immune response to virulent and attenuated *Anaplasma marginale* administered to cattle in live and inactivated forms. *Am. J. Vet. Res.* 38: 173-179, 1977.
12. Corrier, D.E., Wagne~, G.G., Adams, L.G.: Recrudescence of *Anaplasma marginale* induced by immunosuppression with cyclophosphamide. *Am. J. Vet. Res.* 42: 19-21, 1981.
13. Delegación Mexicana: Estimación de perdidas económicas por enfermedades en la ganadería mexicana durante el ano de 1980. *Bull. Off. Int. Epiz.* 93: 903-905, 1981.
14. Du Plessis, J.L., Gray, C. and Van Strijp, M.F.: Flow cytometric analysis of T cell response in mice infected with *Cowdria ruminantium*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 59: 337338, 1992.
15. Eriks, I.S., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Barbet, A.F.: Detection and quantitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle using a nucleic acid probe. *J. Clin. Microbiol.* 27: 279-284, 1989.
16. Erp, E., Fahrney, D.: Exit of *Anaplasma marginale* from bovine red blood cells. *Am. J. Vet. Res.* 36: 707-709, 1975.
17. Figueroa, J.V., Alvarez, J.A., Ramos, J.A., Vega, C.A., Buening, G.M.: Use of multiplex polymerase chain reaction based assay to conduct epidemiological studies on bovine hemoparasites in Mexico. *Revue Elev. MM. Vet. Pays Trop.* 46.' 71-75, 1993.

18. Francis, D.H., Kinden, D.A., Buening, G.M.: Characterization of the inclusion limiting membrane of *Anaplasma marginale* by immunoferritin labeling. *Am. J Vet. Res.* 40: 777-782, 1979.
19. Garcia, T.D., Lopez, R.M., Aboytes, T.R., Garcia, V.Z., Garcia, O.M., Cossio, B.R., Dominguez, J.P.: Seroprevalencia de anaplasmosis bovina en la zona norte del estado de Veracruz. *Tec. Pec. Méx.* 34: (En prensa) 1996.
20. Garside, P., Mowat, A. McL.: Polarization of Th-cell responses: a phylogenetic consequence of nonspecific immune defence? *Immunol. Today* 16: 220-223, 1995.
21. Howard, C.J., Morrison, W.I., The leukocytes: markers, tissue distribution and functional characterization. En: Goddeeris, B.M.L., Morrison, W.I. (eds.): *Cel- mediated immunity in ruminants*. CRC Press, Boca Raton Florida, pp. 1-17, 1994.
22. Jones, E.W., Norman, B.B., Kliwer, I.O., Brock, W.E.: *Anaplasma marginale* infection in splenectomized calves. *Am. J Vet. Res.* 29: 523-533, 1968.
23. Kocan, K.M., Venable, J.H., Brock, W.E.: Ultrastructure of anaplasma inclusions (Pawhuska isolate) and their appendages in intact and hemolized erythrocytes and in complement-fixation antigen. *Am. J Vet. Res.* 39: 1123-1130, 1978.
24. Kreier, J.P., Gothe, R., Ihler, G.M., Krampitz, H.E., Mernaugh, G., Palmer, G.H.: The hemotropic bacteria: The families Bartonellaceae and Anaplasmataceae. En: Ballows, A. et al., (ed.): *The Prokaryotes*. 2nd ed. Springer-Verlag, New York, pp. 224-4022, 1994.
25. Lalor, P.A., Morrison, W.I., Goddeeris, B.M., Jack, R.M., Black, S.J.: Monoclonal antibodies identify phenotypically and functionally distinct cell types in the bovine lymphoid system. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 13: 121-140, 1986.

26. Maas, J., Lincoln, S.D., Coan, M.E., Kutler, K.L., Zaugg, J.L., Stiller, D.: Epidemiologic aspects of bovine anaplasmosis in semiarid range conditions of south central Idaho. *Am. J. Vet. Res.* 47: 528-533, 1986.
27. Morrison, W.I., Baldwin, C.L., MacHugh, N.D., Teale, A.J., Goddeeris, B.M., and Ellis, J.: Phenotypic and functional characterisation of bovine lymphocytes. *Prog. Vet. Microbiol. Immun.* 4: 134-164, 1988.
28. Nacy, e.A., Meltzer, M.S.: Macrophages in resistance to rickettsial infections: macrophage activation *in vitro* for killing of *Rickettsia tsutsugamushi*. *Immunol.* 125: 2544-2549, 1979.
29. Nacy, e.A., Meltzer, M.S.: Macrophages in resistance to rickettsial infections: macrophage activation against lethal *Rickettsia tsutsugamushi* infections by treatment of mice with macrophage activating agents. *Leuk. Biol.* 35: 385-396, 1984.
30. Palmer, G.H.: Anaplasma vaccines. En: Wright, IG. (ed.): *terinary protozoan and hemoparasite vaccines*. CRC Press. Boca Raton, Florida, pp. 1-29, 1989.
31. Palmer, G.H., McElwain, T.F.: Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Vet. Parasitol.* 57: 233-253, 1995.
32. Palmer, G.H., Barbet, A.F., Kutler, K.L., MacGuire, T.e.: Detection of an *Anaplasma marginale* common surface protein present in all stages of infection. *C/in. Microbiol.* 23: 1078-1083, 1986.
33. Palmer, G.H., Waghela, S.D., Barbet, A.F., Davis, W.e., McGuire, T.C.: Characterization of a neutralization sensitive epitope on the Am 105 surface protein of *Anaplasma marginale*. *Int. J. Parasitol.* 17: 1279- 1285, 1987.
34. Palmer, G.H., Oberle, S.M., Barbet, A.F., Davis, W.e., Goff, W.L., McGuire, T.e.: Immunization with a 36-

- kilodalton surface protein induces protection against homologous and heterologous *Anaplasma marginale* challenge. *Infect. Immun.* 56: 1526-1531, 1988.
35. Palmer, G.H., Barbet, A.F., Musoke, A.J., Rurangirwa, F., Katende, J., Pipano, E., Shkap, V., Davis, W.e., McGuire, T.e.: Recognition of conserved surface protein epitopes of *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale* isolates from Israel, Kenya and the United States. *Int. J Parasitol.* 18: 33-38, 1988a.
 36. Patarroyo, J.H., Villa, O., Diazgranados, H.: Epidemiology of cattle anaplasmosis in Colombia. Prevalence and distribution of agglutinating antibodies. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 10: 171-174, 1978.
 37. Ristic, M.: Anaplasmosis. En: Weinman D., Ristic, M. (ed.): *Infectious Blood Diseases of Man and Animals*. Academic Press, New York, pp. 478-542, 1968.
 38. Ristic, M.: Bovine anaplasmosis. En: Kreier, J. P. (ed.): *Parasitic Protozoa*. Vol. IV. Academic Press, New York, pp. 235-249, 1977.
 39. Ristic, M., Carson, e.A.: Methods of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on the use of the attenuated *Anaplasma marginale*. Part IV. Anaplasmosis. En: Miller, L.H., Pino, JA, Mc Kelvey, J.J. Jr. (ed.): *Immunity to blood parasites of man and animals*. New York Plenum, pp. 151-158, 1977.
 40. Ristic, M., Watrach, A.M.: Studies in anaplasmosis. II. Electronmicroscopy of *Anaplasma marginale* in deer. *Am. J Vet. Res.* 22: 109-116, 1961.
 41. Rogers, R.J., Shields, I.A.: Epidemiology and control of anaplasmosis in Australia. *J S. Afr. Vet. Med. Assoc.* 50: 363-366, 1979.
 42. Scott, P., Kaufmann, S.H.E.: The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunol. Today* 12: 346-348, 1991.

43. Solís, C.J., Rodríguez, V.R.: Presencia de anticuerpos contra *Anaplasma marginale* en becerros de tres ranchos del oriente de Yucatán, México. *Vet. Mix.* 26: 24, 1995.
44. Thorne, K.J.J., Blackwell, J.M.: Cell-mediated killing of protozoa. *Adv. Parasitol.* 22: 43-151, 1983.
45. Taylor-Robinson, A.W.: Regulation of immunity to Malaria: valuable lessons learned from murine models. *Parasitol. Today* 1/: 334-342, 1995.
46. Totte, P., Gee, A.L.W. De, Werenne, J.: Role of interferons in infectious diseases in the bovine species: effect on viruses and rickettsias. *Rev. Elev. MM. Vet. Pays Trap.* 46: 83-86, 1993.
47. Williams, N.M., Timoney, P.J.: *In vitro* killing of *Ehrlichia risticii* by activated and immune mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 61: 861-867, 1993.
48. Williams, N.M., Granstrom, D.E., Timoney, P.J.: Humoral antibody and lymphocyte blastogenesis responses in BALB/c, C3H/HeJ and AKRIN mice following *Ehrlichia risticii* infection. *Res. Vet.Sci.* 56: 284-289, 1994.
49. Wright, I.G.: Immunodiagnosis of and immunoprophylaxis against the haemoparasites *Babesia sp.* and *Anaplasma sp.* in domestic animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9: 345356, 1990.