

Les leçons de *Theileria parva*, un parasite apicomplexa proche de *Plasmodium spp*

Tanguy Marcotty, DVM et PhD
Maître de Conférence
Université de Namur
Rue de Bruxelles, 61
5000 Namur

Introduction

Theileria parva est un parasite protozoaire apicomplexa. Il se transmet aux bovins par une tique dure, principalement *Rhipicephalus appendiculatus*, en Afrique australe et orientale. Le bœuf domestique y est particulièrement sensible, développant une maladie lymphoproliférative aiguë et létale nommée *East Coast fever*, *Corridor disease* (Afrique du Sud) ou *January Disease* (Zimbabwe). Le buffle africain (*Syncerus caffer*) est quant à lui l'hôte naturel de *T. parva* et les infections y sont asymptomatiques.

Theileria parva est un parasite principalement intracellulaire, comme la plupart des apicomplexas qui pénètrent à l'intérieur de leur cellule-hôte à l'aide de leur complexe apical. Chez le bovin, *T. parva* se retrouve dans les leucocytes au stade de schizonte et dans les érythrocytes au stade de mérozoïte.

Le cycle biologique de *T. parva* est relativement complexe et dixène : il se réalise en partie chez le bovin et en partie chez la tique vectrice (Figure 1) (Nene et al. 2016). Celle-ci inocule au bovin des sporozoïtes, le stade infectieux qui infecte rapidement un leucocyte. Par un système de tirette (affinité de récepteurs présents sur leurs membranes cellulaires), le sporozoïte est internalisé dans la cellule hôte. La membrane parasitophore, constituée de la membrane plasmique de la cellule hôte qui s'est détachée suite à la phagocytose, est ensuite dissoute, rendant le parasite libre dans le cytoplasme (Fawcett et al. 1984). L'absence de membrane parasitophore empêche l'intervention des lysosomes et la constitution de phagolysosomes permettant la digestion du parasite. Ce trophozoïte va d'une part diviser son noyau et constituer un syncytium intracellulaire appelé schizonte ou *Koch Blue Body* et, d'autre part, interagir avec le noyau de la cellule hôte afin de la transformer en leucoblaste. Il s'agit d'une transformation de type oncogénique permettant la division synchrone de la cellule hôte avec celle du schizonte (Tajeri & Langsley 2020). Au cours de cette phase, le parasite n'est pas exposé au milieu extracellulaire et n'entre donc pas en contact avec les anticorps. Néanmoins, l'immunité cellulaire est stimulée par l'expression d'antigènes parasitaires à la surface des cellules infectées, en association avec le complexe majeur d'histocompatibilité de type 1 (MCH-1) (Morrison et al. 1995). La réaction immunitaire qui s'ensuit, causant de fortes fièvres, des œdèmes notamment pulmonaires et diverses lésions au niveau des viscères est la principale responsable de la pathogénie et de la létalité de l'infection.

La mérogonie, qui a lieu suite à la schizogonie, permet la libération, par les leucoblastes, de mérozoïtes infectieux pour les érythrocytes. Les mérozoïtes de *T. parva* ne se divisent pas, subissent la gamétogonie (se transforment en gamètes mâles et femelles) et utilisent les globules rouges comme véhicules pour infecter une tique au cours de son repas sanguin. Chez la tique, a lieu la syngamie (fusion des gamètes) dans le tube digestif puis la migration d'un kinète vers les glandes salivaires, au cours de la métamorphose de la tique. Lorsque le nouveau stade de la tique, issu de la métamorphose, prend un nouveau repas sanguin, la sporogonie de *T. parva* est induite, produisant une grande quantité de sporozoïtes infectieux qui sont inoculés à l'hôte 3 à 4 jours après le début du repas de la tique. A ce moment, la tique commence à concentrer son repas sanguin et rejette dans

son hôte de grandes quantités d'eau via les glandes salivaires, entraînant les sporozoïtes de *T. parva*. La transmission de *T. parva* chez la tique est strictement transstadiale, c'est-à-dire qu'elle s'opère uniquement du stade larvaire (qui s'infecte sur un bovin) au stade nymphal (qui transmet l'infection à un bovin) ou du stade nymphal au stade larvaire.

La transformation

La capacité de *T. parva* à transformer le leucocyte en leucoblaste est unique et présente un intérêt scientifique et technique. Les mécanismes de cette transformation ont fait l'objet de nombreuses études afin de mieux comprendre la genèse des cancers. La transformation induite par *T. parva* (et d'autres espèces de *Theileria*) est réversible : la cellule retrouve ses caractéristiques initiales suite à l'élimination du parasite. Une recherche sur Pubmed avec les mots clés « *Theileria* » et « oncology » donne 36 résultats depuis 1974 et 19 depuis 2010 (site consulté le 20/2/2021).

La transformation des cellules infectées par *Theileria* spp. permet de les cultiver aisément au laboratoire. Dans un milieu de culture classique dans un incubateur à 37°C et 5% CO₂, ces cellules se divisent indéfiniment toutes les 30 heures en moyenne (Burrige & Kimber 1972). En ce qui concerne les theilerioses bovines, trois applications majeures en découlent : la préparation d'antigène pour la sérologie, la préparation d'un vaccin contre *Theileria annulata* (parasite proche de *T. parva* mais distribué dans le bassin méditerranéen, au Moyen-Orient et en Asie tropicale) et le titrage *in vitro* d'extraits de sporozoïtes utilisés comme vaccin.

Les cellules infectées cultivées peuvent être utilisées comme antigènes à l'IFAT (indirect fluorescent antibody test) (Burrige & Kimber 1972). Ces cellules entières sont étalées sur une lame microscopique et le sérum à tester y est déposé, généralement dilué. Un anticorps anti-bovin conjugué à la fluorescéine s'y fixe en présence d'anticorps spécifiques, ce qui permet l'observation de schizontes fluorescents au microscope à lumière fluorescente. Ces anticorps ne sont pas protecteurs mais ont une valeur épidémiologique puisqu'ils permettent l'identification d'individus exposés au parasite, potentiellement immuns et porteurs du parasite. L'IFAT, bien qu'ancien, est un outil robuste nécessitant relativement peu d'investissement et bien adapté à la plupart des laboratoires vétérinaires africains. Il s'avère spécifique et plus sensible que les autres méthodes diagnostiques (y compris moléculaires) pour détecter les expositions antérieures et le portage chronique (Bazarusanga et al. 2008).

Chez *Theileria annulata*, la vaccination des bovins est possible à partir de leucocytes infectés, cultivés et atténués au laboratoire (Pipano & Shkap 2000). Injecté au bovin, le parasite peut facilement quitter les cellules « vaccinales » et infecter les cellules du nouvel hôte, par un mécanisme qui n'a pas encore été élucidé. Ce vaccin vivant atténué est particulièrement facile à produire, une fois que la souche adéquate est identifiée (efficacité et innocuité). Ce vaccin doit néanmoins être conservé à une température inférieure à -80°C jusqu'à son utilisation. Ce mode de vaccination ne fonctionne pas avec *T. parva*.

Enfin, le titrage *in vitro* de suspensions de sporozoïtes extraits de tiques infectées ouvre la porte à de multiples applications (Marcotty et al. 2004). De telles suspensions de sporozoïtes vivants sont, en effet, utilisées pour l'immunisation des veaux contre *T. parva*. Ces vaccins vivants doivent être conservés à des températures inférieures à -80°C et la qualité de chaque lot doit être confirmée par des essais d'infection à différentes doses sur des bovins sensibles (titrage *in vivo*). Le titrage *in vitro*, basé sur l'infection au laboratoire de leucocytes par des sporozoïtes, devrait permettre de réduire le nombre d'animaux nécessaires à la validation d'un lot vaccinal et faciliter la recherche sur l'amélioration de la production, de la conservation et de l'administration du vaccin ou pour réaliser

des tests de neutralisation des sporozoïtes par des médicaments, anticorps etc.. Le titrage *in vitro* se fait en plaques de culture à 96 cupules (Mbao et al. 2005). Ce titrage est assuré notamment par le Centre pour les Tiques et Maladies Transmises par les Tiques (CTTBD), une initiative de l'Union Africaine basée à Lilongwe au Malawi (Atuhaire et al. 2020).

Immunité

Les animaux qui guérissent d'une infection par *T. parva* développent une immunité solide pour le reste de leur vie, qu'ils soient réinfectés ou non. L'immunité est essentiellement à médiation cellulaire puisque le stade pathogène du parasite, le schizonte, n'est pas accessible aux anticorps.

On a tenté, depuis les années septante, d'induire artificiellement ce type d'immunité et on a été très vite confronté à un certain nombre de difficultés. Tout d'abord, induire une réponse cellulaire ne peut se faire qu'en assurant la présence de l'antigène à l'intérieur de la cellule (Morrison et al. 1995). L'usage de vaccins vivants répond à cette contrainte et, depuis peu, les vaccins à ARN messenger. La seconde difficulté est la sélection de l'antigène intracellulaire exprimé en association avec le MCH-1. Cette sélection varie d'un individu à l'autre et semble encore imprévisible aujourd'hui (Steinaa et al. 2018). Il en résulte que le parasite entier, au stade sporozoïte, demeure la seule méthode efficace de vaccination contre *T. parva*. Les tentatives d'atténuation et de dilution du parasite afin de réduire les effets pathogènes tout en permettant la réponse immunitaire ont été infructueuses mais l'utilisation de tétracycline à longue durée d'action permet une neutralisation suffisante et mesurée du parasite (Dolan et al. 1984).

L'immunité conférée par la méthode d'infection et traitement n'empêche pas le portage chronique des animaux vaccinés qui restent potentiellement infectieux pour les tiques, de souches vaccinales ou de souches sauvages, toutes deux potentiellement létales (Young et al. 1986; Marcotty et al. 2002)

L'immunisation par infection et traitement a été largement utilisée en Zambie et en Tanzanie et, dans une moindre mesure, dans la plupart des pays concernés par *T. parva*. La variété antigénique observée sur le terrain justifie l'usage de différentes souches vaccinales. La production de vaccin est aujourd'hui essentiellement assurée par le CTTBD.

Epidémiologie

Les premières épidémies causées par *T. parva* ont été décrites sur la côte est de l'Afrique du Sud peu de temps après la guerre des Boers (1899-1902) (Norval et al. 1992). Cette guerre avait durement touché le cheptel bovin et, lors de la reconstruction du pays, de nombreux animaux ont été importés de différentes régions du monde, dont l'Afrique de l'Est. Des animaux porteurs asymptomatiques ont ainsi franchi des barrières géographiques insurmontables jusque là, causant une épidémie sévère parmi les animaux non-immunisés.

Si la transmission de *T. parva* dépend largement de l'écologie de sa tique vectrice, *R. appendiculatus*, d'autres caractéristiques telles que la saisonnalité des transmissions, l'âge des animaux au premier contact et la sévérité des réactions cliniques sont également influencées par l'environnement et le climat. Ainsi, très tôt dans l'étude de *T. parva* dans différentes régions d'Afrique, on a décrit l'*East Coast fever* comme une maladie originaire d'Afrique de l'Est, aigue et transmissible entre les bœufs domestiques. La *Corridor Disease*, décrite essentiellement en Afrique australe, dans les corridors traversant les réserves naturelles, se transmet quant à elle du buffle au bœuf domestique. Enfin, la *January Disease* est une infection atypique mais aussi souvent létale chez le bœuf domestique observée au Zimbabwe. Le biologie moléculaire indique très peu de variabilité génétique entre les

isolats responsables de ces différentes formes de theileriose, même si, sur base génétique (gène COX1), on décrit deux clades principales correspondant aux souches équatoriales d'une part et aux souches tropicales d'autre part (Amzati et al. 2019).

En fonction du niveau d'endémicité de la theileriose, on distingue des situations épidémiques et des situations endémiques plus ou moins stables (Billiouw et al. 1999; Billiouw et al. 2002). Les situations épidémiques s'observent suite à une introduction du parasite et éventuellement de sa tique vectrice dans une région permettant le développement de la tique et la transmission de *T. parva*, au moins au cours d'une période favorable. Les épidémies sont également possibles à la marge de zones endémiques, lorsque les conditions climatiques ne permettant généralement pas le développement de la tique vectrice sont remplacées par des conditions favorables telles que des pluies abondantes (cycles El Nino et El Nina) (Fandamu et al. 2005). Les situations endémiques s'observent lorsque les animaux subissent de régulières expositions. Seuls les jeunes animaux développent la theileriose puisque les plus âgés sont alors immunisés. Les situations endémiques stables (dans lesquelles la primo-infection est peu symptomatique et peu létale) sont probablement rares chez le bœuf domestique car cela nécessiterait une immunité naturelle à l'égard de *T. parva*, comme chez le buffle, les anticorps d'origine maternelle étant inefficaces. Une stabilité endémique apparente, où une mortalité néonatale élevée est tolérée (« car ça a toujours été comme ça ») est plus probable.

Les variations en terme de pathogénicité s'expliquent par une adaptation de *T. parva* à ses hôtes vertébrés (avec une perte de virulence lors de l'adaptation au bœuf) et invertébrés (tiques présentant des phénologies différentes en fonction du climat). A l'origine *T. parva* est un parasite du buffle chez qui il n'est pas pathogène, y compris lors de primo-infection. Ces souches sont incapables de se maintenir chez le bœuf domestique sauf si leur virulence s'amenuise. En effet, lors de *Corridor Disease*, les bœufs meurent avant que les mérozoïtes n'apparaissent dans les globules rouges, empêchant la transmission aux tiques. En outre, certaines souches de *T. parva* ont besoin que le bœuf reste porteur (et donc vivant) pendant plusieurs mois en raison de la saisonnalité de la phénologie de la tique vectrice. C'est le cas en Afrique Australe lorsque les tiques adultes sont en diapauses pendant la saison sèche d'avril à décembre. Les pics d'abondance des différents stades de tiques ne se recouvrent pas et empêchent une transmission immédiate de l'adulte ou de la nymphe à la nymphe ou à la larve. Nymphes et larves n'apparaissent que quelques semaines après les adultes et les nymphes, respectivement (Figure 2). Enfin, un long intervalle entre deux repas des tiques peut conduire à la disparition de *T. parva* chez ces tiques, par exemple lorsqu'on n'a qu'une seule génération de tiques par an. C'est ce que l'on a constaté dans le sud de la Zambie où le complexe adulte/nymphe, généralement le plus efficace dans la transmission de *T. parva* en raison du volume du repas sanguin, transmet moins bien *T. parva* que le complexe nymphe/larve parce que l'intervalle entre deux repas est significativement plus long (Figure 2) (Mulumba et al. 2000; Mulumba et al. 2001). Les tiques elles-mêmes apparaissent morphologiquement et génétiquement différentes selon l'environnement : des tiques plus petites qui se reproduisent plus rapidement en région équatoriale et des tiques plus grandes pratiquant la diapause au stade adulte dans les régions plus arides (Speybroeck et al. 2002; Amzati et al. 2018)

Contrôle

Le contrôle de *T. parva* se justifie par les pertes économiques causées par ce parasite. Suite à son introduction dans de nombreux pays, principalement en Afrique Australe, on a tenté de l'éliminer en luttant contre le vecteur, en contrôlant les déplacements et en éliminant les animaux infectés. Ces stratégies ont échoué et, dans la plupart des pays on s'est aujourd'hui résigné à en mitiger les effets.

Les traitements acaricides (non rémanents) des tiques vectrices doivent être réalisés deux fois par semaine pendant les périodes d'activités des tiques. Ceci présente un certain nombre d'inconvénients : contraintes de temps, cout, résidus dans la viande et le lait, développement potentiel de résistances des tiques aux acaricides et pollution environnementale. En outre, les troupeaux traités de la sorte ne développent aucune immunité contre le parasite et, dans l'éventualité d'une infection accidentelle (troubles politiques, ruptures de stock...), sont à la merci d'hécatombes.

Les premiers essais de vaccination contre *T. parva* ont été entrepris dans les années septante (Radley et al. 1975) et n'ont pas beaucoup évolué depuis lors. Dans plusieurs pays (singulièrement en Zambie et Tanzanie), les jeunes veaux sont vaccinés avant une exposition naturelle. Le vaccin est constitué d'une suspension de sporozoïtes obtenue à partir d'un broyat de tiques infectées (ces tiques sont elles-mêmes infectées en se nourrissant sur des animaux artificiellement infectés en conditions contrôlées). Ces suspensions sont conservées < -80°C. Différents efforts ont été réalisés afin d'alléger la chaîne de froid : lyophilisation, transport sur glace etc. (Marcotty et al. 2001; Marcotty et al. 2003). Néanmoins la chaîne du froid demeure une contrainte importante. Ce vaccin est efficace après une dose unique et ne nécessite aucun rappel, même en l'absence de réinfections naturelles.

Enfin, certaines molécules ont une bonne efficacité theilericide (parvaquone et buparvaquone) (Dolan et al. 1992; Dolan et al. 1984) mais sont relativement chères et doivent être administrées le plus rapidement possible après l'infection, ce qui est parfois problématique en zones rurales. Ces theilericides sont particulièrement indiqués en situations épidémiques ou sporadiques mais peuvent aussi s'avérer utiles en situations endémiques, par exemple pour traiter les veaux lors de leur premier contact. Les animaux traités de la sorte développent une bonne immunité contre une infection ultérieure.

Coopération internationale

La Belgique est impliquée dans la lutte contre la theileriose bovine depuis le début des années 80, avec les projets BADCP (Belgian Animal Disease Control Project, 1982 - 1993) puis ASVEZA (Assistance to the Veterinary Services of Zambia, 1993 - 2006) en Zambie menés en collaboration avec l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (IMTA). Ces projets ont réalisé de nombreuses études épidémiologiques permettant de définir la stratégie de contrôle la plus adaptée au pays. Les efforts initiaux se sont concentrés sur la lutte contre la tique vectrice mais on s'est vite aperçu que la theileriose passait au travers des barrières qui étaient érigées. On a alors opté pour l'endémicité, une situation plus stable dans laquelle la circulation du parasite est tolérée et l'immunité des animaux est utilisée pour en contrôler les effets négatifs. Des vaccins univalents et locaux ont ainsi été développés (souches Katete pour l'est du pays et Chitongo pour le sud). La question du vaccin local est régulièrement débattue et oppose les partisans d'un vaccin unique contre *T. parva*, ce qui faciliterait sa production et sa distribution, à ceux qui préconisent l'usage de souches locales afin de stimuler une réponse immunitaire mieux adaptée à l'exposition naturelle et éviter d'introduire des souches étrangères potentiellement pathogènes pour la population qui n'y a jamais été exposée (Geysen 2008). De plus, la production d'un vaccin unique requiert qu'il soit multivalent (le cocktail Muguga proposé contient trois souches), compliquant la production et le titrage de ces vaccins (Speybroeck et al. 2008).

Les projets BADCP et ASVEZA ont démontré la possibilité de contrôler la theileriose bovine par la méthode d'infection et traitement des veaux en situation d'endémicité. La chaîne de froid est contraignante mais peut être assouplie pendant quelques heures, permettant la distribution du vaccin sur glace par un réseau de techniciens vétérinaires (Marcotty et al. 2008).

La Belgique a également largement soutenu et encouragé la centralisation de la production de vaccin au Centre pour les Tiques et Maladies Transmises par les Tiques à Lilongwe afin d'en garantir la qualité. Il est en effet essentiel d'éviter les contaminations par d'autres souches, d'autres parasites ou des pathogènes bactériens ou viraux, tout en assurant la vitalité des suspensions vaccinales de sporozoïtes cryopréservés. Ce centre continue de fonctionner et les programmes de vaccination se poursuivent en Zambie.

Les leçons

La biologie, l'épidémiologie et les modes de contrôle de *T. parva* pourraient inspirer de nombreux scientifiques en médecine vétérinaire et humaine. La transformation cellulaire des leucocyte présente un intérêt évident en oncologie.

Le portage chronique par des animaux asymptomatiques et l'immunité incomplète contre le parasite, protégeant l'animal contre une réaction sévère mais pas contre une infection ont tendance à compliquer la perception que l'on peut avoir d'une situation épidémiologique. Même si la stabilité endémique n'existe pas à proprement parler chez le bœuf, on s'en approche lorsque les veaux sont vaccinés avant la primo-infection. Une immunité complète contre le parasite n'est donc pas requise pour le contrôler de façon efficace. Des réponses immunitaires similaires sont décrites à l'égard de nombreuses parasitoses animales et humaines dont la malaria, la leishmaniose et de nombreuses verminoses.

L'absence de symptômes chez le buffle africain, l'hôte naturel de *T. parva* indique que l'équilibre parasitologique ultime résultant d'une longue coévolution entre *T. parva*, *R. appendiculatus* et le buffle aboutit à une situation stable. Le temps nécessaire pour aboutir à ce résultat fut considérable et il est probable que les tentatives de contrôle de l'infection chez le bœuf empêchent, en réalité, la coévolution. Le transfert de *T. parva* à une espèce proche confirme, si cela était encore nécessaire, l'origine de maladies émergentes et la sévérité potentielle des agents infectieux traversant la barrière d'espèce.

Historiquement parlant, l'épidémie de theileriose en Afrique du Sud au début du XX^{ème} siècle est probablement une des premières scientifiquement documentées. L'utilisation de moyens de transport contournant ou surmontant les barrières géographiques permettent la diffusion des pathogènes et parfois de vecteurs causant potentiellement des épidémies dans les populations dans lesquelles l'immunité collective n'existe pas.

Theileria spp est un pathogène intracellulaire, comme d'autres protozoaires, les virus et certaines bactéries. Le système immunitaire est capable de contrôler ce genre d'infection en activant l'immunité à médiation cellulaire. Malheureusement, cette immunité est difficile à induire par la vaccination et en particulier lorsque plusieurs antigènes sont exprimés à l'intérieur de la cellule. L'utilisation du parasite lui-même reste de mise pour vacciner les animaux contre *Theileria* spp, même si différentes techniques permettent à ce jour d'exprimer des protéines vaccinales à l'intérieur des cellules (vaccins à vecteur viral et vaccins à ARN messenger).

Enfin, l'expérience de *T. parva* montre que le respect d'une chaîne du froid contraignante est aussi possible en Afrique et en zones rurales. La production d'azote liquide et de neige carbonique y est possible, sans compter la production de glace qui est à la portée de la plupart des laboratoires.

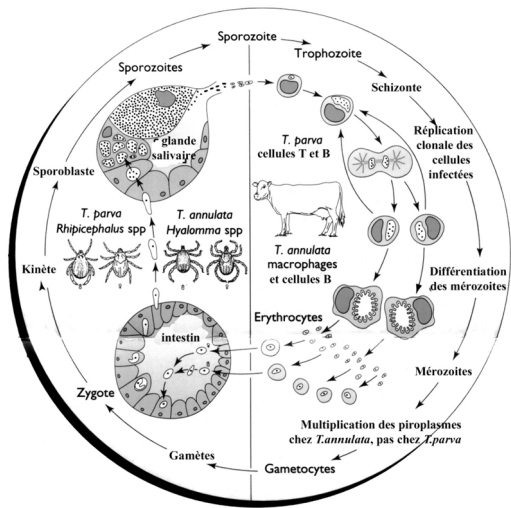


Figure 1 : Le cycle biologique de *Theileria parva* et *Theileria annulata*

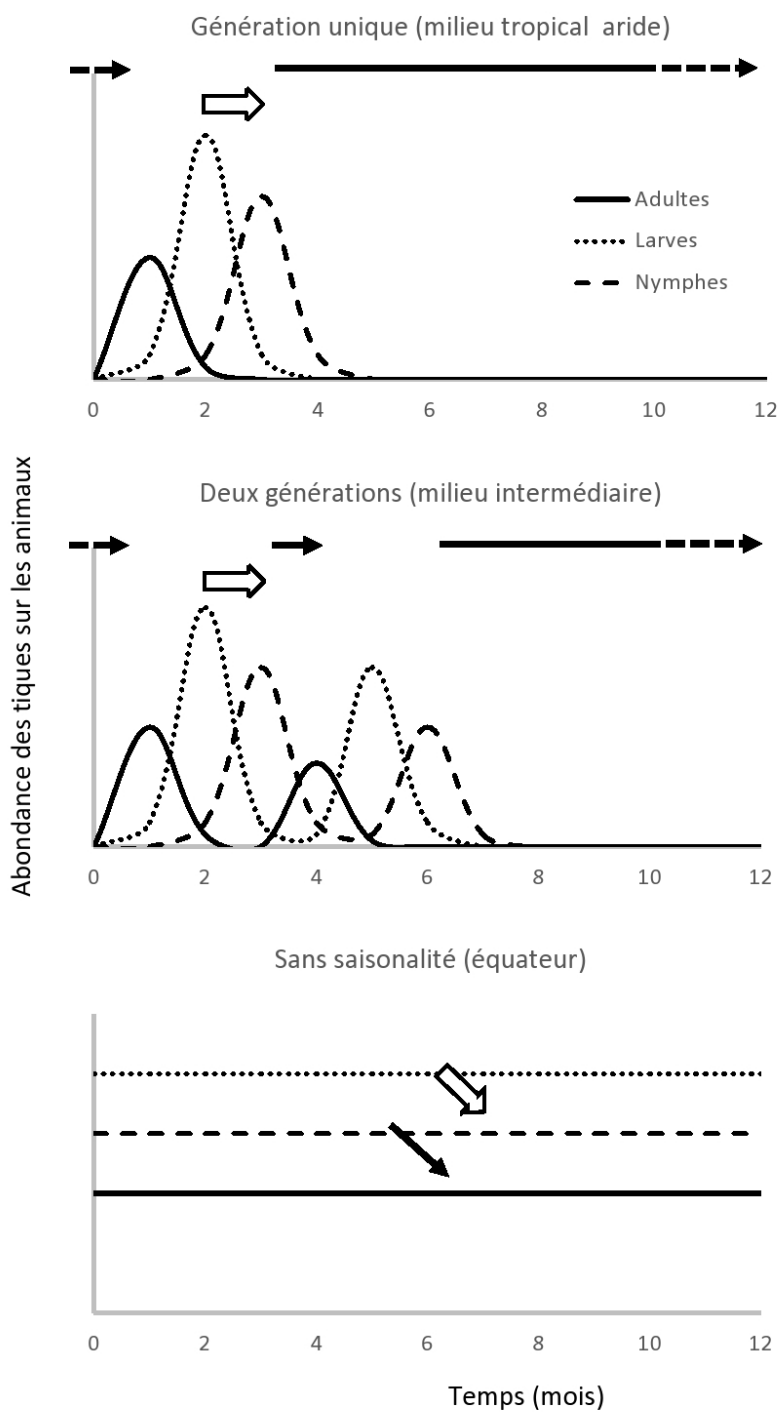


Figure 2 : Simulation d'abondances de différents stades biologiques de la tique vectrice *Rhipicephalus appendiculatus* sur les animaux en fonction du temps montrant les contraintes de transmission de *T. parva* en fonction du climat ; → indique la survie de *T. parva* lors de la métamorphose de la nymphe en adulte ; => indique la survie de *T. parva* lors de la métamorphose de la larve en nymphe

Bibliographie

- Amzati, G.S., Djikeng, A., Odongo, D.O., Nimpaye, H., Sibeko, K.P., Muhigwa, J-B.B., Madder, M., Kirschvink, N. & Marcotty, T. 2019, Genetic and antigenic variation of the bovine tick-borne pathogen *Theileria parva* in the Great Lakes region of Central Africa. - *Parasites & vectors*, 12 (1), 588.
- Amzati, G.S., Pelle, R., Muhigwa, J-B.B., Kanduma, E.G., Djikeng, A., Madder, M., Kirschvink, N. & Marcotty, T. 2018, Mitochondrial phylogeography and population structure of the cattle tick *Rhipicephalus appendiculatus* in the African Great Lakes region. - *Parasites & vectors*, 11 (1), 329.
- Atuhaire, D.K., Lieberman, D., Marcotty, T., Musoke, A.J. & Madan, D. 2020, An alternative cold chain for storing and transporting East Coast fever vaccine. - *Veterinary parasitology*, 288, 109304.
- Bazarusanga, T., Geysen, D., Vercruyse, J. & Marcotty, T. 2008, The sensitivity of PCR and serology in different *Theileria parva* epidemiological situations in Rwanda. - *Veterinary parasitology*, 154 (1-2), 21-31.
- Billiouw, M., Brandt, J., Vercruyse, J., Speybroeck, N., Marcotty, T., Mulumba, M. & Berkvens, D. 2005, Evaluation of the indirect fluorescent antibody test as a diagnostic tool for East Coast fever in eastern Zambia. - *Veterinary parasitology*, 127 (3-4), 189-98.
- Billiouw, M., Mataa, L., Marcotty, T., Chaka, G., Brandt, J. & Berkvens, D. 1999, The current epidemiological status of bovine theileriosis in eastern Zambia. - *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 4 (9), A28-33.
- Billiouw, M., Vercruyse, J., Marcotty, T., Speybroeck, N., Chaka, G. & Berkvens, D. 2002, *Theileria parva* epidemics: a case study in eastern Zambia. - *Veterinary parasitology*, 107 (1-2), 51-63.
- Burridge, M.J. & Kimber, C.D. 1972, The indirect fluorescent antibody test for experimental East Coast fever (*Theileria parva* infection of cattle). Evaluation of a cell culture schizont antigen. - *Research in veterinary science*, 13 (5), 451-5.
- Dolan, T.T., Injairu, R., Gisemba, F., Maina, J.N., Mbadi, G., Mbwiria, S.K., Mulela, G.H. & Othieno, D.A. 1992, A clinical trial of buparvaquone in the treatment of East Coast fever. - *The Veterinary record*, 130 (24), 536-8.
- Dolan, T.T., Linyonyi, A., Mbogo, S.K. & Young, A.S. 1984, Comparison of long acting oxytetracycline and parvaquone in immunisation against East Coast fever by infection and treatment. - *Research in veterinary science*, 37 (2), 175-8.
- Dolan, T.T., Young, A.S., Leitch, B.L. & Stagg, D.A. 1984, Chemotherapy of East Coast fever: parvaquone treatment of clinical disease induced by isolates of *Theileria parva*. - *Veterinary parasitology*, 15 (2), 103-16.
- Fandamu, P., Duchateau, L., Speybroeck, N., Marcotty, T., Mbao, V., Mtambo, J., Mulumba, M. & Berkvens, D. 2005, *Theileria parva* seroprevalence in traditionally kept cattle in southern Zambia and El Nino. - *International journal for parasitology*, 35 (4), 391-6.
- Fawcett, D., Musoke, A. & Voigt, W. 1984, Interaction of sporozoites of *Theileria parva* with bovine lymphocytes in vitro. I. Early events after invasion. - *Tissue & cell*, 16 (6), 873-84.

- Geysen, D. 2008, Live immunisation against *Theileria parva*: spreading the disease? - Trends in parasitology, 24 (6), 245-6.
- Marcotty, T., Berkvens, D., Besa, R.K., Losson, B., Dolan, T.T., Madder, M., Chaka, G., Van den Bossche, P. & Brandt, J. 2003, Lyophilisation and resuscitation of sporozoites of *Theileria parva*: preliminary experiments. - Vaccine, 22 (2), 213-6.
- Marcotty, T., Billiouw, M., Chaka, G., Berkvens, D., Losson, B. & Brandt, J. 2001, Immunisation against East Coast fever by the infection and treatment method: evaluation of the use of ice baths for field delivery and appraisal of an acid formulation of long-acting tetracycline. - Veterinary parasitology, 99 (3), 175-87.
- Marcotty, T., Brandt, J., Billiouw, M., Chaka, G., Losson, B. & Berkvens, D. 2002, Immunisation against *Theileria parva* in eastern Zambia: influence of maternal antibodies and demonstration of the carrier status. - Veterinary parasitology, 110 (1-2), 45-56.
- Marcotty, T., Chaka, G., Brandt, J., Berkvens, D., Thys, E., Mulumba, M., Mataa, L. & Van den Bossche, P. 2008, The transfer of East Coast fever immunisation to veterinary paraprofessionals in Zambia. - Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 27 (3), 741-9.
- Marcotty, T., Speybroeck, N., Berkvens, D., Chaka, G., Besa, R., Madder, M., Dolan, T., Losson, B. & Brandt, J. 2004, In vitro titration of *Theileria parva* tick derived stabilates. - Parasitology, 128 (Pt 2), 131-7.
- Mbao, V., Speybroeck, N., Berkvens, D., Dolan, T., Dorny, P., Madder, M., Mulumba, M., Duchateau, L., Brandt, J. & Marcotty, T. 2005, Comparison of manual and homogenizer methods for preparation of tick-derived stabilates of *Theileria parva*: equivalence testing using an in vitro titration model. - Parasitology, 131 (Pt 1), 45-9.
- Morrison, W.I., Taracha, E.L. & McKeever, D.J. 1995, Theileriosis: progress towards vaccine development through understanding immune responses to the parasite. - Veterinary parasitology, 57 (1-3), 177-87.
- Mtambo, J., Madder, M., Van Bortel, W., Chaka, G., Berkvens, D. & Backeljau, T. 2007, Further evidence for geographic differentiation in *R. appendiculatus* (Acari: Ixodidae) from Eastern and Southern provinces of Zambia. - Experimental & applied acarology, 41 (1-2), 129-38.
- Mulumba, M., Speybroeck, N., Berkvens, D.L., Geysen, D.M. & Brandt, J.R. 2001, Transmission of *Theileria parva* in the traditional farming sector in the Southern Province of Zambia during 1997-1998. - Tropical animal health and production, 33 (2), 117-25.
- Mulumba, M., Speybroeck, N., Billiouw, M., Berkvens, D.L., Geysen, D.M. & Brandt, J.R. 2000, Transmission of theileriosis in the traditional farming sector in the southern province of Zambia during 1995-1996. - Tropical animal health and production, 32 (5), 303-14.
- Nene, V., Kiara, H., Lacasta, A., Pelle, R., Svitek, N. & Steinaa, L. 2016, The biology of *Theileria parva* and control of East Coast fever - Current status and future trends. - Ticks and tick-borne diseases, 7 (4), 549-64.
- Norval, R.A.I., Perry, B.D. & Young, A.S. 1992, *The epidemiology of Theileriosis in Africa*, Academic Press.
- Pipano, E. & Shkap, V. 2000, Vaccination against tropical theileriosis. - Annals of the New York Academy of Sciences, 916, 484-500.

Radley, D.E., Brown, C.G.D., Cunningham, M.P., Kimber, C.D., Musisi, F.L., Payne, R.C., Purnell, R.E., Stagg, S.M. & Young, A.S. 1975, East Coast fever. Part 3. Chemoprophylactic immunisation of cattle using oxytetracycline and a combination of theilerial strains - *Veterinary Parasitology*.

Speybroeck, N., Madder, M., Van Den Bossche, P., Mtambo, J., Berkvens, N., Chaka, G., Mulumba, M., Brandt, J., Tirry, L. & Berkvens, D. 2002, Distribution and phenology of ixodid ticks in southern Zambia. - *Medical and veterinary entomology*, 16 (4), 430-41.

Speybroeck, N., Marcotty, T., Aerts, M., Dolan, T., Williams, B., Lauer, J., Molenberghs, G., Burzykowski, T., Mulumba, M. & Berkvens, D. 2008, Titrating *Theileria parva*: single stocks against combination of stocks. - *Experimental parasitology*, 118 (4), 522-30.

Steinaa, L., Svitek, N., Awino, E., Saya, R. & Toye, P. 2018, Cytotoxic T lymphocytes from cattle sharing the same MHC class I haplotype and immunized with live *Theileria parva* sporozoites differ in antigenic specificity. - *BMC research notes*, 11 (1), 44.

Tajeri, S. & Langsley, G. 2020, *Theileria* secretes proteins to subvert its host leukocyte. - *Biology of the cell*.

Young, A.S., Leitch, B.L., Newson, R.M. & Cunningham, M.P. 1986, Maintenance of *Theileria parva* infection in an endemic area of Kenya. - *Parasitology*, 93 (Pt 1), 9-16.