

ESTABLECIMIENTO DE LA TÉCNICA SEROLÓGICA INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA (I.F.I) COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE LA ANAPLASMOSIS BOVINA EN LA POLICLÍNICA VETERINARIA DE L.U.Z.

Stabliment of indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of bovine anaplasmosis at the Veterinary Polyclinic of the University of Zulia (LUZ). Venezuela

Omaira del C. Parra M.*
Cruz María Arraga de Alvarado*
Aníbal Basalo S.*
Edgar León**
Ana T. Guillén**
Denice I. Zapata*
María E. Altuve*

* Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad del Zulia
Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

** Instituto de Investigaciones Veterinarias. FONAIAP-CENIAP
Maracay, Estado Aragua, Venezuela

RESUMEN

Se logró la multiplicación de cepas de campo de *Anaplasma marginale* y *Paranaplasma caudatum* y *discoide*, en dos becerros esplenectomizados con el fin de establecer la técnica de I.F.I. como método de diagnóstico en la Policlínica Veterinaria de la Universidad del Zulia. Usando exámenes hematológicos se fueron evaluando a los animales. La parasitemia se determinó con frotis convencionales y con frotis de capa blanca. Cuando la parasitemia llegó a 21.6% en uno de los animales, se prepararon 1.800 frotis-antígenos y con parasitemia de 38.5%, se realizaron 850 frotis-antígenos de otro becerro. La técnica se estandarizó con magníficos resultados siguiendo las modificaciones recomendadas por Montenegro, para evitar fluorescencia inespecífica y utilizando para ello 74 muestras de suero de 3 fincas cercanas a la ciudad de Maracaibo, Estado Zulia. Sangre con EDTA de los mismos animales fue evaluada hematológicamente. Se determinó que con frotis convencionales el 48.62% de las muestras fueron positivas a *Anaplasma marginale*; mientras que con capa blanca la positividad se incrementaba a 51.3%.

Con I.F.I. a la dilución 1:80 el 100% fueron positivos y a la dilución 1:160 el 87.8% fueron positivas y el 12.1% negativas. Se reportan los valores hematológicos obtenidos en el estudio y algunos resultados sobre *Paranaplasma spp.*

Palabras claves: Anaplasmosis, serodiagnóstico, bovino, IFI, Paranaplasma.

ABSTRACT

In order to establish the I.F.A. Test as a diagnostic method at the Veterinary Polyclinic of the University of Zulia, two (2) esplenectomized calves were used. They were naturally infected with *Anaplasma marginale*, *Paranaplasma caudatum* and *Paranaplasma discoide*. Hematological evaluation was performed in all the animals during the experiment. Conventional blood smears and buffy coat smears were used in order to check parasitemia, 1800 antigen smears were prepared when one of the calves had 21.6% parasited erythrocytes and 850 antigens smears were obtained from the other calf with 38.5% parasited erythrocytes. Standarization of the technic was realized with very good results following Montenegro's recommendations to avoid inespecific

fluorescence. Seventy four (74) sera samples from three different farms located around Maracaibo city, in Zulia state were tested. Blood samples with EDTA were used for hematological evaluation. Using conventional smears 48.62% of the case were positive to *Anaplasma marginale*, while 51.3% were positive using buffy coat smears. Using I.F.A. test at 1:80 dilution positivity was 100%, using 1:160 dilution positivity was 87.8% of the cases and negative sera were 12.1%. Hematological values from the animals are reported and also some information about *Paranaplasma spp.*

Key words: Anaplasmosis, serodiagnosis, cattle, IFA, Paranaplasma.

INTRODUCCIÓN

La anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa causada por un organismo rickettsial intraeritrocitario, que pertenece a la familia *Anaplasmataceae*, género *Anaplasma* y su especie *A. marginale*. Esta enfermedad se encuentra distribuida a nivel mundial y por su morbilidad y mortalidad limita el desarrollo ganadero de esas regiones [2,3,7,23,25,26,27,29,35].

La enfermedad se caracteriza por presentar un período de incubación de 3 a 5 semanas o más en infecciones transmitidas por garrapatas, y de 1 a 5 semanas por inoculación de sangre parasitada, donde se da lugar la multiplicación de los cuerpos de *A. marginale* en el interior de los eritrocitos parasitados. Las manifestaciones clínicas más comunes de la anaplasmosis son fiebre, anorexia, depresión, mucosas pálidas, ictericia, pérdida de peso, deshidratación, disminución de la producción láctea, abortos, infertilidad en toros, atonía gastrointestinal; y algunos animales pueden mostrar hiperexcitabilidad. En algunos casos, los síntomas clínicos son tan severos que producen la muerte del animal en 24 horas [2,3,4,7,10,11,23,25,26,29,33].

El diagnóstico está basado en la sintomatología clínica y en los hallazgos del laboratorio, donde se observa una anemia hemolítica, con tinte icterico a nivel de las mucosas, sin hemoglobinemia, ni hemoglobinuria. Esta anemia suele ser al principio normocítica normocrómica no regenerativa, pero en el estado de convalecencia se manifiesta como macrocítica normocrómica regenerativa [2,3,4,7,11,12,25,26,29].

Lo más importante es la observación de los cuerpos del *A. marginale* en frotis sanguíneos teñidos con Wright-Giemsa, donde pueden alcanzar parasitemias que oscilan entre un 10% a un 50%, ya que el porcentaje de eritrocitos infectados se incrementa rápidamente, doblándose en 24 horas. En el estado de portador es difícil la observación de los organismos en un frotis sanguíneo, por lo que se hace necesario el empleo de técnicas más precisas y sensibles para el diagnóstico de esta enfermedad [3,4,5,23,29,32].

Para esto se utilizan pruebas serológicas, tales como: la Inmunofluorescencia Indirecta (I.F.I.), Fijación del Complemen-

to (F.C.), Aglutinación Capilar (A.C.), Aglutinación Rápida en Tarjetas (A.R.T.), Radioinmunoensayo (R.I.A.), Elisa, Dot-Elisa; siendo las más sensibles y específicas Elisa, Dot-Elisa, I.F.I. y R.I.A.. La I.F.I. es una técnica citoquímica que nos permite observar la reacción antígeno-anticuerpo, mediante el uso de un conjugado que contiene Isotiocianato de Fluoresceína y un anticuerpo específico (Inmunoglobulina-antibovina), mediante un microscopio de luz ultravioleta. Esta técnica es altamente sensible y específica requiriendo una pequeña cantidad de reactivos [9,17,22,29,30,34].

Desde 1966, se comenzó a utilizar esta prueba en forma esporádica, como método de diagnóstico de la anaplasmosis bovina. Sin embargo, en 1985 Montenegro [20] modificó en forma parcial esta técnica al utilizar buffer glicina, con el fin de eliminar la fluorescencia inespecífica y así, los falsos positivos [8].

Lohr y col. [18], González y col. [9] y Odreman y Aso 1984 [24]; determinaron mediante esta técnica, que los niveles de anticuerpos anti-*Anaplasma* de tipo IgG se iniciaban cuando aparecían los primeros *A. marginale* en el frotis sanguíneo y aumentaban a medida que la parasitemia disminuía.

En Venezuela, los investigadores del FONAIAP* [17,21,22,34], de la Universidad Simón Bolívar [2,7,24,28,32] y de la Universidad Central de Venezuela [27], han utilizado la técnica de I.F.I. para realizar estudios de prevalencia en diferentes regiones del país y para detectar anticuerpos calostrales en madres portadoras [21,24,25,28,34].

Siendo el Estado Zulia una de las regiones ganaderas más importantes del país, no cuenta con técnicas diagnósticas precisas para el diagnóstico de esta enfermedad; es por eso, que los objetivos de este trabajo fueron elaborar el antígeno de *A. marginale*, aplicar la técnica de I.F.I. como método de diagnóstico y demostrar la eficiencia de la misma en comparación con la técnica de observación de frotis sanguíneos teñidos delgados y de capa blanca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración del Antígeno:

Se esplenectomizaron dos becerros, de 3 y 4 meses de edad, infectados con una cepa de campo de *Anaplasma marginale*. A los 21 días post esplenectomias, uno de los becerros alcanzó una parasitemia de 21.6%, con un volumen globular (Hct) de 28%, mientras que el otro alcanzó una parasitemia de 38.5%, con un volumen globular (Hct) de 18%.

Una vez alcanzado el pico de parasitemia, se recolectaron 400 ml. de sangre, por punción de la vena yugular, en un recipiente estéril que contenía 10% de perlas de vidrio. La sangre defibrinada fue centrifugada a 3000 r.p.m. por 15 minutos a 12°C. (DAMON, IEC DIVISION), se eliminó el plasma y la

* Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias

capa de glóbulos blancos con ayuda de un succionador, dejando solo el paquete de glóbulos rojos. Este paquete fue resuspendido con dos volúmenes de buffer glicina 0.1M. pH 3.0 por cada volumen del paquete celular. Se mezcló suavemente y se centrifugó a 1.500 r.p.m., por 25 minutos a 4 °C [20].

Se descartó el buffer glicina y se normalizó el pH al adicionarle P.B.S. pH 7.2, a un volumen igual al del paquete celular, centrifugándose a 3000 r.p.m., por 15 minutos a 12°C, éste último lavado se realizó dos veces, para hacer un total de 3 lavados. El paquete celular final, se resuspendió con un volumen igual de P.B.S. pH 7.2 que contenía 1.75% de Suero Albúmina Bovina. Del paquete celular final se tomó una gota y se colocó en láminas porta-objetos nuevas y con la ayuda de otro porta-objetos se deslizó suavemente la gota hasta obtener una película fina que cubría toda la superficie de la lámina. Los frotis antígenos fueron secados, envueltos en papel bond, resguardados en bolsas plásticas y almacenados a -20 °C.

Desarrollo de la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (I.F.I.)

Los frotis-antígenos fueron descongelados con ayuda de un ventilador eléctrico por espacio de una hora, luego se fijaron en acetona fría por 5 minutos, para ser secados de nuevo. Con un marcador especial se realizaron 8 círculos de 5 mm de diámetro sobre los frotis-antígenos. Con una pipeta de 0.1 ml o de 100 µl, se colocó una gota de los sueros controles positivos, negativos y problemas en el círculo que le correspondía. Los sueros controles positivos y negativos fueron preparados a una dilución de 1:80, mientras que los sueros problemas fueron diluidos en 1:80 y 1:160.

Los frotis-antígenos, con los sueros respectivos, fueron incubados a 37°C por 30 minutos en una estufa con atmósfera húmeda (Precisión P.S. SCIENTIFIC); luego fueron lavados dos veces con P.B.S. pH 7.2 por 5 minutos en inmersión y agitación, el último lavado fue realizado con agua destilada. Una vez secos, se colocó en cada círculo una gota de Conjugado anti-Inmunoglobulina G. Bovina de Conejo con Isotiocianato de Fluoresceína (SIGMA INMUNO CHEMICALS), a la dilución de 1:40 P.B.S. pH 7.2. Esta dilución de trabajo fue seleccionada como la mejor, después de haber realizado titulaciones del conjugado a diluciones 1:25; 1:30; 1:40 y 1:50. Posteriormente fueron incubados a 37°C por 30 minutos en una estufa con atmósfera húmeda. Nuevamente se lavaron con P.B.S. pH 7.2 y agua destilada, tal como fue descrito anteriormente. Los círculos se cubrieron con un cubre-objetos 24x60 de 1mm de espesor para ser observados en un microscopio de inmunofluorescencia (AXIOSKOP-ZEISS), bajo el objetivo de inmersión 100X.

Los sueros positivos fueron aquellos donde los *A. marginale* fluorescieron de un color verde manzana brillante, mientras que los que presentaban un color verde opaco fueron considerados negativos.

Áreas de Muestreo

Se tomaron 74 muestras de sangre a bovinos machos y hembras, adultos, mestizos, pertenecientes a 3 fincas, las cuales se encuentran ubicadas en los Municipios Machiques de Perijá, Jesús Enrique Lossada y Miranda. Como no fue un estudio de prevalencia, sino de establecimiento de una técnica, el número de animales y de fincas a muestrear se consideró suficiente.

Toma de las Muestras

Se obtuvo 10 ml de sangre por punción de la vena yugular, 5 ml fueron recolectados con E.D.T.A. y los otros 5 ml en tubos sin anticoagulante.

Procesamiento de la Muestra

A la sangre con anticoagulante (E.D.T.A.), se le determinó el volumen globular (Hct), la hemoglobina, el conteo de glóbulos rojos y el conteo de glóbulos blancos, a través de un analizador hematológico Cell Dyn 400. Se realizaron dos frotis sanguíneos, uno convencional y otro de capa blanca, de acuerdo a la metodología descrita por Schalm y col. [29] y fueron coloreados con Hematology three-Step Stain Set (Accra Lab. Brand of Biochemical Sciences INC). A la sangre sin anticoagulante se le extrajo el suero para ser usado en la técnica de I.F.I.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el programa estadístico S.A.S., donde se determinó el máximo, mínimo, medias, desviaciones estandaradas y distribuciones de frecuencias.

RESULTADOS

Se elaboraron 1.800 frotis-antígenos del animal que tenía una parasitemia de 21.6% y 850 frotis-antígenos del animal que tenía 38.5% de parasitemia, para un total de 2.650 frotis-antígenos, los cuales fueron almacenados a -20°C.

Se aplicó la técnica de I.F.I. a las 74 muestras de suero bovino, observándose una fluorescencia verde manzana brillante en aquellos sueros con anticuerpos anti-Anaplasma, FIGS. 1 y 2.

De las 74 muestras de sangre, 36 (48.6%) fueron positivas a *A. marginale* en frotis convencional y 38 (51.3%) fueron negativas. Mediante frotis de capa blanca, 42 (56.7%) fueron positivas y 32 (43.2%) fueron negativas. De las 36 (48.6%) muestras positivas a *A. marginale* en frotis convencional, todas fueron positivas a la técnica de I.F.I. a la dilución de 1:80, sólo una fue negativa y 35 (47.3%) fueron positivas a la dilución 1:160.

De las 38 (51.3%) muestras negativas al frotis convencional, todas ellas fueron positivas a I.F.I. en la dilución 1:80 y

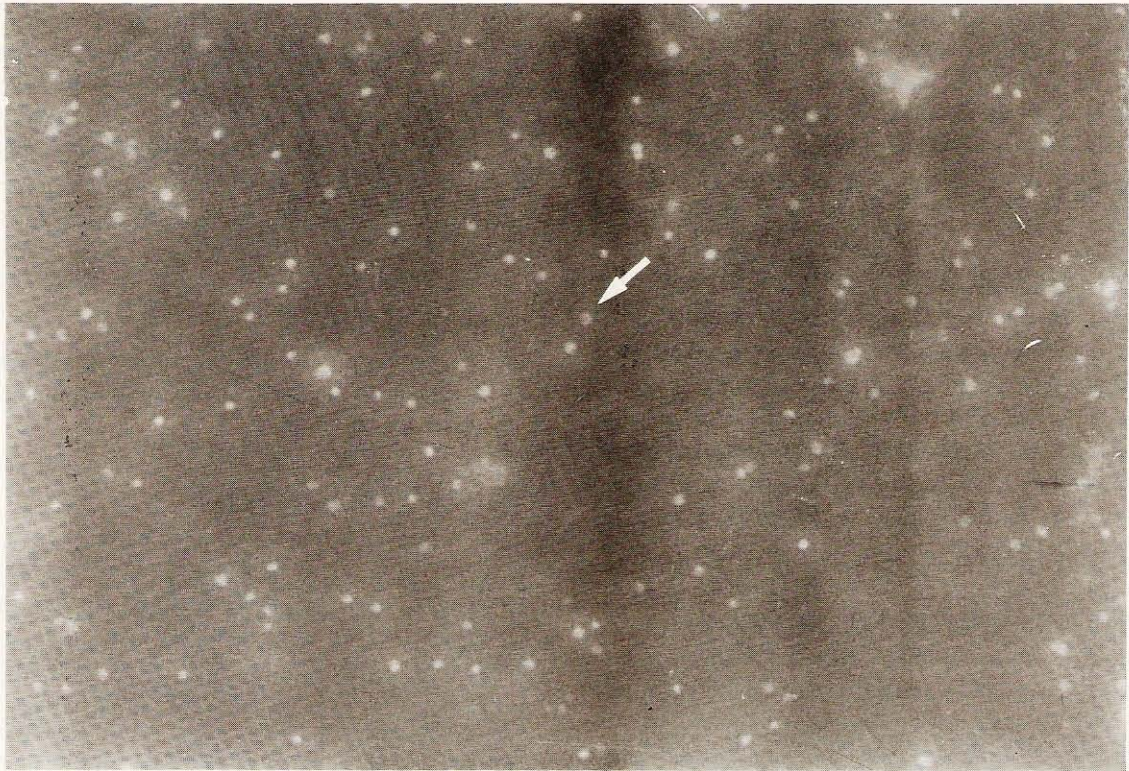


FIGURA 1. MICROIMAGEN DE UN FROTIS-ANTÍGENO CORRESPONDIENTE A UN BOVINO NEGATIVO A *Anaplasma marginale* USANDO LA TÉCNICA DE I.F.I. OBSERVE CÓMO LOS ANAPLASMAS TOMAN UNA COLORACIÓN VERDE OPACA. 1250x.

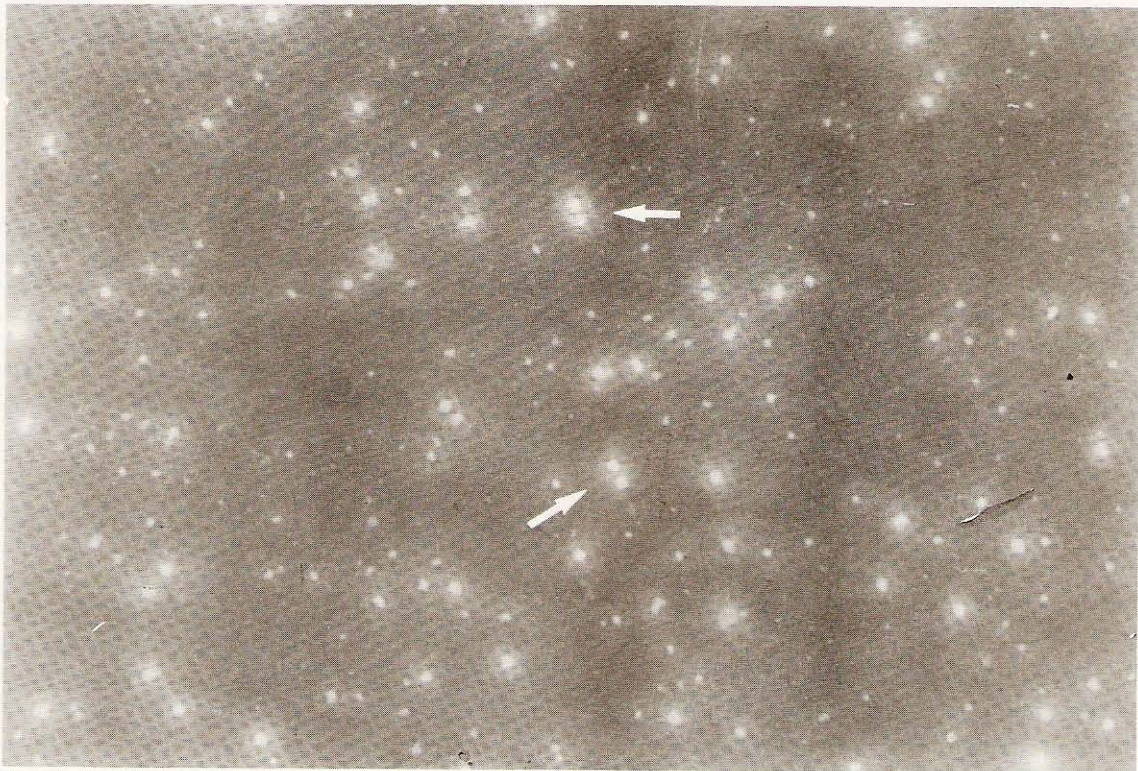


FIGURA 2. MICROIMAGEN DE UN FROTIS-ANTÍGENO CORRESPONDIENTE A UN BOVINO POSITIVO A *Anaplasma marginale* USANDO LA TÉCNICA DE I.F.I. OBSERVE CÓMO LOS ANAPLASMAS TOMAN UNA COLORACIÓN VERDE MANZANA BRILLANTE. 1250x.

TABLA I

PORCENTAJES DE ACUERDO ENTRE FROTIS CONVENCIONAL E I.F.I. PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Anaplasma marginale*

	I.F.I.				Total
	Dilución 1:80		Dilución 1:160		
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Frotis Convencional Positivo	36 (48.6%)	-	35 (47.3%)	1 (1.35%)	36 (48.6%)
Frotis Convencional Negativo	38 (51.3%)	-	30 (40.5%)	8 (10.8%)	38 (51.3%)
Total	74 (100%)	-	65 (87.8%)	9 (12.16%)	74 (100%)

TABLA II

PORCENTAJES DE ACUERDO ENTRE FROTIS DE CAPA BLANCA E I.F.I. PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Anaplasma marginale*

	I.F.I.				Total
	Dilución 1:80		Dilución 1:160		
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Frotis de Capa Blanca Positivo	42 (56.7%)	-	39 (52.7%)	3 (4.0%)	42 (56.7%)
Frotis de Capa Blanca Negativo	32 (43.2%)	-	26 (35.1%)	6 (8.1%)	32 (43.2%)
Total	74 (100%)	-	65 (87.8%)	9 (12.16%)	74 (100%)

al usar dilución 1:160, 30 (40.5%) resultaron positivas y 8 (10.8%) resultaron negativas, TABLA I.

Al realizar la técnica de I.F.I. en las 42 (56.7%) muestras positivas por el método de frotis de capa blanca, todas ellas resultaron positivas a la dilución 1:80 y 39 (52.7%) resultaron positivas a la dilución 1:160, 3 (4%) fueron negativas a la dilución 1:160. Así mismo, de las 32 (43.2%) muestras negativas al frotis de capa blanca, todas fueron positivas a la técnica de I.F.I. a la dilución 1:80 y 26 (35.1%) a la dilución 1:160, 6 (8.1%) fueron negativas a esa misma dilución, TABLA II.

De esta manera, con la técnica de I.F.I. obtuvimos 74 (100%) muestras positivas a la dilución 1:80 y 65 (87.8%) a la dilución 1:160, 9 (12.1%) resultaron negativas a la dilución 1:160.

Al utilizar los frotis-antígenos para las diferentes muestras, nos percatamos de la presencia de algunas muestras positivas a *Paranaplasma caudatum* y *Paranaplasma discoide* (FIG. 3). Se observó que de las 74 muestras procesadas, 37 (50%) fueron positivas a *Paranaplasma spp.* en la dilución 1:80 y 37 (50%) fueron negativas; mientras que en la dilución 1:160, 25 (33.7%) fueron positivas y 49 (66.2%) fueron negativas.

Debemos destacar que un lote de frotis antígenos detectó solamente *A. marginale*, mientras que el otro lote (de un animal diferente) detectó *A. marginale*, *P. caudatum* y *P. discoide*.

En cuanto a los exámenes hematológicos, se observó que de los 74 animales muestreados, 2 animales presentaron anemia, los demás animales no manifestaron ningún tipo de alteración hematológica.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El desarrollo de una técnica serológica como método de diagnóstico de la anaplasmosis bovina, ha sido durante años la meta de nuestro laboratorio. Esta técnica es importante en aquellos casos donde los animales no manifiestan sintomatología clínica o cuando no se observa la presencia de *A. marginale* en los frotis sanguíneos convencionales o de capa blanca.

A pesar de lo difícil que es la elaboración de los antígenos, pudimos lograr la realización de 2650 frotis antígenos de los cuales 1.800 contenían *A. marginale* y 850 contenían *A. marginale*, *P. caudatum* y *P. discoide*. Logrando así el establecimiento de la técnica de I.F.I. como método de diagnóstico.

Desde 1966, la técnica de I.F.I. fue usada esporádicamente como método de diagnóstico de la anaplasmosis bovina, debido a la fluorescencia inespecífica, lo que hacía dudar de los resultados. En 1985 Goff y col. [8], introdujeron a la técnica de I.F.I. un microfluorómetro para graduar el porcentaje de fluorescencia y eliminar la fluorescencia inespecífica, pero

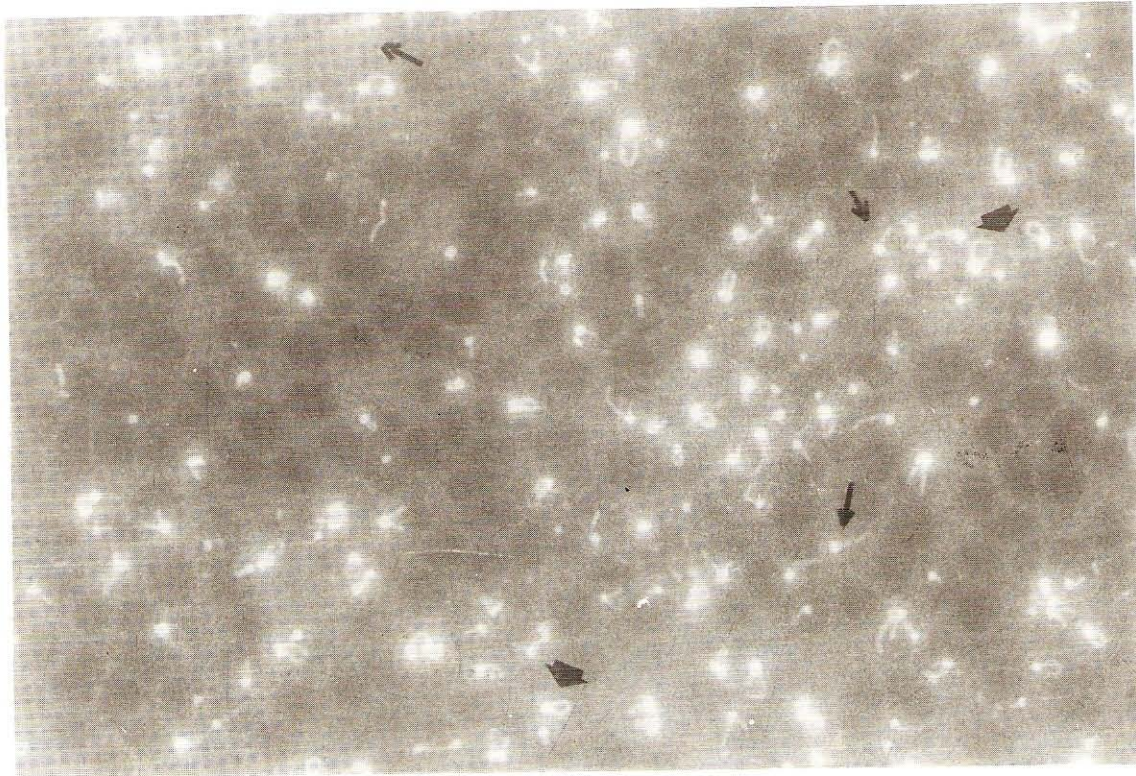


FIGURA 3. MICROIMAGEN DE UN FROTIS-ANTÍGENO CORRESPONDIENTE A UN BOVINO POSITIVO A *Paranaplasma caudatum* Y *Paranaplasma discoide* USANDO LA TÉCNICA DE I.F.I. LA FLECHA FINA SEÑALA *P. caudatum* Y LA FLECHA GRUESA *P. discoide*. También se puede observar *Anaplasma marginale*. 1250x.

se encontraron con áreas de frotis que contenían escasos *A. marginale*, lo que hizo un poco difícil medir el grado de fluorescencia y al compararlo con otras técnicas serológicas, resultó menos sensible.

Para la elaboración de nuestros frotis antígenos seguimos la técnica descrita por Montenegro [20] en el uso del buffer glicina, además de sangre que contenía un alto grado de parasitemia (21.6% y 38.5%), lo que optimizó nuestros resultados, al obtener escasa o ninguna fluorescencia inespecífica, a diferencia de Goff [8] que tenía un 12% de parasitemia en sus frotis-antígenos.

Los resultados obtenidos de las 74 muestras de sueros corroboró que la técnica de I.F.I. es más eficiente para determinar animales portadores en comparación a los métodos tradicionales de observación de frotis sanguíneos convencionales o de capa blanca.

Al obtener 100% de sueros positivos a la dilución de 1:80 y 87.8% a la dilución 1:160, llegamos a la conclusión de que la dilución 1:80 es suficiente para detectar animales portadores. Por lo que, nuestros resultados concuerdan con los hallazgos de González [9], donde obtuvo un 98% de seropositivos en animales no enfermos, de Montenegro [20] con un 100% de seropositivos en animales vacunados y de Ajayi [1] que obtuvo un 79.4% de seropositivos en Nigeria. Así mismo, Toro en 1990 [34], obtuvo un 78.7% de seropositivos en nuestra región, cuando realizó un estudio epidemiológico en varias

regiones de Venezuela. Hay que hacer notar que nosotros obtuvimos un 100% de seropositivos en 3 fincas ubicadas en diferentes zonas del Edo. Zulia, de allí la importancia de realizar estudios de prevalencia e incidencia de la enfermedad en nuestra región.

En 1962 Madden [19] y en 1963 Kreier y Ristic [14,15,16], observaron una estructura parecida a un apéndice o cola unida al cuerpo marginal del anaplasma, al cual le denominaron *Paranaplasma caudata*. Luego en 1974, este organismo fue clasificado como *P. caudatum* y *P. discoide* [26,29]. Sin embargo, a través de los estudios realizados en microscopía electrónica por Smith y colaboradores [32], determinaron que este apéndice correspondía a una reorganización de tipo proteico del eritrocito, por lo que lo consideraron como una variante morfológica entre cepas de campo [6,31,32].

Nuestros frotis-antígenos pudieron detectar la presencia de *P. caudatum* y *P. discoide*, de la misma manera que lo evidenció Vizcaino, citado por Mora [23], en Colombia cuando preparó sus frotis-antígenos para un estudio inmunológico. La seropositividad del 50% de los sueros a *P. discoide* y *P. caudatum* y la seronegatividad del mismo porcentaje en las 74 muestras, nos hace pensar que el *Paranaplasma spp.* es un agente diferente al *A. marginale* y no una variante morfológica de campo, tal como lo cita Smith [32]. Por lo que se requerirán de otros estudios para confirmar o negar nuestras observaciones.

AGRADECIMIENTO

Los autores quieren expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de L.U.Z. (CONDES), por el financiamiento del proyecto. Asimismo, al Laboratorio Pfizer de Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ajayi, S.A. and Dipeolu, O.O. Prevalence of *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in Nigerian cattle using serological methods. *Veterinary Parasitology*. 22. 147-149. 1986.
- [2] Aso, P. Respuesta Inmune en Anaplasmosis. Colección Cuadernos U.S.B. Serie Biología Nº 1. Caracas. Editores S. Giardina y F. García. Universidad Simón Bolívar. Universidad Central de Venezuela. 89-106. 1990.
- [3] Blood, D.C.; Henderson, J.A.; Radostits, O.M. *Medicina Veterinaria* (6ta. ed.). Interamericana S.A. México D.F. 958-961. 1988.
- [4] Blovin, E.; Blankemeyer, J.; Konca, K.; Ewing, S. Effect of 4-bromo-calcium ionophore A23187 on release of *Anaplasma marginale* from bovine erythrocytes in vitro. *American Journal Veterinary Research*. 54.2. 263-269. 1993.
- [5] Brinton, L. and Thomas, G. Bovine anaplasmosis elimination of the carrier state with injectable long acting oxytetracycline. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 183.1. 63-65. 1983.
- [6] Espana, E.M. and Espana, C. *Anaplasma marginale*. II Further Studies of Morphologic Features with Phase Contrast and Light Microscopy. *American Journal Veterinary Research*. 24. 713-722. 1963.
- [7] Giardina, S.M. Fisiopatología de la Interacción Anaplasma-Hospedador. Colección Cuadernos U.S.B.. Serie Biología Nº 1. Caracas. Editores S. Giardina y F. García. Universidad Simón Bolívar - Universidad Central de Venezuela. 73-84. 1990.
- [8] Goff, W.L.; Johnson, W.C.; Kuttler, K.L. Developmet of an Indirect Fluorescent Antibody test, using microfluorometry as a diagnostic test for bovine anaplasmosis. *American Journal Veterinary Research*. 46.5. 1080-1088. 1985.
- [9] González, E.F. and *et al.* Comparisons of the Complement Fixation, Indirect Flurescent Antibody and Card Aglutination test for the diagnosis of bovine anaplasmosis. *American Journal Veterinary Research*. 39. 1538-1978.
- [10] Henry, E.T.; Norman, B.B.; Fly, D.E.; Wichmann, R.W. and York, S.M.. Effects and use of a modified live *Anaplasma marginale* Vaccine in Beef heifers in California. *Journal of the American Veterinary Medical Asociation*. 183.1. 66-69. 1983.
- [11] Jacobs, R. Spherocytosis associated with anaplasmosis in two cows. *Journal of the American Veterinary Medical Asociation*. 188.9. 1061-1063. 1986.
- [12] Konca, K.M.; Hsu, K.; Hair, J. and Ewing, S.A. Demostration of *Anaplasma marginale* theiler in *Dermacentor variabilis* (say) by Ferritin conjugated antibody techique. *American Veterinary Research*. 41.12. 1977-1981. 1980.
- [13] Kreier, J.P.; and Ristic, M. Studies in anaplasmosis IV development of the causative agent in deer erythrocytes transfused into Calves. *American Journal Veterinary Research*. 22. 790-794. 1961.
- [14] Kreier, J.P.; and Ristic, M. Anaplasmosis, X morphologic characteristics of the parasites present in the blood of calves infected with the Oregon strain of *Anaplasma B marginale*. *American Journal Veterinary Research*. 24. 676-687. 1963.
- [15] Kreier, J.P.; and Ristic, M. Anaplasmosis, XI immunoserologic characteristics of the parasites present in the blood of calves infected with the Oregon strain of *Anaplasma marginale*. *American Journal Veterinary Research*. 24. 688-696. 1963.
- [16] Kreier, J.P.; and Ristic, M. Anaplasmosis XII the growth and survival in deer and sheep of *Anaplasma marginale*. *American Journal Veterinary Research*. 24. 697-702. 1963.
- [17] León, E. Curso de técnicas de inmunofluorescencia aplicada a la parasitología (*B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*). FONAIAP-CENIAP. 12-19. 1985.
- [18] Lohr, K.; Ross, J. and Meyer, I.H. Studies of homologous and heterologous antibody response to infections with *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* using indirect fluorescent antibody test. *Journal of Biological Chemistry*. 193-265. 1973.
- [19] Madden, P.A. Estructures of *Anaplasma marginale* observed by using fluorescent antibody technique. *American Journal Veterinary Research*. 23. 921-924. 1962.
- [20] Montenegro, S.; James, M. and Ristic, M. Modified indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Anaplasma marginale* infections in cattle. *American Journal Veterinary Research*. 46.11. 2401-2403. 1985.

- [21] Montenegro, S.; Toro, B.; León, A.; Back, B.; Guillén, A.T. y López, R. Inducción de inmunidad protectora contra la anaplasmosis bovina usando un inmunógeno corpuscular purificado de *Anaplasma marginale*. *Veterinary Tropical*. 15. 56-57. 1990.
- [22] Montenegro, S.; Guillén, T. y Toro, M. Dot-Elisa para el diagnóstico serológico de la anaplasmosis y babesiosis bovina. *Revista Científica. Facultad de Ciencias Veterinarias de L.U.Z.* 2.2.23-29. 1992.
- [23] Mora, H. Anaplasmosis. Impreso. Bogotá - Colombia. Departamento técnico salud animal. Pfizer. 3,7,8,11-18. 1993.
- [24] Odreman, L.; Márquez N. y Aso P.M. Anaplasmosis bovina integración de los parámetros hematológicos, serológicos e inmunológicos durante el seguimiento de bovinos infestados experimentalmente *A. marginale*. XXXIV. ASOVAC. 1984.
- [25] Ristic, M. Estructura del Anaplasma. Resumen X Congreso Panamericano de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Maracay - Venezuela. Editado por el Centro de Investigaciones Veterinarias y Dirección de investigación del M.A.C. 3-7. 1971.
- [26] Ristic, M. Parasitic Protozoa. (Vol. 4). New York. Edit. J.P. Kreier Acad. Press. 239-249. 1977.
- [27] Rivera, M. Biología de hemoparasitosis de bovinos y equinos y de sus vectores. Colección Cuadernos U.S.B. Serie Biología Nº 1. Caracas. Editores S. Giardina y F. García. Universidad Simón Bolívar - Universidad Central de Venezuela. 11-28. 1990.
- [28] Romero, M.G.; Aso P.M., Dénjoy G. y Screminmg. Anticuerpos Antianaplasma en calostro y su transferencia a la descendencia en bovinos portadores de *A. marginale* XXXVII. AsoVAC. 1987.
- [29] Schalm, O. and Jain, N.C. *Veterinary Hematology*. (4ta. ed.). Philadelphia. Lea & Febiger. 590-595. 1986.
- [30] Schunter, C.A. and Leatch, G. Radioimmunoassay for *Anaplasma marginale* antibodies. *American Journal Veterinary Research*. 49. 504-507. 1988.
- [31] Simpson, C.F.; Kling, J.M. and Neal, F.C. The nature of bands in parasitized bovine erythrocytes. *Journal of cell biology*. 27. 225-235. 1965.
- [32] Smith, R. Técnicas de tinción de *Anaplasma marginale* para identificar el apéndice caudal. Colección Cuadernos U.S.B. Serie Biología Nº 1. Caracas. Editores S. Giardina y F. García. Universidad Simón Bolívar - Universidad Central de Venezuela. 223-226. 1990.
- [33] Smith, R.; Hungerford, L. and Armstrong, C. Epidemiologic investigation and control of an epizootic of anaplasmosis in cattle in winter. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 195.4 476-480. 1989.
- [34] Toro, M. Seroepidemiología de las hemoparasitosis en Venezuela. Colección Cuadernos U.S.B. Serie Biología Nº 1. Caracas. Editores S. Giardina y F. García. Universidad Simón Bolívar - Universidad Central de Venezuela. 33-39. 1990.
- [35] Zaugg, J. Seasonality of natural transmission of bovine anaplasmosis under desert mountain range conditions. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 196.7. 1106-1109. 199.