

Dinámica de anticuerpos e infección activa por *Anaplasma marginale* en becerras*

José Luis Rodríguez Peraza¹ / María Dalila Forlano Riera² / Roy Daniel Meléndez Meléndez³

Resumen

Históricamente, la especie bovina ha sido de vital importancia para el hombre como animal de abasto, por lo que el cuidado y protección a esta especie es muy importante. A nivel mundial existen diversas enfermedades que atacan el ganado bovino, entre las cuales se encuentra anaplasmosis bovina. La presente investigación no experimental de campo tiene como objetivo evaluar la dinámica de anticuerpos anti-*Anaplasma* y determinar en qué momento el animal presenta infección activa. Para ello, se escogió una población de 35 becerras ubicadas en la unidad de producción del municipio Crespo, en el estado de Lara, Venezuela. A las becerras, de 0 a 7 días de nacidas, se le extrajo la sangre en tubos con anticoagulante, para realizar frotis de capa blanca y determinación del hematocrito, y sin anticoagulante, para la inmunofluorescencia indirecta. Posteriormente, fueron muestreadas cada 15 días hasta obtener un total de 12 muestras por cada becerro. Para analizar los datos, fue utilizada la prueba estadística X^2 del programa estadístico Epi Info versión 3.5.4. Se obtuvo un 79,05 % de positividad y 100 % de seropositividad para *Anaplasma marginale*. Se concluyó que los altos valores obtenidos con las pruebas serológicas son indicativos de animales con memoria inmunológica, lo que quiere decir que no necesariamente estarían infectados al momento del muestreo. Asimismo, se confirma la capacidad de la especie bovina de crear un estado de premunición ante la anaplasmosis a edades tempranas y mantenerla por un periodo prolongado, de modo que se encuentra una estabilidad enzoótica en la unidad de producción.

Palabras clave: anticuerpos, dinámica, *Anaplasma marginale*, infección, inmunofluorescencia indirecta

* Artículo de investigación.

1 Médico veterinario, MSc en Producción Animal, especialista en Medicina Veterinaria Preventiva.

✉ lerod25@gmail.com

🌐 <https://orcid.org/0000-0001-8279-0445>

2 Médico veterinario, MSc en Parasitología Veterinaria, doctor en Parasitología Veterinaria. Unidad de Investigación en Parasitología Veterinaria (Unipravet). Barquisimeto, Lara, Venezuela.

✉ mforlano@ucla.edu.ve

🌐 <https://orcid.org/0000-0002-9235-3430>

3 Médico veterinario, MSc en Parasitología. Unidad de Investigación en Parasitología Veterinaria (Unipravet). Barquisimeto, Lara, Venezuela.

✉ empleomatic@gmail.com

🌐 <https://orcid.org/0000-0002-7460-2181>

Dynamics of *Anaplasma marginale* Active Infection and Antibodies in Calves

Abstract

Bovine species has been historically of high importance to the human beings as a provision animal. Therefore, it is highly important to care and protect this species. There are different diseases attacking the bovines around the world, such as the bovine anaplasmosis. This non-experimental research in the field aims to evaluate the dynamics of anti-*Anaplasma* antibodies and to determine when the animal has an active infection. To do so, a population of 35 female calves was used from the production unit in the town Crespo, Lara State, Venezuela. Female calves, from 0 to 7 days born, were taken blood samples in test tubes with anticoagulant. Then a white smear test was carried out and the hematocrit was determined. Samples without anticoagulant were taken to do an indirect immunofluorescence test. The calves were taken blood samples every 15 days in order to complete 12 samples from each individual calf. For the data analysis, the statistical test

Cómo citar este artículo: José Luis Rodríguez Peraza, María Dalila Forlano Riera, Roy Daniel Meléndez Meléndez. Dinámica de anticuerpos e infección activa por *Anaplasma marginale* en becerras. Rev Med Vet. 2020;(40):35-44. <https://doi.org/10.19052/mv.vol1.iss40.4>

χ^2 from the software Epi Info v.3.5.4 was used. Positive tests accounted for 79.05 % of the samples and seropositiveness for *Anaplasma marginale* reached 100%. It is concluded that the high values resulting from the serologic tests indicate that these animals have an immune memory, which means, in turn, that they were not necessarily infected at the time of being taken the samples. Likewise, this study confirms that this species is able to create a pre-immunity condition to the anaplasmosis at an early age and to keep it for a long term. This way, they reach an enzootic balance in the production unit.

Keywords: antibodies, dynamics, *Anaplasma marginale*, infection, indirect immunofluorescence

INTRODUCCIÓN

Los parásitos sanguíneos o hemotrópicos son organismos que pueden ser transmitidos a los animales domésticos por vectores mecánicos y biológicos. Su presencia en los animales domésticos produce cuadros hemáticos, ya que tienen afinidad por el torrente sanguíneo, lo que trae un efecto negativo en la salud animal, y produce grandes pérdidas en las explotaciones bovinas (1). Estas se reflejan principalmente en deficiencias en la ganancia de peso, reducción de la producción láctea, altas inversiones en productos farmacéuticos, atención veterinaria y mortalidad. Este constituye un problema grave en más del 70 % de los países en desarrollo (2,3), pues se genera un detrimento económico que atenta contra los productores y la seguridad agroalimentaria.

La anaplasmosis, o fiebre de Texas, es una enfermedad causada por rickettsias del género *Anaplasma* (*Anaplasma marginale* y *Anaplasma centrale*). Se caracteriza por la presencia de fiebre, que puede permanecer elevada o fluctuar en periodos irregulares; anemia; ictericia; constipación, principalmente a nivel del omaso; anorexia; disminución de la producción; aumento de tono cardíaco, y, en ocasiones, abortos (4,5,6). Los rebaños de Venezuela, por ser un país ubicado en el trópico, están expuestos a los problemas que se puedan presentar por la presencia de este hemotrópico (7). Esta enfermedad se transmite a través de vectores hematófagos, tanto de manera biológica y mecánica como iatrogénica. Es importante destacar que la fuente infecciosa de este agente infeccioso la constituye casi siempre un animal infectado. Una vez que el animal se infecta puede permanecer como portador por años, e incluso por vida en algunos casos, aun cuando esta rickettsia no pueda ser demostrable en la sangre (8,9).

Durante los últimos años ha existido un gran progreso en el conocimiento del sistema inmune de los bovinos y su funcionamiento. Se sabe que los bovinos difieren del humano y de otros animales de laboratorio en la forma

de transferencia de inmunidad materna, en el contenido y en la composición de inmunoglobulinas en calostro y leche. Por su estructura placentaria, no hay paso de las inmunoglobulinas a través de la placenta en la gestación (10).

La detección de este patógeno se hace a través del diagnóstico clínico, métodos directos e indirectos. Uno de los métodos directos es el frotis sanguíneo la identificación directa de *Anaplasma marginale* en la sangre periférica de animales infectados. Existe un grupo de técnicas de tipo indirecto que permiten la detección de anticuerpos específicos circulantes, para la identificación de bovinos portadores asintomáticos. Estas últimas son técnicas serológicas y se aplican a grupos de animales. Todas estas pruebas poseen fundamento inmunológico. Las más comunes utilizadas en la actualidad son: inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo inmunoenzimático (prueba Elisa) (11).

El ganado debe ser protegido contra enfermedades infecciosas para lograr su óptimo rendimiento. Por esta razón, en las explotaciones bovinas debe tenerse muy presente en qué momento el animal está mayormente expuesto tanto a contraer *Anaplasma* como a padecer la enfermedad producida por esta y en qué momento el sistema inmune comienza a crear anticuerpos para poder defenderse; así, el productor puede tener en cuenta un mayor cuidado desde el nacimiento de la cría para combatir esta enfermedad. El desarrollo de vacunas efectivas y eficientes puede ser una de las estrategias más viables. En este sentido, nace la interrogante por el momento en que el bovino comienza a desarrollar esa inmunidad contra esta rickettsia y cómo se prolonga en su primera fase de crecimiento, para poder enfrentar con éxito este patógeno. En este estudio, se planteó como objetivo principal evaluar la dinámica de anticuerpos e infección activa de *Anaplasma marginale* en becerras de una unidad de producción del municipio Crespo del estado de Lara.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de la investigación

El presente estudio se clasificó como de campo no experimental y longitudinal, ya que se trató de una recolección de datos a través del tiempo en puntos o periodos, para hacer inferencias respecto al cambio, sus determinantes y consecuencias (12).

Unidad de producción

El trabajo se realizó en una finca de ganado lechero ubicada en las afueras de la población de Duaca, en la carretera vía Los Chispes km 1, en el municipio Crespo del estado de Lara, Venezuela, latitud 10°16' N, longitud 69°09' O, altitud de 735 m s. n. m. con una precipitación media anual de 755,6 mm, temperatura media de 24 °C, una humedad relativa media de 75 %, y clasificada como una zona climática de semiárido templado (13).

Población y muestra

La población está representada por el número total de becerras en la explotación. Se tomó como criterio de inclusión para la selección de la muestra y el desarrollo del proyecto a las becerras con una edad de 0 a 7 días de nacidas en un periodo de 7 meses. De este criterio resultaron 35 becerras de la misma raza y edad.

Toma de muestras

Se realizaron con repeticiones cada 15 días hasta los primeros 5 meses de edad para un total de 12 muestras por animal a las 35 becerras durante todo el estudio (septiembre-abril). Las muestras consistieron en la extracción de 3 ml de sangre directamente de la vena yugular en tubos estériles Vacutainer® con anticoagulante etilendiaminotetracético (EDTA) y con ayuda de agujas estériles (Vacutainer Becton Dickinson), previa desinfección de la zona con alcohol isopropílico. Igualmente, se extrajo 3 ml de sangre de cada bovino, que fueron colocados en tubos estériles sin anticoagulante a fin de separar el suero sanguíneo, previa la realización del examen clínico.

Diagnóstico de la ocurrencia de infección activa de *Anaplasma marginale* en becerras mediante el examen microscópico de frotis de capa blanca

Se tomó una cantidad de sangre del tubo Vacutainer® con anticoagulante, en un tubo de microhematocrito y se centrifugó para separar los elementos formes de la sangre. Posteriormente se depositó una gota que contuviera plasma, glóbulos rojos y células blancas en un portaobjeto, y se realizó un extendido de sangre de forma rápida y firme; luego se secó al aire y posteriormente fue coloreada con Hemacolor®, para su posterior observación a través de microscopio óptico con objetivo de 100 y ocular de 10. Se examinaron 1000 a 5000 eritrocitos escogidos al azar en el frotis; esta técnica se realizó con la finalidad de diagnosticar parasitosis bajas, ya que permite concentrar las células de modo que las posibilidades de diagnóstico de infecciones activas a *Anaplasma* aumenten (14).

Cuantificación de la dinámica de anticuerpos anti-*Anaplasma marginale* mediante diluciones, con la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Esta cuantificación se realizó mediante diluciones a través la técnica de inmunofluorescencia (IFI). El suero que se extrajo de los tubos Vacutainer® sin anticoagulante se utilizó para la detección de los anticuerpos contra *A. marginale*. La técnica de IFI se aplicó según el método descrito Basalo *et al.* (15), y se utilizaron como antígeno eritrocitos infectados con *Anaplasma marginale*. Las muestras fueron observadas en un cuarto oscuro. Para esto, se utilizó un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, Japón) con lámpara de mercurio. Los sueros positivos fueron aquellos en donde la *Anaplasma* presentó fluorescencia de color verde brillante, mientras lo sueros negativos no exhibieron fluorescencia. La determinación del hematocrito (Hm) se realizó a partir de las muestras de sangre con anticoagulante inmediatamente después de la llegada al laboratorio. Como indicadores del grado de anemia, el método empleado fue la técnica del microhematocrito (16). Con los

microcapilares centrifugados se procedió a medir a través de la escala de lectura el porcentaje de Hm para cada bovino.

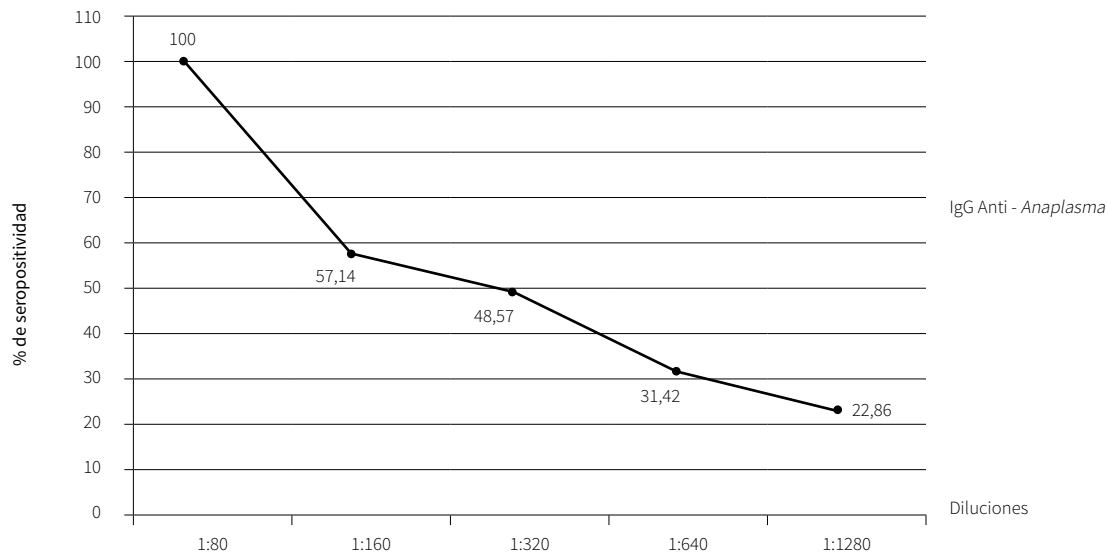
Análisis de datos (análisis estadístico)

Se aplicó la prueba estadística X^2 del programa estadístico Epi Info, versión 3.5.4. y la prueba t para muestras relacionadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

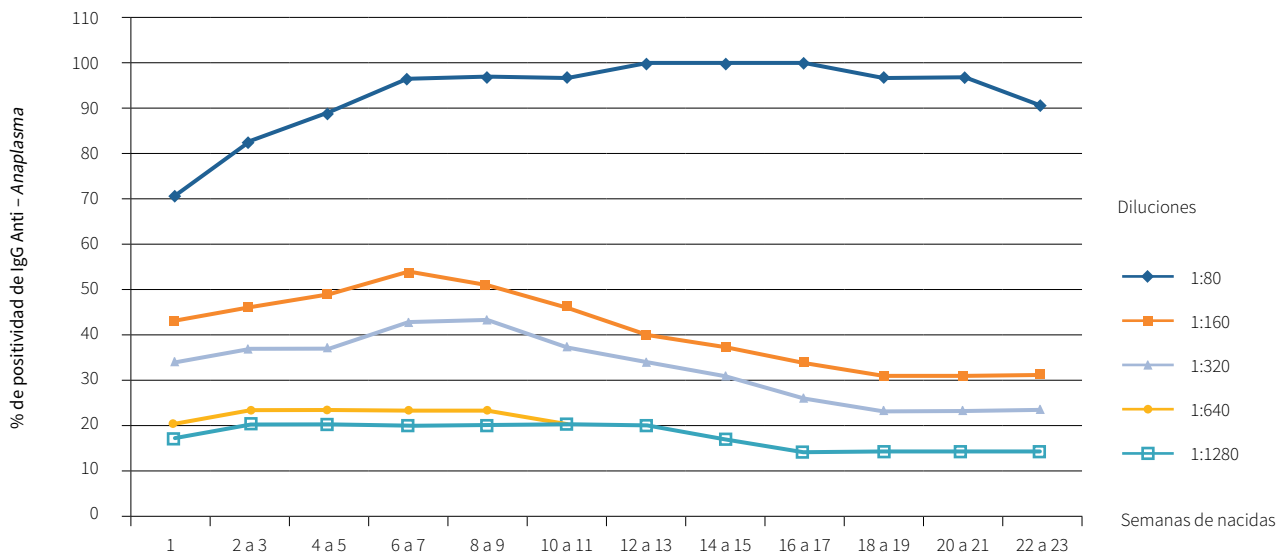
En cuanto a la dinámica de anticuerpos IgG (figuras 1 y 2), en la dilución 1:80 se observó un 100 % de animales positivos a la presencia de anticuerpos contra *Anaplasma marginale*; en la dilución 1:160, se presentó un 57,14 %; en la dilución 1:320, se presentó un 48,57 %; en la dilución 1:640, se presentó un 31,42 %; y en la dilución 1:1280, se presentó un 22,86 %. Los animales restantes en cada dilución resultaron negativos.

Figura 1. Dinámica de anticuerpos o porcentaje de bovinos seropositivos a la presencia de IgG anti-*Anaplasma* en las diluciones usadas por IFI.



Fuente: elaboración propia.

Figura 2. Porcentajes de bovinos positivos a la presencia de IgG anti-*Anaplasma* en todas las diluciones del IFI durante las 23 semanas.



Fuente: elaboración propia.

Geográficamente, una zona se considera epidemiológicamente estable a anaplasmosis, cuando el 75 % de los bovinos en edades de 3 a 9 meses son seropositivos a la presencia de anticuerpos contra *Anaplasma* spp. (17). Los resultados obtenidos en este estudio permiten categorizar a esta unidad de producción como una zona de estabilidad enzoótica para *A. marginale*. Esta condición favorece mantener el equilibrio entre el parásito y los animales, condicionante para que no se presente la enfermedad en forma aguda en las becerros que serán el reemplazo de esta explotación. En cuanto a la comparación de las diferentes diluciones que se les realizaron a los sueros sanguíneos, estadísticamente la prueba de correlación de Pearson encontró diferencias significativas con un 95 % de confianza ($p < 0,05$), a excepción de la dilución 1:80.

Estos anticuerpos pudieron ser transferidos de la madre a través del calostro; en este caso, los anticuerpos se mantienen hasta 30 días de edad aproximadamente y luego declinan, lo que proporciona una inmunidad

específica pasiva de manera natural. Los anticuerpos presentes en las becerros también pueden deberse a la respuesta inmune por infección activa ante la bacteria, bien sea que haya ocurrido transmisión transplacentaria de la bacteria o a través del vector. Estos resultados son muy similares a los reportados por James *et al.* (18), donde se demostró que los anticuerpos declinan aproximadamente a los 90 a 120 de edad. En anaplasmosis bovina los niveles de anticuerpos se elevan durante la etapa temprana y luego declinan durante el estado crónico de la infección; por lo tanto, los becerros que nacen en área endémicas son protegidos por los anticuerpos calostrales durante aproximadamente 2 a 4 meses de vida (19). Algunos estudios han demostrado que generalmente los becerros se infectan entre los 4 a 5 meses de edad con una buena respuesta inmunológica, que puede durar aproximadamente hasta 4 años (19).

Estos anticuerpos proporcionan una inmunidad específica activa de manera natural. La respuesta humoral está altamente relacionada con el desarrollo de resistencia.

Sin embargo, existen antígenos claves de *A. marginale* que estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes, por lo que la respuesta humoral juega un papel sumamente importante en el desarrollo de la inmunidad contra la anaplasmosis (20,21).

Los resultados encontrados en este estudio coinciden con los reportados por Guillen *et al.* (22), en cuyo estudio reportan seroprevalencia de 50,56 % de animales con reacción positiva, y con los de Díaz *et al.* (23), en donde se observó un 95,4 % de anticuerpos para *A. marginale*. Estudios realizados en el estado Zulia reflejan un alto porcentaje de positividad y advierten sobre el riesgo potencial que las infecciones subclínicas por *A. marginale* pudieran representar para los rebaños en producción, al demostrar la circulación del agente causal de la anaplasmosis en animales aparentemente sanos (24).

Los resultados que presenta esta investigación tienen concordancia con otra investigación realizada en Argentina en la provincia de Corrientes. Estudios demuestran seroprevalencia para *A. marginale* (26) entre un 97,5 % y un 100 %. Estos resultados también concuerdan con los reportados de Bella Vista, donde se encontró una seroprevalencia del 86,5 % (27), así como los reportados por Eleizalde (27), en una finca del estado de Guárico, donde se encontró una seroprevalencia de 97 %. Más adelante, Cipolini *et al.* (26) evaluaron la dinámica de anticuerpos contra *A. marginale* durante los primeros 6 meses de vida en 40 terneros, donde el índice más bajo reportado fue 58,94 % de positividad y el índice más alto fue de 75 % de positividad. Estos resultados son muy similares a los reportados en este estudio.

Por otra parte, los resultados que se observaron en el presente estudio no concuerdan con los reportados en Paraíba, Brasil, donde se evaluó la seroprevalencia de *A. marginale* en 509 vacas, con la técnica de diagnóstico indirecto inmunofluorescencia cuyo reporte dejó valores medios de seroprevalencia de 15,0 % (27); dicha diferencia pudiera deberse a que trabajaron con anima-

les adultos. Por su parte, Barbosa *et al.* (28) reportaron una seroprevalencia de 25 % en 800 búfalos al norte de este país, resultados que tampoco concuerdan con los reportados en este estudio; dichas diferencias pueden atribuirse a la especie estudiada.

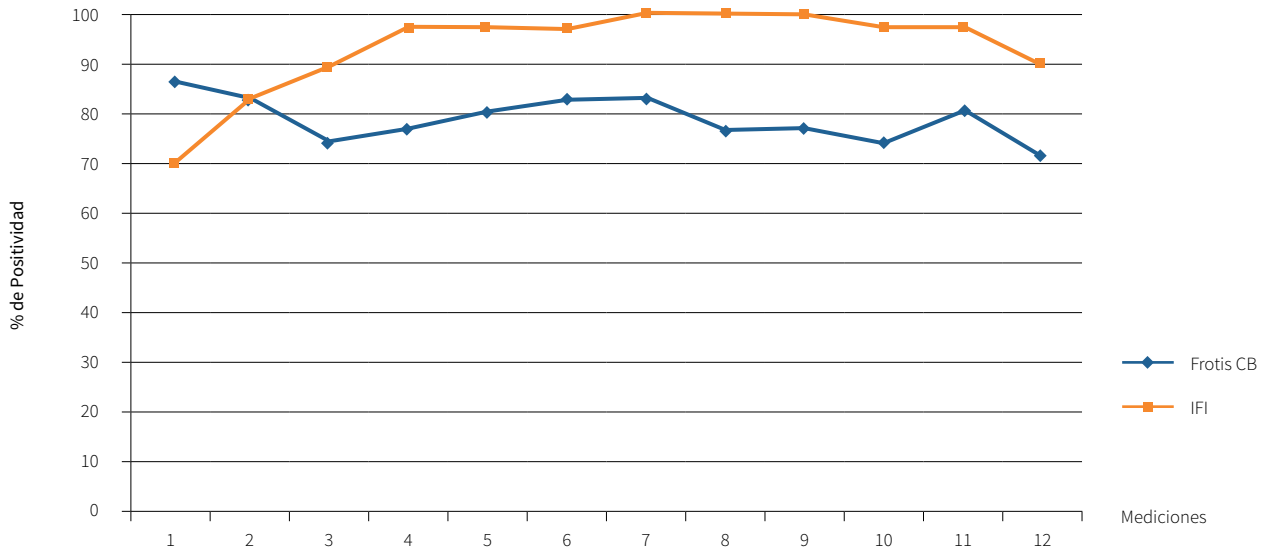
En la provincia Galápagos se reportan resultados similares a los encontrados en este estudio, con seroprevalencia de 64,1 % en 184 bovinos adultos (29). En otra investigación realizada en búfalos por Lira-Amaya *et al.* (30), se reporta seroprevalencia de hasta un 25,4 % de positividad a *Anaplasma marginale* en 233 animales en Veracruz, México, resultados que difieren con los de esta investigación

Asociación del porcentaje del hematocrito, la infección activa de *Anaplasma marginale* con los niveles de anticuerpos detectados por IFI

Para comparar la eficacia de las técnicas diagnósticas con IFI y frotis de CB, se realizó el método estadístico de X^2 . Se encontró que en todas las mediciones se comportaron igual salvo en la segunda medición, donde hubo diferencia significativa ($p < 0,05$). En el resto de las mediciones, la prueba no encontró diferencias porque la coincidencia entre ambas técnicas es alta. Se puede afirmar que ambas coinciden en el diagnóstico de la enfermedad.

En la presente investigación se reporta un alto porcentaje de muestras positivas al diagnóstico directo mediante el frotis de capa blanca (79,05 %) y un porcentaje aún mayor de positividad a la serología mediante el diagnóstico indirecto a través de la inmunofluorescencia indirecta; 100 % para la dilución 1:80; 57,14 % para la dilución 1:160; 48,57 % para la dilución 1:320; 31,42 % para la dilución 1:640; y 22,86 % para la dilución 1:1280 (figura 3). No obstante, no se evidencia sintomatología clínica ya que los animales jóvenes son resistentes a la enfermedad y por esa razón no hay disminución del porcentaje de hematocrito.

Figura 3. Comparación de las frecuencias promedio de infección activa y respuesta humoral.



Fuente: elaboración propia.

Los altos valores obtenidos con las pruebas serológicas son indicativos de los animales con memoria inmunológica (anticuerpos específicos) por la exposición a los patógenos, lo que quiere decir que no necesariamente permanecían infectados al momento del muestreo (31). Asimismo, se confirma la capacidad de la especie bovina de crear un estado de premunición ante la anaplasmosis a edades tempranas y de mantenerla por un periodo prolongado, lo que le permite, en estas condiciones tropicales, desarrollar una inmunidad innata o adquirida cuando se expone a la presencia del vector y el agente infeccioso. El ganado puede contraer la enfermedad a cualquier edad; sin embargo, la mortalidad y severidad aumentan con esta. Los terneros de menos de 6 meses exhiben una resistencia natural, pues, aun cuando se infectan, raramente exhiben los signos clínicos (32). El ganado entre seis meses y tres años comienza a incrementar el padecimiento y ocurren más muertes con el avance de la edad. En general, la parasitemia y la anemia son menos graves en los animales jóvenes, posiblemente debido a que la respuesta inmune celular es mayor por

la competencia del timo, el sistema hematopoyético es más activo y por el papel más activo de la hemoglobina fetal (20).

La *A. marginale* induce en el organismo respuesta humoral y celular; sin embargo, los anticuerpos al parecer juegan un papel menos importante (11). Los animales infectados desarrollan anticuerpos, fundamentalmente del tipo IgG e IgM, y exhiben durante las últimas etapas de la infección aguda una respuesta mediada por células, en la que aparecen los macrófagos activados segregando IFN- γ , que estimula fuertemente la proliferación de linfocitos de sangre periférica (33,34). La respuesta celular se correlaciona parcialmente con el desarrollo de la inmunidad. En contraste, la respuesta humoral se correlaciona pobremente con el desarrollo de resistencia. Sin embargo, existen antígenos claves de *A. marginale* que estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes, por lo que la respuesta humoral juega algún papel en el desarrollo de la inmunidad contra la *A. marginale*. Los bovinos jóvenes tienen un nivel de resistencia natural,

pues desarrollan infección y una inmunidad adecuada (inmunidad coinfecciosa) al alcanzar la edad adulta son resistentes a la presentación clínica de la enfermedad (20,21).

CONCLUSIONES

Las 35 becerras presentaron infección activa de *Anaplasma marginale*, pero en ningún momento se presentó sintomatología clínica; por lo tanto, los animales estudiados mantienen una inmunización exitosa contra *Anaplasma marginale*, o estado de premunición. Esto confirma la capacidad de la especie bovina de crear dicho estado ante la anaplasmosis a edades tempranas y mantenerla por un periodo prolongado. El estado de premunición permite que los animales mantengan el hematocrito en valores normales y los valores obtenidos con las pruebas serológicas son indicativos de animales con memoria inmunológica, lo que quiere decir que no necesariamente permanecían infectados al momento del muestreo. Las becerras mantienen seropositividad mayor al 75 %; esto le permite a la unidad de producción encontrarse en estabilidad enzoótica para anaplasmosis.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA), Barquisimeto, Lara, Venezuela.

REFERENCIAS

1. Soto K. Determinación de la prevalencia de Anaplasmosis en el ganado bovino faenado en la Empresa Metropolitana de Rastro de Quito (EMRQ) mediante la aplicación de las técnicas de diagnóstico: microscopia de frotis sanguíneos, reacción en cadena de polimerasa (PCR) y ensayo inmunoenzimático competitivo [tesis de pregrado]. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejercito; 2010.
2. Toro M. Seroepidemiología de la hemoparasitosis en Venezuela. *Veterinaria Trop.* 1990;(4):1-13.
3. Ríos L, Zapata R, Reyer J, Mejía J, Baena A. Estabilidad enzoótica de babesiosis bovina en la región de Puerto Berrío, Colombia. *Rev. Cient.* 2010;10(5):485-92.
4. Contreras J, editor. Enfermedades de los bovinos, diagnóstico, tratamiento y control. 4ta ed. Barquisimeto: Bogue; 2009.
5. Rodríguez-Vivas R, Cob-Galera L, Dominguez-Alpizar J. Hemoparásitos en bovinos, caninos y equinos en el laboratorio de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán (1984-1999). *Rev Biomed.* 2010;(11):277-82.
6. Doyle R, Fritzen A, Bottari N, Alves M, Da Silva AD, Morsch V, et al. Imidocarb dipropionate in the treatment of *Anaplasma marginale* in cattle: Effects on enzymes of the antioxidant, cholinergic, and adenosinergic systems. *Microb Pathog.* 2016;(97):226-30. doi: 10.1016/j.micpath.2016.06.001.
7. Tamasaukas R, Agudo-Castellanos L, Silva-Ravelo A, Florio-Luis J, Vintimilla-Tamasaukas M, Ribera-Pirela S. Hemoparasitosis en ganadería doble propósito venezolana, diagnóstico y control: una revisión. *Agron Mesoam.* 2010;21(2):367-81.
8. Blood D, Radostits O, Henderson J. *Medicina Veterinaria.* México DF: Nueva Editorial Interamericana; 1986.
9. Aubry P, Geale W. A Review of Bovine Anaplasmosis. *Transbound Emerg Dis.* 2011;58(1):1-30. doi: 10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x.
10. Pastoret P, Griebel P, Bazin H, Govaerts A, editores. *Immunology of cattle.* In: Handbook of vertebrate immunology. Nueva York: Academic Press; 1998. pp. 439-84.
11. Bautista GCR, Angeles L, García-Ortiz M, García-Tapia D. Variation of peripheral blood BoCD2+, BoCD4+, and BoCD8+ lymphocytes, the BoCD4:BoCD8 index and IgG antibodies in bovines infected and rechallenged with isolates of *Anaplasma marginale* of Mexican Origin. *Rev Latinoam Microbiol.* 2000;42(3):101-9.
12. Árias F. *El Proyecto de Investigación: guía para su elaboración.* 3.ª edición. Caracas: Editorial Episteme, Oriol Ediciones; 1999.
13. Fernández M, Canto G, Aboytes R. Prevalencia de anticuerpos séricos en contra de *Babesia* spp. y *Anaplasma*

- marginale* en el municipio de Santiago Ixcuintla, Nayarit. Rev Vet Mex. 1995;4(26):407-9.
14. Instituto Internacional de Cooperación para la Agricultura. Diagnóstico directo. En: Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovinas. San José de Costa Rica: IICA; 1987. p. 23-6.
 15. Basalo A, Parra O, Arraga C, León E, Guillén A. Establecimiento de la técnica serológica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) como método de diagnóstico de la babesiosis bovina en el laboratorio de diagnóstico de la Policlínica Veterinaria de L.U.Z. Rev. Cient. 1995;5(2):87-94.
 16. Weiss D, Wardrop K. Normal Hematology of Cattle. En: Schalm's Veterinary Hematology. 6.ª edición. Iowa: Blackwell Publishing; 2010. p. 5014-8300.
 17. Zapata R, Lara N, Baena A, Reyes J, Ríos L. Seroprevalencia de babesiosis bovina en la hacienda Vegas de la Clara, Gómez Plata (Antioquia). Rev Med Vet. 2008;(21):63-71.
 18. James M, Coronado A, López W, Meléndez R, Ristic M. Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. Trop Anim Health Prod. 1985;17(1):9-18. doi: 10.1007/bf02356127.
 19. James M. Antibody levels during bovine hemoparasitic diseases: trypanosomiasis, anaplasmosis and babesiosis. Acta Cient Venez. 1983;34(3-4):185-90.
 20. Richey E, Palmer G. Bovine anaplasmosis. The Compendium Food Animal. 1990;(12):1661-9.
 21. De la Fuente J, García-García J, Blouin E, Saliki J, Kocan K. Infection of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of the intracellular *Ehrlichia*, *Anaplasma marginale* excludes infection with other genotypes. Clin Diag Lab Immunol. 2002;9(3):658-68. doi: 10.1128/cdli.9.3.658-668.2002.
 22. Guillén A, León E, Aragort W, Silva M. Diagnóstico de hemoparásitos en el Instituto de Investigaciones Veterinarias período 1986-2000. Vet Trop. 2001;26(1):47-62.
 23. Díaz D, Valera Z, De Andrade E, Parra O, Escalona F, Ramírez R. Prevalencia de *Anaplasma marginale* del sector La Piñata, Municipio Cañada de Urdaneta estado Zulia, Venezuela. Rev. Cient. 2003;13(3):193-98.
 24. Añez-Rojas N, Romero O, Valbuena H, Clisante G, Rojas A, Bolívar A, Añez A. Detección de transmisión transplacentaria de *Anaplasma marginale* en Bovinos Asintomáticos. Rev. Cient. 2010;20(4):377-82.
 25. Eleizalde M, Reyna-Bello A, Caballero H, Vivas J. Evaluación y mejoramiento del ensayo inmunoenzimático (Elisa) para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina. Rev. Cient. 2007;17(4):349-56.
 26. Cipolini M, Jacobo R, Draghi G, Echaide S. Detección de anticuerpos contra anaplasmosis bovina en rodeos de cría del noroeste de la Provincia de Corrientes, Argentina". Rev Vet. 2003;14(2): 75-77.
 27. Medeiros V, Barbosa M, Leite A, Marry J, Almeida A, Santos S, Medeiros A, Riet-Correa F, Bahia M. Seroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis, and trypanosomiasis in a Brazilian semiarid región. Rev Bras Parasitol Vet. 2013;22(2):207-13. doi: 10.1590/S1984-29612013005000022.
 28. Barbosa J, De Albuquerque C, Garcia M, Bagarrão A, Marcelo W, Henrique A, et al. Detecção sorológica e molecular de *Anaplasma marginale* em búfalos na Ilha de Marajó, Pará. Pesq Vet Bras. 2014;34(1):11-4.
 29. Monroy M. Determinación de la seroprevalencia de *Anaplasma marginale*, a través del ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (Elisa) en la población Bovina de la provincia de Galápagos, Ecuador [tesis de pregrado]. Quito: Universidad San Francisco; 2015.
 30. Lira-Amaya J, Polanco-Martínez D, Castañeda-Arriola R, Ramos-Aragón J, Lara-Hernández E, Preciado-De la Torre J, et al. Prevalencia serológica y molecular de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* en búfalos de agua mantenidos en zonas de alta incidencia de garrapatas. Fol Entomol Mex. 2017;(4):627-32.
 31. Álvarez J, Cantó J. Epidemiología de la babesiosis. Soci Mex Parasitol. 1985;(1):55-72.
 32. Alonso M, Blandino T. Anaplasmosis bovina. La Habana: Consejo Científico Veterinario de Cuba; 1988.
 33. Galade K, Gartside M, Dimmock C, Zakrzewski H, Leatch G. Peripheral blood lymphocyte proliferate responses in cattle infected with or vaccinate against anaplasmosis. Parasitol Res. 1996;(82):551-62.
 34. Kocan K, De La Fuente J, Blouin E, Coetzee J, Ewing S. The natural history of *Anaplasma marginale*. Vet Parasitol. 2010;167(2-4):95-107. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.09.012