

Capítulo XL

Anaplasmosis bovina: logros y retos inmediatos

Armando Reyna-Bello

Los hemotrópicos de los bovinos de interés veterinario en Latinoamérica son la anaplasmosis ocasionada por el *Anaplasma marginale*, la tripanosomosis por el *Trypanosoma vivax* y la babesiosis por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. Estos hemotrópicos tienen varias cosas en común; desde el punto de vista biológico, todos presentan tropismo por la sangre del bovino y desde el punto de vista clínico, los tres originan enfermedades caracterizadas por fiebre recurrente y descenso de los valores del hematocrito. Esta fiebre recurrente aunada a la aparición de la anemia en los animales afectados, trae como consecuencias grandes pérdidas a los productores pecuarios por la inminente baja en la producción, sean estos animales de leche, carne o doble propósito.

El impacto económico de estas enfermedades en Venezuela nunca se ha determinado en forma correcta. Sin embargo, según los datos de la Asociación Venezolana de la Industria de Salud Animal (AVISA) se estima que el año 2013, se gastaron más de 60 millones de bolívares fuertes en medicamentos para el control de los hemotrópicos.

Curiosamente, este grupo de enfermedades son sobrestimadas en el campo y a la vez subestimadas. Un veterinario clínico al ver un animal en decúbito, siempre lo relaciona con algún hemotrópico y es tratado como tal, sin realizar ningún diagnóstico real (sobrestimación). Por otra parte, son enfermedades de alta prevalencia y al estar el animal de pie y produciendo, asumimos que son “sanos”, y de igual manera sin ningún tipo de diagnóstico, se subestima la presencia de los hemotrópicos, que aun en su condición crónica o persistente es capaz de disminuir la producción. En este trabajo, se abordan algunos temas recientes sobre el *A. marginale*, desarrollados muchos de ellos en el laboratorio en el cual laboramos y, otros no tan nuevos, pero que por su origen, siempre dejan espacio para la controversia.

ANAPLASMOSIS BOVINA

Esta enfermedad es ocasionada por la bacteria *Anaplasma marginale* descubierta por Theiler en 1910, perteneciente al Orden de las *Rickettsias*, clase *Proteobacteria*, subclase alfa, familia *Anaplasmaticae*, género *Anaplasma*, especie *A. marginale* (Dumler et al., 2001). Inicialmente, Theiler lo clasificó como un protozoario, de ahí el nombre de

Anaplasma al estar desprovisto de citoplasma y *marginale* por su ubicación en el eritrocito. En 1972, trabajos realizados por Kreier & Ristic con la coloración de Gram, señalaron que era un bacteria y no un protozario, lo cual fue aceptado en el documento clásico de las bacterias, el manual Bergey de 1984 (Ristic & Kreier, 1984). En este sentido, Dumler *et al.* (2001), realizando estudios de filogenia con las secuencias ribosomales del 16s y de la proteína HSP70 se reclasificaron estas bacterias y toda la familia Anaplasmataceae, quedando definitivamente en el Orden de las *Rickettsias*.

Debido a esta clasificación de hace ya más de 20 años, es incorrecto denominar estas enfermedades como hematozoario o hemoparásitos debido a que ambos términos asumen que los tres son parásitos y como bien se definió anteriormente, *A. marginale* es una bacteria, a diferencia de las Babesias y los trypanosomas que si continúan en el *Phylum Protozoa*.

Esta enfermedad se encuentra distribuida por todos los países de clima tropical y sub tropical. En cuanto a Venezuela, la prevalencia estima que el promedio nacional está cercano al 50% de animales infectados (Toro-Benites, 1994). Sin embargo, trabajos posteriores empleando la prueba de ELISA/MSP5r han reportado seroprevalencias hasta de un 90% al suroriente del edo. Guárico (Eleizalde *et al.*, 2007). Ese mismo año, en un trabajo un poco más amplio utilizando la misma prueba, se determinó una prevalencia de 32,3% en cuatro muestreos realizados en tres estados, con rangos que van desde el 11 hasta el 46%. Estos resultados permiten inferir que la anaplasmosis es endémica en todo el territorio nacional, afectando todo tipo de ganadería, cosa que ya en 1940 fue descrito por Gallo & Vogelsang (citado por Rivera, 1996).

La transmisión de la anaplasmosis bovina es uno de los puntos que lleva a ciertas controversias. Está ampliamente difundida la idea, que la transmisión ocurre de un animal enfermo a uno sano a través de vectores mecánicos y que tradicionalmente han sido las garrapatas consideradas como su principal transmisor, cumpliendo un rol secundario algunas moscas hematófagas como los tábanos y la mosca del establo o *Stomoxys calcitrans*. Sin embargo, esto no es cierto en Latinoamérica debido a que la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* que es la más prevalente en Venezuela (87%), juega un papel muy poco preponderante en la epidemiología de esta enfermedad, siendo más importantes quizás el de las moscas hematófagas (Coronado, 2001).

Esto responde a varias razones; en primer lugar, *R. microplus* es una garrapata de un solo huésped, entonces, ¿cómo puede transmitir la enfermedad de un animal a otro, sino se muda de animal? Además, estudios señalan que *A. marginale* solo dura 72 horas dentro de la garrapata. Pero lo más importante es que en diversos lugares de Latinoamérica, como en zonas de Argentina, Paraguay y Martinica, de donde se han erradicado las garrapatas, aún se pueden encontrar alta prevalencia de *A. marginale* (Payne & Osorio, 1990; Alonso *et al.*, 1992; Guglielmone *et al.*, 1997). Este caso es muy diferente al encontrado con la garrapata *Dermacentor* sp., la cual se encuentra en el hemisferio norte; esta garrapata es de tres huéspedes y puede transmitir la anaplasmosis de manera intraestadial, y de hecho, *A. marginale*, puede durar hasta 6 meses viva dentro de ella (Kocan *et al.*, 1986; 2010).

Por otra parte, la transmisión iatrogénica a través de jeringas contaminadas, en condiciones de explotación en Venezuela, donde muy pocos ganaderos o veterinarios cambian las agujas para cada animal, quizás también juega un papel capital en la tras-

misión de la enfermedad, pero esto aún no se ha determinado. No obstante, Reinbold *et al.* (2010) demostraron la factibilidad de la trasmisión de la anaplasmosis a partir de jeringas. Estos autores inyectaron un bovino con un 2% de rickettsemia como donador y utilizaron la misma aguja para inocular solución salina amortiguada por fosfatos (PBS), logrando infectar 6 de 10 animales, al no cambiar la aguja.

Una vez que la *A. marginale* entra al torrente circulatorio del bovino, invade los eritrocitos e inicia la multiplicación hasta establecer un cuerpo inicial que puede contener de 4 a 16 subunidades. Luego salen del eritrocito sin romperlo para infectar otros glóbulos rojos. Este proceso ha sido plenamente dilucidado por Giardina *et al.* (1983) en Venezuela. La actividad del del *A. marginale* dentro del eritrocito, origina una cantidad de cambios en la membrana del glóbulo rojo, que son en buena parte, responsables de la respuesta autoinmune del animal con anaplasmosis (Lesseur *et al.*, 1992). De igual manera, una vez que se instaura la infección, esta desata una respuesta inmunológica dirigida principalmente a las 6 proteínas que se encuentran en la superficie de la bacteria y conocidas como MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5. Esta respuesta ha sido caracterizada parcialmente y las proteínas de la superficie han sido identificadas plenamente (Palmer & McGuire, 1984; Tebele *et al.*, 1991; Bryton *et al.*, 2006).

En esta era de los genomas, *A. marginale* ha sido completamente secuenciado y la estructura de su membrana externa casi totalmente dilucidada. En efecto, se describieron 163 proteínas con péptidos señal (posiblemente de membrana). De estas, 13 fueron identificadas como proteínas de la membrana externa y dos superfamilias génicas. La MSP2 con 56 miembros (incluyendo *msp2*, *msp3* y *msp4*) distribuidos a lo largo del genoma más 16 pseudogenes. La MSP1, es realmente un dímero constituido por la MSP1a que es la segunda superfamilia con 9 miembros, la cual contiene a su vez el gen *msp1b* que su transcrito dimeriza en la membrana con la MSP1a. Por otra parte, la MSP5, también fue identificada, demostrando su origen en un gen único y conservado en todos los aislados estudiados (Bryton *et al.*, 2005; Eleizalde & Reyna-Bello 2014).

Una vez que la bacteria inicia la colonización de los glóbulos rojos, la rickettsemia asciende rápidamente, pudiendo incluso encontrarse valores superiores al 60% de glóbulos rojos parasitados. Esto ocurre en un tiempo aproximado de 20 a 30 días, luego la respuesta inmunológica logra controlar la rickettsemia y esta baja a niveles críticos. Curiosamente, la bacteria nunca desaparece completamente, porque el sistema inmunológico jamás logra eliminar al hemotrópico. Una vez ocurrida la infección, se estima que más o menos entre un 10 a 30% de los animales mueren y los otros se recuperan, constituyéndose en portadores persistentes (Radostis *et al.*, 2004).

Para la eliminación total del parásito, se estima que debe haber una respuesta humoral constituida principalmente por IgG2 que reconozca los epítopes cruciales de las proteínas MSP, con una combinación de macrófagos activados que puedan fagocitar y matar la bacterias circulantes. Es por ello, esta respuesta debe ser linfocito T dependiente de tipo CD4+ (Kocan *et al.*, 2010).

Quizás una de las cosas más curiosa de este microorganismo, es que a pesar de vivir en el torrente circulatorio, fácilmente accesible a la respuesta inmune humoral, logra escaparse de éste, creando una infección persistente. Aún más curioso es ¿cómo hace esto con un genoma pequeño de 1200 Kbp? La respuesta está dada en un meca-

nismo genético denominado recombinación génica, el cual se traduce en la variabilidad antigénica, que permite al microorganismo escaparse al sistema inmune del hospedador (Eleizalde & Reyna-Bello, 2014).

Para comprender esto, se debe señalar que estudios previos han demostrado, al secuenciar la MSP2 en diferentes momentos en animales crónicamente infectados, que realmente es una proteína con una región central hipervariable flanqueada por unas secuencias más conservadas en los extremos N y C terminales (French *et al.*, 1998). Esta región central hipervariable suele ser la más antigénica, mostrando epítopes reconocidos por linfocitos T CD4+, en cambio las regiones N y C terminales inducen respuesta T CD4+, pero de memoria (Eleizalde & Reyna-Bello, 2014).

Anaplasma marginale posee una familia multigénica que codifica la MSP2, la cual está constituida por 56 miembros que incluyen también MSP4 y MSP3, además de 16 pseudogenes (Bryton *et al.*, 2005). Todos estos 56 miembros y 16 pseudogenes, pueden recombinarse en la región central de la MSP2 en el proceso de recombinación génica, lo que le permite a la bacteria expresar una MSP2 “diferente” cada vez que se replica. Es por ello, que este microorganismo teniendo un pequeño genoma, puede realizar combinaciones casi infinitas de regiones hipervariables de la MSP2, escapándose del sistema inmunológico del hospedador (Eleizalde & Reyna-Bello, 2014).

Esta proteína ha sido estudiada y caracterizada en aislados en Venezuela. Para ello, a partir de seis aislados diferentes se analizaron las secuencias de la MSP2, encontrando que en efecto se localizó la región hipervariable central. Curiosamente, en este trabajo se observó que en el extremo N, y en menos grado el C, no se encuentran conservados en los aislados. Este hecho, quizás pueda explicar porque no hay una vacuna que sea realmente eficiente en Venezuela. Otro aspecto curioso que se desprende de este trabajo, lo constituye el hecho que aun habiendo una región hipervariable central, es relativamente conservada la predicción de la estructura tridimensional de la MSP2, entre los aislados evaluados. De hecho, al comparar esta predicción con secuencias de proteínas homologas en otras especies de la misma familia, como *A. platys*, *A. phagocytophilum*, *A. central* y *A. ovis*, también se observan dichas homología (Eleizalde, 2013).

Esta variabilidad antigénica inducida por los cambios aminoacídicos de la MSP2, explica como en Venezuela existen seroprevalencias que van desde el 10 hasta 90% en animales clínicamente sanos. Sin embargo, cuando estos animales entran en estrés alimentario o por algunas enfermedades, el sistema inmune recae y se vuelven a presentar la sintomatología clínica de la anaplasmosis, donde sus principales manifestaciones son anemia y fiebre, con ictericia, deshidratación, decaimiento y pérdida de la producción.

Cuando un animal mayor de un año se infecta por primera vez, la manifestación clínica es inminente y mientras más edad tenga, más grave será la enfermedad (Radostis *et al.*, 2004). Este hecho es uno de los principales obstáculos para la importación de animales adultos al trópico, en cambio cuando se infecta siendo becerro, normalmente no manifiesta la enfermedad (Radostis *et al.*, 2004). Hasta el momento se desconoce porque ocurre esta susceptibilidad de los adultos, pero se especula que puede ser debido a los anticuerpos maternos. Ciertamente, en el año 2004 al atender un rebaño lechero con anaplasmosis, no importado, pero sí trasladado de una zona libre de hemo-

trópicos a un área en pastoreo enzoótica se observó que solo los adultos (machos y hembras) padecían la enfermedad.

Otro aspecto epidemiológico importante a considerar de esta enfermedad es que, al contrario de lo que siempre se piensa, no muestra diferencias entre *Bos taurus* y *Bos indicus*. Quizás la mayor susceptibilidad de las razas *Bos taurus* se deba más bien a la susceptibilidad a los vectores, dado que si se inocula con una jeringa el *A. marginale*, ambos padecen la enfermedad por igual (Bock *et al.*, 1997; 1999).

En cuanto a los pequeños rumiantes, en Venezuela parecen tener un efecto de reservorio al no presentar la enfermedad, al igual que los bovinos jóvenes. De hecho se han realizado infecciones experimentales en ovinos y caprinos y estos nunca mostraron disminución del hematocrito o fiebre; sin embargo, se infectaron y se observaron los cuerpos de inclusión luego de la infección. Por otra parte, en estudios serológicos realizados con ELISA/MSP5r, en los estados Falcón y Guárico se encontraron prevalencias similares a la de los bovinos, por lo que parece que los vectores no hacen distinción entre unos u otros hospedadores. Estos nos permite inferir que estos pequeños rumiantes son realmente reservorios de *A. marginale* (Tavares *et al.*, 2010).

En cuanto a la fauna silvestre, también se han realizado muestreos de cinco venados de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), encontrando dos positivos por frotis y uno por western blot para *A. marginale*, por lo que quizás también actúen como reservorios de la enfermedad (Silva-Iturriza *et al.*, 2012). En búfalos no se ha realizado este tipo de trabajos, pero es de suponer que al igual que los venados, ovinos y caprinos, solo son portadores de *A. marginale* pero no la padecen. La Dra. Gabriela Pérez (comunicación personal), confirma que ha hecho el hallazgo clínico de anaplasmosis en búfalos, lo cual parece ser más un hecho fortuito que una constante, pues si bien es cierto que el búfalo es refractario a la enfermedad, es posible que animales inmunosuprimidos puedan desarrollar cuadros clínicos de anaplasmosis.

Para realizar el diagnóstico clínico de la anaplasmosis es importante saber diferenciar al portador con otra enfermedad. Se define como caso clínico, cuando el animal presenta una rickettsemia superior al 10% con fiebre y hematocrito por debajo de 20%. La anaplasmosis es en sí una enfermedad anemizante y por ello no se relaciona con casos de animales con índices eritrocitarios superiores de 20%. Se considera que en Venezuela es posible encontrar hasta seroprevalencias del 90%, pero es importante también distinguir cuando el animal está enfermo por *A. marginale* o cuando tiene también *A. marginale*. En otras palabras, muchos son los casos en los cuales se encuentran animales enfermos, en decúbito o deprimidos, pero en el frotis se observan escasos cuerpos de inclusión, por lo cual es tratado como Anaplasma. En otras palabras, para que una anaplasmosis aguda sea diagnosticada es indispensable evaluar mucosas, temperatura y realizar un hematocrito. A nivel de campo, donde a veces es difícil realizar un hematocrito, es de gran ayuda, tener el ojo entrenado para evaluar las mucosas; sin embargo, será difícil distinguir este caso de uno de tripanosomosis o de babesiosis, los cuales cursan igualmente con fiebre y anemia.

Es también importante comprender que en la actualidad, el veterinario clínico no posee ninguna herramienta realmente práctica para confirmar la anaplasmosis, debido a que frente al caso agudo, el ELISA y el PCR carecen completamente de valor. Para la evaluación de los casos persistentemente infectados, en Venezuela se han desa-

rollado diferentes pruebas de diagnóstico, todas de gran utilidad para el estudio de esta enfermedad o para conocer factores epidemiológicos, que permitan establecer medidas de control y su respectivo seguimiento.

Uno de los problemas para desarrollar una prueba de diagnóstico serológico para la anaplasmosis bovina es que esta bacteria no se cultiva ni se desarrolla en animales de laboratorio. Por esa razón, se ha empleado una proteína recombinante como antígeno, en vez de la bacteria completa. Los primeros trabajos para desarrollar esta prueba, fueron hechos utilizando una técnica denominada inmunoprecipitación, la cual permitió establecer el perfil antigénico de *A. marginale* de aislados venezolanos. En estos trabajos se encontró que la MSP5 era una muy buena candidata para esto, debido a su inmunodominancia en las pruebas serológicas, siendo además, reconocida por todos los sueros utilizados (Leal *et al.*, 2000).

Una vez identificada la MSP5 de *A. marginale* como un importante antígeno, se procedió a clonarla y luego a expresarla. Para ello se diseñó un PCR y se amplificó el gen *mSP5*, el cual fue clonado en el vector PCR II (Invitrogen), el cual luego se usó para transformar *E. coli* competentes. Esto permitió la expresión y posterior purificación de la proteína recombinante de manera de obtenerla con alta pureza, para su empleo como antígeno en los ELISAs (Reyna-Bello *et al.*, 1998). Posteriormente, este mismo ELISA, denominado ELISA/MSP5r, por ser esta proteína recombinante la que se usa como antígeno, fue mejorado y utilizado para obtener diferentes seroprevalencias en bovinos, ovinos y caprinos (Reyna-Bello *et al.*, 1998; Eleizalde *et al.*, 2007). De igual manera, se ha desarrollado la prueba de PCR para el diagnóstico de esta enfermedad, tanto para detectar la presencia de *A. marginale* en bovinos, como en ovinos (Tavares-Marquez & Reyna-Bello 2006).

Ambas técnicas, tanto el ELISA como el PCR han sido empleadas en diferentes ensayos de campo, mostrando su versatilidad y precisión para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina. En la actualidad, están a la disposición para realizar investigaciones, así como para productores, veterinarios y técnicos del agro, en el laboratorio de Inmunobiología de la Universidad Simón Rodríguez.

Como se describió anteriormente, estas pruebas no son las mejores para el diagnóstico de la enfermedad; sin embargo, son muy útiles para determinar los perfiles seroepidemiológicos de una población, para realizar traslados de animales o para importar animales libres. Por ejemplo, cuando se desee establecer el control de la anaplasmosis en un rebaño, es recomendable realizar su tratamiento puntual y mediciones para verificar la disminución de los anticuerpos por ELISA. En cambio, si lo que se desea es evaluar la utilidad de una droga o cuando se importan o exportan animales, la prueba recomendada es el PCR.

CONCLUSIONES: DESAFÍOS INMEDIATOS Y FUTUROS

Se ha expuesto brevemente y con claridad los logros obtenidos en el tema de la anaplasmosis; sin embargo, aún existe una serie de desafíos por nuevos conocimientos. Es importante evaluar en Venezuela como ocurre en realidad, la transmisión de la anaplasmosis bovina, con el fin de establecer las prioridades epidemiológicas y poder establecer programas de control más certeros para minimizar su presencia.

Resulta importante realizar una prueba de factores de riesgo de la anaplasmosis bovina para determinar su transmisión por agujas contaminadas.

El diagnóstico de la anaplasmosis aguda debe realizarse clínicamente y con la ayuda de una centrifuga de hematocrito y de un microscopio.

Es imperativo en Venezuela aplicar técnicas biotecnológicas de diagnóstico como la prueba de LAMP o flujo lateral que permitan diferenciar los casos clínicos y poder asistir de esta forma al médico veterinario de campo.

Es importante establecer medidas de control de la enfermedad con el empleo de herramientas de avanzada como ELISA o PCR, para realizar seguimientos oportunos con el fin de disminuir la elevada prevalencia de la enfermedad y evitar el exceso de drogas que desmejoran la calidad de la carne y leche e incrementa los costos de producción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bock RE, De Vos AJ, Kingston TG, McLellan DJ. 1997. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. Aust Vet J 75 (5): 337-340.

Bock RE, De Vos AJ, Kingston TG. 1999. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Anaplasma marginale* transmitted by *Boophilus microplus*. Aust Vet J 77(11):748-751.

Brayton KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, McGuire TC, Knowles DP Jr. 2005. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of Outer Membrane Proteins. Proc Natl Acad Sci USA 102 (3): 844-849

Brayton KA, Palmer GH, Brown WC. 2006. Genomic and Proteomic Approaches to vaccine Candidate Identification for *Anaplasma marginale*. Expert Rev Vaccines 5(1): 95-101.

Coronado A. 2001. Is a *Boophilus microplus* the main vector of *Anaplasma marginale*? Technical note. Rev. Científica FCV-LUZ 9 (5): 408-411.

Dumler JS, Barbet A, Bekker F, Dasch P, G Palmer, Ray H, Rikihisa S, Rurangirwa F. (2001). Reorganization of the genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. Intern J System Evolutionary Microb 51: 2145-2165.

Eleizalde MC. 2013. Análisis molecular de los extremos N y C terminales de la MSP2 de *A. marginale* y la evaluación de su potencial antigénico. Tesis de doctorado, Universidad Simón Bolívar, Coordinación de Ciencias Biológicas, Dpo de Biología Celular. 286 pp.

Eleizalde MC, Reyna-Bello A, Caballero H, Vivas J. 2007. Evaluación y Mejoramiento del Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para el Diagnóstico de la Anaplasmosis Bovina. Rev. Científica FCV-LUZ 17 (4): 349-356.

Giardina, SA. Bretaña A, Márquez QN. 1983. Ultrastructural aspects of intraerythrocytic development of a Venezuelan strain of *Anaplasma marginale*. Tropenmed. Parasit 34: 7-10.

- Kocan KM, Holbert D, Edwards W, Ewing S A, Barron SJ, Hair JA. 1986. Longevity of colonies of *Anaplasma marginale* in midgut epithelial cells of *Dermacentor andersoni*. Am J Vet Res 47 (8): 1657-1661.
- Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. Vet Parasitol 10; 167 (2-4): 95-107.
- Kreier JP, Ristic M. 1972. Definition and taxonomy of *Anaplasma* species with emphasis on morphologic and immunologic features. Z. Tropenmed Parasitol 23 (1): 88-98.
- Leal M, Noda A, Reyna-Bello A, Casas B, Précigout E, Aso PM, Gorenflot A, Gonzatti MI. 2000. Identification and characterization of corpuscular, soluble and secreted antigens of a Venezuela isolated of *Anaplasma marginale*. Veterinary Parasitology 94: 1-15.
- Lesseur MC, Bretaña A, Aso PM, Contreras-Bretaña M, Giardina G. 1992. Immunolabeling and ultrastructural localitation of an *Anaplasma marginale* soluble antigen. Acta Microscopica. 1 (1): 87-102.
- Palmer GH, McGuire TC. 1998. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. J Immunol 133 (2): 1010-1015.
- Reinbold JB, Coetzee JF, Hollis LC, Nickell JS, Riegel CM, Christopher JA, Ganta RR. 2010. Comparison of iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in Holstein steers via needle and needle-free injection techniques. Am J Vet Res 71 (10):1178-1188.
- Reyna-Bello, A. 2007. Estado actual de la tripanosomosis y anaplasmosis a partir de un muestreo realizado en 4 estados de Venezuela. XVIII Cong Feder Latinoam Parasitología. Margarita, Edo. Nueva Esparta. 21 al 25 de Octubre. (Resumen)
- Reyna-Bello A, Cloeckeaert A, Vizcaíno N, Gonzatti MI, Aso PM, Dubrey G 1998. Evaluation of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5 for Serological Diagnosis of Bovine Anaplasmosis in Venezuela. Clin Diagn Lab Immunol. 5 (2): 259-262.
- Ristic M, Kreier JP. 1984. Family III. Anaplasmataceae. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. NR Krieg, JG. Holt (ed). The Williams & Wilkins Co., Baltimore, U.S.A. 1: 719-729.
- Rivera M. 1996. Hemoparasitosis Bovinas. Ed Anauro ediciones, C.A. Universidad Central de Venezuela Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.
- Silva-Iturriza A, Panier E, Reyna-Bello A, Perrone T, Aso PM. 2012. Evaluación parasitológica y serológica de infecciones hemotrópicas en venados de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en Venezuela. Revista Científica, FCV-LUZ XXII (6): 37-41.
- Tavares-Marquez LM, Reyna-Bello A. 2006. Estandarización de la técnica de PCR para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina y ovina. Agron Trop 56 (4): 501-512.
- Tavares-Marquez LM, Nuñez C, Rey-Valerión C. Reyna-Bello A. 2010. Serological evidence of *Anaplasma* spp in small ruminants from Venezuela using recombinant MSP5 in immunoenzymatic assay. Revista Científica FCV-LUZ. XX (5): 506-511.
- Tebele N, McGuire TC, Palmer GH. 1991. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. Infect Immun 59 (9): 3199-3204.
- Theiler A. 1910. *Anaplasma marginale* (Genus nov. et species nov). Un nouveau protozoaire du bétail. Bull Soc Phatol Exot 3: 135-137.
- Toro-Benites, M. 1994. Anaplasmosis: aspectos epizootológicos y métodos de control. FONAIAP-CENIAP, Maracay. Instituto de Investigaciones Veterinarias. 50 pp.