

ARTÍCULO RESEÑA

## Tendencias en el diagnóstico de la anaplasmosis bovina

Belkis Corona González<sup>I</sup>, Dasiel Obregón<sup>II</sup>, Yousmel Alemán<sup>I</sup>, Pastor Alfonso<sup>I</sup>, Ernesto Vega<sup>I</sup>,  
Adrian Díaz<sup>I</sup>, Siomara Martínez<sup>I</sup>

<sup>I</sup>Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.  
Correo electrónico: [bcorona@censa.edu.cu](mailto:bcorona@censa.edu.cu). <sup>II</sup>Universidad Agraria de La Habana, Mayabeque, Cuba.

**RESUMEN:** *Anaplasma marginale* es una Rickettsia que parasita los eritrocitos maduros del ganado bovino, provocando grandes pérdidas económicas en las regiones tropicales y subtropicales. La enfermedad se caracteriza por marcada anemia hemolítica, disminución del peso, aborto y en ocasiones la muerte. Los animales que logran recuperarse de la fase aguda de la enfermedad permanecen persistentemente infectados y se convierten en reservorio para la transmisión de la misma a los animales sanos, por lo que se hace necesario poder contar con técnicas de diagnóstico más sensibles para ser utilizadas en el movimiento internacional de ganado hacia zonas libres de la enfermedad, que permitan la detección de animales portadores, así como para conocer la prevalencia de la enfermedad en las regiones tropicales y subtropicales. Para el diagnóstico de la anaplasmosis se utilizan diferentes técnicas, dentro de las que se incluyen para la detección del agente, la tinción con Giemsa a los frotis sanguíneos; la inoculación de animales esplenectomizados, que constituye el estándar de oro del diagnóstico de la enfermedad y los métodos de diagnóstico molecular, los cuales se utilizan en la actualidad para el movimiento internacional de ganado, debido a su sensibilidad y especificidad. Para la detección de anticuerpos, la fijación del complemento fue muy utilizada hasta hace unas décadas. La aglutinación en tarjeta, la inmunofluorescencia indirecta y las pruebas ELISA son las más utilizadas para la detección de anticuerpos, pero muchas de estas técnicas utilizan antígenos crudos, contaminados con membranas del eritrocito, lo que da como resultado un número elevado de falsos negativos cuando se analizan animales persistentemente infectados. Los avances recientes y el desarrollo de nuevas metodologías de diagnóstico pueden proporcionar grandes ventajas en la mejora en el diagnóstico de esta entidad. En el presente trabajo se expone las tendencias que existen en el diagnóstico de *Anaplasma marginale*.

**Palabras clave:** *Anaplasma marginale*, diagnóstico, ELISA, PCR.

---

### Tendencies in diagnostic of bovine anaplasmosis

**ABSTRACT:** *Anaplasma marginale* is a Rickettsia infecting mature erythrocytes of cattle, causing great economic losses in tropical and subtropical regions. The disease is characterized by a marked hemolytic anemia, weight loss, abortion and sometimes death. Animals, which recover from the acute phase of the disease, stay persistently infected and become reservoir for transmission to healthy animals. There is a need of more sensitive diagnostic techniques to be used in the international movement of livestock towards disease free areas, which allow the detection of carrier animals, as well as to determine the prevalence of the disease in tropical and subtropical regions. For anaplasmosis diagnostic, different techniques are used, among them, agent detection, Giemsa staining to blood smears, inoculation of splenectomized animals, which is the gold standard for diagnosing the disease and the molecular diagnostic methods, which are currently used for the international movement of livestock, because of their sensitivity and specificity. For the detection of antibodies, a complement fixation has been extensively used since a few decades. Card agglutination, indirect immunofluorescence and ELISA tests are the most commonly used for the detection of antibodies, but many of these techniques use crude antigens, contaminated with erythrocyte membranes, which results in a high number of false negatives when persistently infected animals are analyzed. Recent advances and development of new diagnostic methodologies can provide great benefits in improving the diagnostic of this entity. This study discusses the trends existing in the diagnostic of *Anaplasma marginale*.

**Key words:** *Anaplasma marginale*, diagnostic, ELISA, PCR.

---

**Taxonomía y Filogenia:** *Anaplasma marginale* se consideró como un protozoo hemático durante mucho tiempo (1). Las investigaciones ulteriores demostraron que se clasifica dentro del Orden Rickettsiales, Familia Anaplasmataceae, Género *Anaplasma*. Los organismos pertenecientes a este orden fueron reclasificados en base a los genes del 16S del RNAr, los genes groESL y los que codifican para las proteínas de superficie (2) y fueron asignados a dos Familias: Anaplasmataceae y Rickettsiae. Dentro de la familia Anaplasmataceae se incluyeron los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Wolbachia*, *Neorickettsia* y dentro del género *Anaplasma*, se incluyen tres especies que afectan los rumiantes: *A. marginale*, *A. marginale* ss. *centrale* (referida como *A. centrale*) y *A. ovis*. Con esta reclasificación también quedaron incluidas en este género las especies *A. phagocytophilum* (incluye a *Ehrlichia equi*, *E. phagocytophila* y el agente causal de la ehrlichiosis granulocítica humana), *Anaplasma bovis* (*E. bovis*) y *Anaplasma platys* (*E. platys*) (2).

**Diagnóstico de la enfermedad:** El control de la anaplasmosis, necesita de métodos de diagnóstico que permitan conocer la prevalencia del microorganismo en las diferentes zonas de los países tropicales y subtropicales, además que permitan identificar de forma segura los animales portadores para el movimiento de animales a zonas libres del hemoparásito (3).

El diagnóstico diferencial de fiebre, anemia hemolítica aguda e icterus en el ganado adulto incluye babesiosis, eperytozoonosis, theileriosis, leptospirosis, hemoglobinuria bacilar, hemoglobinuria postparto, toxicidad por plantas y ántrax. La ausencia de hemoglobinuria en caso de anemia aguda, apoyada por la identificación del eritrocito parasitado, diferencia estas otras enfermedades hemolíticas de la anaplasmosis clínica (4).

El diagnóstico de la anaplasmosis se dificulta debido fundamentalmente a lo difícil de detectar los animales portadores, ya que no hay síntomas clínicos que lo diferencien de los bovinos no infectados, y los cuerpos de inclusión dentro de los glóbulos rojos no son lo suficientemente numerosos como para ser detectados por los métodos tradicionales (5).

#### Métodos directos:

**Estándar de oro:** Para la detección de animales persistentemente infectados el método que se considera el estándar de oro, consiste en la subinoculación de eritrocitos infectados con *A. marginale*, en animales susceptibles esplenectomizados. Sin embargo, este procedimiento no es práctico en las pruebas de rutina por la manipulación quirúrgica que conlleva y porque

proporciona poca información sobre los niveles de parasitemia (6).

**Visualización al microscopio de frotis de sangre teñidos con Giemsa:** Entre otras técnicas utilizadas para detectar el organismo se incluye la visualización al microscopio de los frotis de sangre teñidos con Giemsa (7). Esta es la técnica diagnóstica de referencia y el método más común para la identificación de *A. marginale* en animales con infección clínica (8). Sin embargo, cuando el animal está en la fase crónica o en el estadio de portador no expresa un elevado nivel de parasitemia como para ser detectado por la tinción (9).

Este es un método confiable, barato y capaz de detectar niveles de parasitemia de 0.1 a 0.2%, o sea, sólo puede detectar niveles mayores a  $10^6$  eritrocitos infectados por mililitro de sangre (10), además, resulta tedioso, no apropiado para un gran número de muestras e incapaz de discernir con facilidad cuando el eritrocito está invadido por *A. marginale* o por *A. centrale* (6).

**Hibridación de ácidos nucleicos:** La hibridación de ácidos nucleicos, constituye una prueba sensible y específica para el diagnóstico. En el diagnóstico de *A. marginale* se han utilizado sondas de ADN genómico (11) y recombinantes, basadas en ADN (12) o ARN (13), pero en ocasiones la limitada sensibilidad diagnóstica de la sonda no permite la detección de portadores sanos con muy bajo nivel de parasitemia (14).

Con una sonda de ARNm derivada del gen *msp1a*, se logró mejorar la sensibilidad, detectándose niveles de parasitemia entre 0.0025 y 0.000025 % en los portadores sanos. Esto hace que la prueba sea 4000 veces más sensible que la microscopía óptica, además de que es capaz de detectar la infección en estadios tempranos, lo que resulta de gran importancia para evitar las pérdidas que ocasiona esta enfermedad (13).

La sensibilidad de este ensayo resultó útil para la detección de niveles de infección en garrapatas y para la identificación de ganado persistentemente infectado, además de determinar la prevalencia e incidencia de garrapatas infectadas en áreas enzoóticas (12).

Kocan *et al.* (15), desarrollaron una sonda de ADN no radioactiva para detectar *A. marginale* en ganado bovino y garrapatas, mostrando igual sensibilidad y especificidad que las sondas radioactivas, además de poder ser utilizada en la hibridación «*in situ*».

**Reacción en cadena de la polimerasa:** La sensibilidad y especificidad del PCR resultan de gran valor para la identificación de patógenos. Figueroa *et al.* (16), desarrollaron un PCR múltiple para la detección de *B.*

*bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* a partir de sangre de bovinos. Corona y Martínez (17), realizaron la detección de *Anaplasma marginale* en bovinos sin síntomas clínicos de la enfermedad utilizando la amplificación por PCR del gen *msp5* de este hemoparásito.

Torioni *et al.* (18), optimizaron un PCR anidado (PCRn) acoplado con análisis de secuencia e hibridación para identificar el gen *msp5* de *A. marginale*, capaz de detectar hasta 30 eritrocitos infectados por mililitro de sangre, lo cual lo hace de 10-100 veces más sensible que los ensayos de PCR previamente descritos, sondas de ARN y ensayos de hibridación. El PCRn unido con la hibridación resulta un método altamente sensible y específico para detectar animales infectados con *A. marginale* (18).

La utilización del nPCR para la detección de *Anaplasma marginale* en búfalos de Cuba, resultó altamente sensible y específico para el diagnóstico de la anaplasmosis en animales portadores (19).

Georges *et al.* (20) desarrollaron un método de hibridación reversa y PCR (de su siga en inglés RLB) de las regiones 16S ó 18S del ARNr para la detección de hemoparásitos en bovinos, demostrando una gran prevalencia de infecciones mezcladas, lo que indica que animales infectados con *Babesia* spp., estaban también infectados con *Theileria* spp. ó *Anaplasma* spp.

La insuficiente sensibilidad y especificidad de los ensayos de diagnóstico de *Anaplasma* spp., el potencial de reacción cruzada entre especies de este género y la necesidad de determinar el estado de infección de los animales ha llevado al desarrollo de ensayos de real time-PCR para el diagnóstico de *Anaplasma marginale*.

El uso de un ensayo de PCR en tiempo real, basado en sondas *TaqMan*, para el diagnóstico de la infección por *A. marginale* resultó altamente específico ya que no mostró reacciones cruzadas con otras especies de *Anaplasma* presentes en rumiantes, incluyendo la especie *Anaplasma centrale*, estrechamente relacionada u otros hemoparásitos de rumiantes (*Anaplasma bovis*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Theileria annulata* y *Theileria buffeli*) (21). El establecimiento de este PCR en tiempo real puede superar las limitaciones de los métodos de diagnóstico existentes, permitiendo la detección y cuantificación simultánea del ADN de *A. marginale* presente en sangre bovina, lo que resulta esencial para apoyar el diagnóstico clínico y evaluar el estado de portador de los animales, la eficacia de las vacunas y los medicamentos antirickettsiales.

Por su parte, Decaro *et al.* (22) desarrollaron un duplex real-time PCR para la detección y cuantificación simultánea de *A. marginale* y *A. centrale*, recomendando este ensayo como una poderosa herramienta para la detección y diferenciación de ambas especies, lo que mejorará el diagnóstico de estas rickettsias hemoparasitas. Este ensayo cuantitativo podría ser muy útil para estudiar la patogénesis de la infección por *A. marginale* en el ganado bovino. El ensayo fue capaz de detectar de  $10^1$  a  $10^2$  copias de *A. marginale* y *A. centrale*, respectivamente, con óptima especificidad y reproducibilidad. Este ensayo demostró que puede detectar y cuantificar dos especies de *Anaplasma*, aún si están presentes en la misma muestra, por lo que puede ser usado en estudios de patogénesis en la anaplasmosis bovina aguda.

Recientemente Reinbold *et al.* (23) desarrollaron un ensayo qRT-PCR real time que detecta 100 copias del 16S rRNA de *A. marginale* y *A. phagocytophilum*. La habilidad de este ensayo de determinar el estado de infección del ganado es esencial para el desarrollo de programas de control de la anaplasmosis, para la correcta clasificación del estado de infección del ganado antes de exportarlo y para testificar el estado de ganado libre para el movimiento de ganado de regiones donde la enfermedad es endémica, a regiones donde no lo es.

#### Métodos indirectos:

**Ensayos serológicos:** Las pruebas serológicas son de gran importancia para estudios epidemiológicos con el objetivo de caracterizar áreas de estabilidad e inestabilidad enzoótica. La aplicación de estas pruebas resulta relevante en lugares donde se practique el control intensivo de garrapatas, en los centros de inseminación y transferencia de embriones, así como en los lugares donde se produzcan animales de elite o reproductores puros, relacionados también con la industria lechera (24).

El diagnóstico serológico incluye pruebas como fijación del complemento, aglutinación en tubos capilares, aglutinación rápida en tarjeta, ensayos de IFI, y las pruebas Dot-ELISA y ELISA. Las pruebas serológicas como fijación del complemento y aglutinación en tarjeta, fueron los métodos más comúnmente utilizados para detectar animales infectados con *A. marginale* en el campo y son aceptados para el movimiento de animales a nivel internacional (8).

Algunos de estos ensayos para la detección de anticuerpos utilizan antígenos crudos obtenidos de *A. marginale* parcialmente purificado, lo que provoca que se pierda la sensibilidad y especificidad que se requiere para un diagnóstico eficaz (25).

**Fijación del complemento:** Esta prueba utiliza el proceso estándar de fijación del complemento. El antígeno consiste en cuerpos de *Anaplasma* que se han separado del eritrocito por lisis (26). Este ha sido uno de los métodos más utilizados para detectar animales infectados con *A. marginale*, en el campo. Sin embargo, existen evidencias de que su sensibilidad es baja y tiene errores por su limitada habilidad para detectar bajos niveles de anticuerpos. Puede ser utilizada como una prueba de monitoreo, pero no para los programas de erradicación, ya que muchos animales infectados pueden ser diagnosticados como negativos, pues no es capaz de detectar anticuerpos contra *A. marginale* en animales portadores (27). Existen otras desventajas entre las que se encuentran la complejidad y laboriosidad que requiere y la baja especificidad y sensibilidad diagnóstica, sobre todo en países donde hay presente enfermedades hemoprotozoarias (28).

**Pruebas de aglutinación:** Se han descrito dos pruebas de aglutinación: la aglutinación en tubos capilares y la aglutinación rápida en placa (29). Esta técnica puede ser desarrollada en el laboratorio o en el campo, dando el resultado en muy pocos minutos, pero existe un gran problema con las reacciones no específicas. Sin embargo, algunos autores recomiendan la prueba de aglutinación en tarjeta, como un ensayo que todavía tiene utilidad en algunas situaciones debido a su bajo costo, sencillez técnica, y la rapidez de los resultados (30).

**Inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (IFI):** Esta prueba se ha utilizado para el diagnóstico de anaplasmosis y frecuentemente se ha considerado una prueba sensible; sin embargo, por sus características en ocasiones se considera no útil, pues pueden ocurrir reacciones falsas positivas, que se atribuyen al largo período de incubación de esta enfermedad (12).

Goff *et al.* (12) y Montenegro-James *et al.* (31) reportaron ensayos de IFI, los cuales presentan un número alto de reacciones falsas positivas y un alto fondo de fluorescencia. McGuire *et al.* (32), realizaron una IFI donde utilizaron como antígeno una muestra cruda de *A. marginale*, contaminado con membranas eritrocitarias, dando una serie de resultados falsos positivos y falsos negativos en el ganado infectado de forma aguda y en el convaleciente; en el ganado persistentemente infectado se observó un porcentaje de falsos negativos.

**ELISA:** Se han desarrollado pruebas ELISA para identificar anticuerpos contra *A. marginale* en suero bovino (33, 34). El ELISA es una prueba sensible, específica y brinda la posibilidad de una mejor interpreta-

ción de los resultados, cuando se compara con las técnicas antes mencionadas.

El uso de la proteína MSP5 como antígeno ha mostrado buenos resultados en la detección de diferentes especies del género *Anaplasma* (33). Para mejorar los parámetros de sensibilidad y especificidad de estos ensayos se han desarrollado técnicas de diagnóstico utilizando anticuerpos monoclonales y antígenos recombinantes (34, 18).

El establecimiento de un ensayo de ELISA competitivo (18), utilizando la proteína recombinante MSP5, permitió el incremento de la sensibilidad a un 96 % y la especificidad de un 95 %, pudiendo detectar las infecciones persistentes del parásito, por lo que los autores sugieren esta técnica para estudios epidemiológicos, programas de erradicación y para la regulación internacional para el movimiento del ganado. La utilización de un rMSP5 cELISA demostró que este es altamente específico para el diagnóstico serológico de anaplasmosis en ganado de Norteamérica. Sin embargo, este ELISA cMSP5 no diferencia las especies de *Anaplasma* en regiones geográficas donde exista la co-infección con *A. marginale*, *A. phagocytophylum* ó *A. centrale* (35, 36, 37). La secuencia de MSP5 es altamente conservada y por lo tanto similar entre las cepas de *A. marginale*, *A. centrale* y *A. phagocytophilum* (38).

Reyna-Bello *et al.* (39), desarrollaron un ensayo ELISA para el diagnóstico serológico de la anaplasmosis bovina con la proteína MSP5 de *A. marginale*. El ELISA mostró una seroprevalencia de la enfermedad de un 47 %, con sueros de campo de diferentes regiones geográficas de Venezuela lo que coincidió con los resultados de los estudios epidemiológicos realizados. Estos resultados confirman la importancia de la MSP5 como un antígeno útil para el diagnóstico serológico de la anaplasmosis bovina. Este ensayo fue mejorado por Eleizalde *et al.* (40). Sin embargo, no se ha evaluado la reacción cruzada que pudiera aparecer con otras especies de *Anaplasma*.

Más recientemente, se desarrolló un ELISA comercial para la detección de anticuerpos contra *A. marginale* y *A. centrale* en Australia y Zimbabue, mostrando una sensibilidad y especificidad en Australia de 100 % y 83.3 %, respectivamente y en Zimbabue una sensibilidad de un 100 %, no siendo posible calcular la especificidad por la poca cantidad de sueros positivos con que contaban (41). Estos autores concluyeron que el ELISA es una alternativa útil para los estudios epidemiológicos cuando se compara con la prueba de aglutinación en tarjeta.

Braz Junior *et al.* (42) desarrollaron un sistema ELISA para la detección de anticuerpos anti *A. marginale* con un 100 % de especificidad y un 94.87% de sensibilidad.

A pesar de los resultados obtenidos con los ensayos de ELISA, se hace necesaria la existencia de una prueba diagnóstica que se pueda realizar al lado del animal, que resulte sensible y específica, para lo cual la proteína MSP5 recombinante promete ser un fuerte candidato, lo que permitirá un diagnóstico rápido y efectivo de la enfermedad en el campo.

Corona *et al.* (43), obtuvieron la proteína MSP5 recombinante, de un aislado cubano de *A. marginale* y la recomiendan para ser utilizada como antígeno en una tira reactiva de flujo lateral para el diagnóstico de *A. marginale*.

Nielsen *et al.* (44), validaron una tira reactiva para la detección de anticuerpos contra *Anaplasma marginale*, utilizando como antígeno la proteína MSP5 recombinante y lo recomiendan como un ensayo útil para el movimiento de ganado de un área con infección a un área libre.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios relacionados con el desarrollo de ensayos para el diagnóstico de *Anaplasma marginale*, nos podemos encontrar planteamientos muy diversos, que van desde los criterios de Kocan *et al.* (45), quienes plantean que se han desarrollado métodos de diagnóstico basados en el ADN para identificar la infección por *Anaplasma*, pero que sin embargo, en la actualidad los ensayos serológicos basados en las MSPs se mantienen como los más prácticos para determinar la infección en un gran número animales.

Por otra parte, algunos autores (23) plantean que el ensayo de PCR en tiempo real puede mejorar los estudios epidemiológicos de la anaplasmosis en las poblaciones ganaderas donde se desconoce del estado de la infección.

En nuestro caso reafirmamos la necesidad del desarrollo de técnicas de diagnóstico altamente sensibles y específicas que permitan la detección de *Anaplasma marginale* en animales portadores, persistentemente infectados, que constituyen un reservorio de la enfermedad, ya que los hemoparásitos siguen siendo una serio obstáculo para el desarrollo de la ganadería. Los métodos de PCR en tiempo real se deben continuar desarrollando, tratando de lograr que varios patógenos puedan ser detectados en un mismo ensayo.

## REFERENCIAS

1. Ristic M, Kreir JP. Anaplasma. p. 719-722. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Kreig, N. R., Holt, J. B. (eds.) Vol. 1, Baltimore Williams and Wilkins. 1984.
2. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et al. Reorganization of 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 HE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int Syst Evol Microbiol. 2001;6:2145-2165.
3. Camacho M, Muñoz ML, Suarez CE, McGuire TC, et al. Expression of polymorphic *msp1b* genes during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. Infect Immun. 2000;68:1946-1952.
4. Richey E J, Palmer GH. Bovine Anaplasmosis. The Compendium Food Animal. 1990. 12: 1661-1669.
5. Masika PJ, Sonandi A, Van Averbek W. Perceived causes, diagnosis and treatment of babesiosis and anaplasmosis in cattle by livestock farmers in communal areas of the Central Eastern Cape Province, South Africa. J S Afr Vet Assoc. 1997;68:40-44.
6. Visser E, Ambrosio RE. DNA probes for detection of *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*. Onderstepoort. J Vet Res. 1987;54:623-627.
7. Gainer JH. Demonstration of *Anaplasma marginale* with the fluorescent dye, acridine orange; comparisons with the complement-fixation test and Wright stain. Am J Vet Res. 1961; 22:882-886.
8. Organización Mundial de Salud Animal (OIE): 2008, Bovine anaplasmosis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 6th ed., pp. 599-610. OIE, Paris, France.
9. Trueblood SE, Palmer GH. Anaplasmosis: A Review of Diagnostic Techniques. 8<sup>th</sup> National Veterinary hemoparasite Disease Conference. 1998.

10. Gale RC, Dimmock CM, Gartside M, Leatch G. *Anaplasma marginale* detection of carrier cattle by PCR. *Int J Parasitol.* 1996;26:1103-1109.
11. Ambrosio RE, Potgieter FT. The genome of *Anaplasma*: DNA composition and DNA/DNA hybridization. *J Vet Res.* 1987;54:53-65.
12. Goff W, Barbet AF, Stiller D, Palmer GH, Knowles D, Kocan K, et al. Detection of *Anaplasma marginale* infected tick vectors by using a cloned DNA probe. *Proc Natl Acad Sci.* 1988;85:919-92.
13. Eriks IS, Palmer GH, McGuire TC, Barbet AF. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* in carrier by using a nucleic acid probe. *Clin Microbiol.* 1989;27:279-284.
14. Shompole SP, Waghela SD, Rurangirwa FR, McGuire TC. Cloned DNA probes identify *Anaplasma ovis* in goats and reveal a high prevalence of infection. *J Clin Microbiol.* 1989;27:2730-2735.
15. Kocan KM, Ge NL, Blouin EF, Murphy GL. Development of a non-radioactive DNA probe and in situ hybridization for detection of *Anaplasma marginale* in tick and cattle. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;791:157-165.
16. Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet Parasitol.* 1993;50:69-81.
17. Corona B, Martínez S. Detection of *Anaplasma marginale* in cattle, by PCR amplification of MSP5 gene. *Rev Salud Anim.* 2011;33(1):24-31.
18. Torioni ES, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH, Suarez CE, McElwain TF. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in an endemic region using nested PCR and recombinant MSP5-cELISA. *Clin Microbiol.* 1998;36:777-782.
19. Corona B, Obregón D, Martínez S, Espinosa I, Henrique Fonseca A, Roque E. Detección por PCR de *Anaplasma marginale* en búfalos de la región occidental de Cuba. *Rev Salud Anim.* 2012;34(1):11-18.
20. Georges K, Loria GR, Riilis S, Greco A, Caracappa S, et al. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridization with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet Parasitol.* 2001;99:273-286.
21. Carelli G, Decaro N, Lorusso A, Elia G, Lorusso E, Mari V, et al. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Vet Microb.* 2007;124:07-114.
22. Decaro N, Carelli G, Lorusso E, Lucente MS, Greco G, Lorusso A, et al. Duplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection and quantification of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale*. *J Vet Diagn Invest.* 2008;20:606-611.
23. Reinbold JB, Coetzee JF, Sirigireddy KR, Ganta RR. Detection of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum* in bovine peripheral blood samples by duplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2010;48(7):2424-2432.
24. <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/naoseriadas/anaplasma/anaplasma.html>
25. Kocan KM, Blouin EF, Palmer GH, Eriks IS, Edwards WL. Strategies to interrupt the development of *Anaplasma marginale* in its tick vector. The effect of bovine derived antibodies. *Am N Y Acad Sci.* 1996;791:157-165.
26. United States Department of Agriculture (USDA). A microtitre technique for the complement fixation test for anaplasmosis. Veterinary Services, Animal and Plant Health Inspection Service, US Department of Agriculture, Beltsville, MD 20705, USA. 1974.
27. McElwain TF. Bovine anaplasmosis. Chapter 2.3.7. In *Manual of standards for diagnostic test and vaccine*, 4<sup>th</sup> edition. O.I.E., Paris. 2000:399- 341.
28. Palmer GH, Barbet AF, Kuttler KL, McGuire TC. Detection of *Anaplasma marginale* common surface proteins in all stages of infection. *J Clin Microbiol.* 1986;23:1078-1083.
29. Amerault TE, Rose JE, Roby TO. Modified card agglutination test for bovine anaplasmosis: evaluation with serum and plasma from experimental and natural cases of anaplasmosis. *Proceedings of the 76<sup>th</sup> Annual Meeting of the US Animal Association.* 1972;736-744.

30. Fosgate GT, Urdaz-Rodríguez JH, Dunbar MD, Rae DO, Donovan GA, Melendez P, et al. Diagnostic accuracy of methods for detecting *Anaplasma marginale* infection in lactating dairy cattle of Puerto Rico. *J Vet Diagn Invest.* 2010;22:192-199.
31. Montenegro-James S, James MA, Ristic M. Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as a vaccine against anaplasmosis. *Parasitol Res.* 1985;77:93-101.
32. McGuire CT, Palmer GH, Goff WL, Johnson MI, Davis WC. Common and isolate-restricted antigens of *Anaplasma marginale* detected with monoclonal antibodies. *Infect Immun.* 1984;43:697-700.
33. Ndungú LW, Aguirre C, Rurangirwa RR, McElwain TF, McGuire TC, et al. Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats using the MSP5 competitive inhibition Enzyme-linked. *J Clin Microbiol.* 1995;33:675-679.
34. Knowles D, Torioni ES, Palmer GH, McGuire TC, Stiller D, McElwain TF. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *Clin Microbiol.* 1996;34:2225-2230.
35. Hofmann-Lehmann R, Meli ML, Dreher UM, Gönczi E, Deplazes P, Braun U, et al. Concurrent Infections with Vector-Borne Pathogens Associated with Fatal Hemolytic Anemia in a Cattle Herd in Switzerland. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8):3775-3780.
36. Lin Q, Rikihisa Y, Felek S, Wang X, Massung RF, Woldehiwet Z. *Anaplasma phagocytophilum* has a functional MSP2 gene that is distinct from p44. *Infect Immun.* 2004;72:3883-3889.
37. de la Fuente J, Vicente J, Höfle U, Ruiz-Fons F, Fernández de Mera IG. *Anaplasma* infection in free-ranging Iberian red deer in the region of Castilla-La Mancha, Spain. *Vet Microbiol.* 2004;100:163-173.
38. Dreher UM, de la Fuente J, Hofmann-Lehmann R, Meli ML, Pusterla N, Kocan KM, et al. Serologic Cross-Reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(10):p1177-1183.
39. Reyna-Bello A, Cloeckert A, Vizcaíno N, Gonzatti MI, Aso PM, et al. 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.* 1998;5(2):259-262.
40. Eleizalde M, Caballero H, Reyna-Bell, A. Evaluación y mejoramiento del ensayo inmunoenzimático (ELISA) para el diagnóstico de la Anaplasmosis Bovina, utilizando la MSP5 recombinante como antígeno. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 2007; Vol. XVII, N° 4, 349-356.
41. Bowles PM, Molloy JB, Blight GW, Singh S, Mabikacheche LG. Evaluation of a commercially available ELISA kit for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* y *Anaplasma centrale* in cattle in Australia and Zimbabwe. *Onderstepoort. J Vet Res.* 2000;67:83-86.
42. Braz Junior CJ, Ribeiro MF, Lima JD, Passos LM. Development of an ELISA system for detection of anti-*Anaplasma marginale* antibodies in cattle in Brazil. *J Vet Med.* 2002;47:241-248.
43. Corona B, Machado H, Rodríguez M, Martínez, S. Characterization of recombinant *mSP5 Anaplasma marginale* Habana isolate. *Braz J Microb.* 2009;40:972-979.
44. Nielsen K, Smith P, Gall D, Torioni SE, Wagner G, Dajer A. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Anaplasma marginale* in bovine sera. *Vet Parasitol.* 1996;67(3-4):133-142.
45. Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol.* 2010;167:95-107.

Recibido: 10-1-2014.  
Aceptado: 30-5-2014.