

# DETECCIÓN DE TRANSMISIÓN TRANSPLACENTARIA DE *Anaplasma marginale* EN BOVINOS ASINTOMÁTICOS

## Detection of *Anaplasma marginale* Transplacental Transmission in Asymptomatic Cattle

Néstor Añez-Rojas<sup>1</sup>, Oscar Romero<sup>1</sup>, Hugo Valbuena<sup>1</sup>, Gladys Crisante<sup>2</sup>, Agustina Rojas<sup>2</sup>, Ana María Bolívar<sup>2</sup> y Néstor Añez<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigaciones en Biotecnología Aplicada (GIBA), Universidad Nacional Experimental del Sur del Lago (UNESUR) Santa Bárbara, Zulia, Venezuela. <sup>2</sup> Investigaciones Parasitológicas "J.F. Torrealba", Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, 5101, Venezuela. \* nanes@ula.ve. Tel/Fax: +58 274 240 1285

### RESUMEN

Se detecta la presencia de *Anaplasma marginale* en becerros hijos de vacas con infección asintomática. Ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) llevados a cabo en muestras de sangre de 31 vacas lactantes, en aparente buen estado físico y sus respectivas crías, revelaron la presencia de ADN específico de *A. marginale* en el 70 y 40%, respectivamente. La detección de parte del genoma de *A. marginale* en becerros recién nacidos, hijos de vacas asintomáticas PCR positivas, sugiere la transmisión de la infección madre-hijo por vía transplacentaria. Se discute las implicaciones epizootiológicas de la infección por *A. marginale* en animales asintomáticos y se advierte sobre la potencialidad de esta forma de transmisión en el mantenimiento del ciclo de este organismo. Se concluye que la transmisión por vía transplacentaria podría ser un evento de frecuente ocurrencia en el área de estudio y se sugiere la utilización de técnicas producto de la nueva biotecnología como la PCR para incrementar la especificidad en el diagnóstico.

**Palabras clave:** *Anaplasma marginale*, transmisión transplacentaria, PCR, Venezuela.

### ABSTRACT

The presence of *Anaplasma marginale* in calves descendants from cows with asymptomatic infections, was detected. Polymerase chain reaction (PCR) assays carried out in blood samples from 31 healthy cows and their respective calves, revealed the presence of *A. marginale*-specific DNA in 70 and 40% of them, respectively. The detection of a portion of *A. marginale* genome in newborn calves, suggests a transplacental mother-

offspring transmission. The epizootiological implications of *A. marginale*-infection in asymptomatic animals and the potential of transplacental transmission in the maintenance of *A. marginale* were considered. Results lead to conclude that *A. marginale* transplacental transmission might be of frequent occurrence in the study area, so more specific techniques, such as PCR, are suggested for a more thorough diagnosis.

**Key words:** *Anaplasma marginale*, transplacental transmission, PCR, Venezuela.

### INTRODUCCIÓN

*Anaplasma marginale*, agente etiológico de la anaplasmosis bovina (*Bos taurus-indicus*) es un organismo intraeritrocítico que pertenece a la familia Anaplasmataceae del orden Rickettsiales [4, 9]. La infección por este organismo causa esta hemoparasitosis responsable por graves pérdidas económicas en explotaciones bovinas como consecuencia de la alta mortalidad, el brusco descenso en la producción lechera, abortos durante la fase aguda, retraso en el desarrollo corporal, unido a los gastos ocasionados por el uso de medicamentos [7, 17]. La tan variada sintomatología detectada en los animales infectados pareciera la causa de diversos estados de gravedad que se observa en los rebaños, en los cuales puede detectarse, desde animales asintomáticos hasta casos de postración clínica con muerte inminente [2]. Esta circunstancia hace de la anaplasmosis bovina una infección económicamente importante en América por los enormes gastos que ocasiona en regiones ganaderas ubicadas desde los Estados Unidos hasta Argentina, en cuya región se registran cifras que van desde el 26 hasta el 78% de prevalencia [8, 13]. En Venezuela, la anaplasmosis ha sido señalada en las diferentes regiones donde se explota comercialmente el ganado bovino, habiéndose asimis-

mo, identificado como una de las entidades hemotrópicas que mayormente obstaculiza el desarrollo ganadero [3].

La genética de la susceptibilidad y/o resistencia de la ganadería bovina venezolana a la infección por *A. marginale* está lejos de ser comprendida y/o estimada, por lo que es difícil determinar las condiciones de estabilidad/inestabilidad enzoótica en los rebaños para poder cuantificar el número de animales susceptibles en relación con la proporción de animales infectados. Aún cuando se han registrado algunos datos sobre seroprevalencia e incidencia de anaplasmosis bovina en ciertas regiones de Venezuela, la prevalencia real de esta enfermedad anemizante está lejos de ser precisada [10]. Una de las posibles causas que explicaría los sub-registros de anaplasmosis pareciera ser la presencia de infecciones asintomáticas en proporciones significativas en rebaños bovinos de explotaciones ubicadas en áreas bajo riesgo. En este sentido recientemente, Bolívar y col. [2] utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) registraron la presencia de infección por *A. marginale*, en animales sin manifestaciones clínicas aparentes, detectando 52 y 33% de animales infectados en rebaños bovinos mestizos y puros de regiones bajas y altas del occidente de Venezuela, respectivamente. Los mismos autores advierten sobre el riesgo de la anaplasmosis subclínica y su efecto potencial sobre la economía de explotaciones bovinas.

El uso del ensayo de PCR, una técnica molecular de comprobada alta sensibilidad y especificidad, pareciera una opción diagnóstica para la detección de *A. marginale*, dada la dificultad que presenta la utilización de métodos hematológicos y/o serológicos convencionales, debido a su conocido bajo nivel de sensibilidad y especificidad [11].

La transmisión transplacentaria de *A. marginale* en bovino es un evento conocido y suficientemente sustentado [14, 18]. Sin embargo, en la cuenca del Lago de Maracaibo, al occidente de Venezuela, no existe información precisa sobre la frecuencia de transmisión de este organismo de madre a hijo durante el proceso de gestación. En el presente trabajo se intenta demostrar la transmisión transplacentaria de *A. marginale*, para ello se registran los resultados obtenidos, luego de un ensayo de PCR, en un muestreo simultáneo vaca-becerro realizado en una finca de explotación doble propósito ubicada en la zona sur del Lago de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Área de estudio.** El muestreo fue llevado a cabo en una explotación bovina perteneciente a la Universidad Nacional Experimental del Sur del Lago de Maracaibo (UNESUR) ubicada en el municipio Colón, estado Zulia, Venezuela. La misma se encuentra a 4 m.s.n.m, con una localización entre 08° 57'03'' N y 72° 01'13'' W, con temperatura media anual de 26°C (22,8°C – 32,7°C), humedad relativa promedio anual de 78% (51,6-91,7%) y precipitación media anual de 1.768 mm,

según datos tomados en la sección de meteorología de la misma unidad de producción.

**Muestreo y procesamiento de la muestra.** Un total de 34 vacas lactantes y sus 35 crías (un parto de gemelos) fue incluido en el muestreo. El rebaño estuvo constituido por animales mestizos, con predominio racial de *Bos indicus*. La edad promedio del grupo fue de 6,8 ± 3 años (rango 3 - 15 años) en las cuales se registraron 2 ± 1 partos (rango 1 - 4 partos). Del total de vacas muestreadas, 31 (91,2%) presentaron, para el momento del muestreo, buen estado físico corporal y una condición clínica sin lesiones aparentes, consideradas asintomáticas según criterio veterinario; 2 (5,9%) bajo tratamiento por presentar síntomas y signos atribuibles a anaplasmosis según evaluación clínica especializada y 1 (2,9%) fue descartada del rebaño por presentar un aspecto físico deplorable, por lo que fue enviada a sacrificio (TABLA I). El grupo de becerros estuvo conformado por 20 hembras (57%) y 15 machos (43%) con edad promedio de 43 ± 65 días (rango 1 - 330 días). La TABLA I muestra detalles sobre identificación y características de los animales muestreados. El muestreo consistió en tomar 6 mL de sangre periférica de la vena yugular con inyectora plástica desechable. La misma fue vertida en un tubo de centrifuga de 15 mL conteniendo anticoagulante (EDTA, 35 µL/3mL de sangre) y sobre papel de filtro Whatman N° 3. Las muestras fueron trasladadas inmediatamente al laboratorio para su procesamiento. Todas las muestras fueron codificadas, conociéndose la identificación de cada animal después de obtenido el resultado correspondiente.

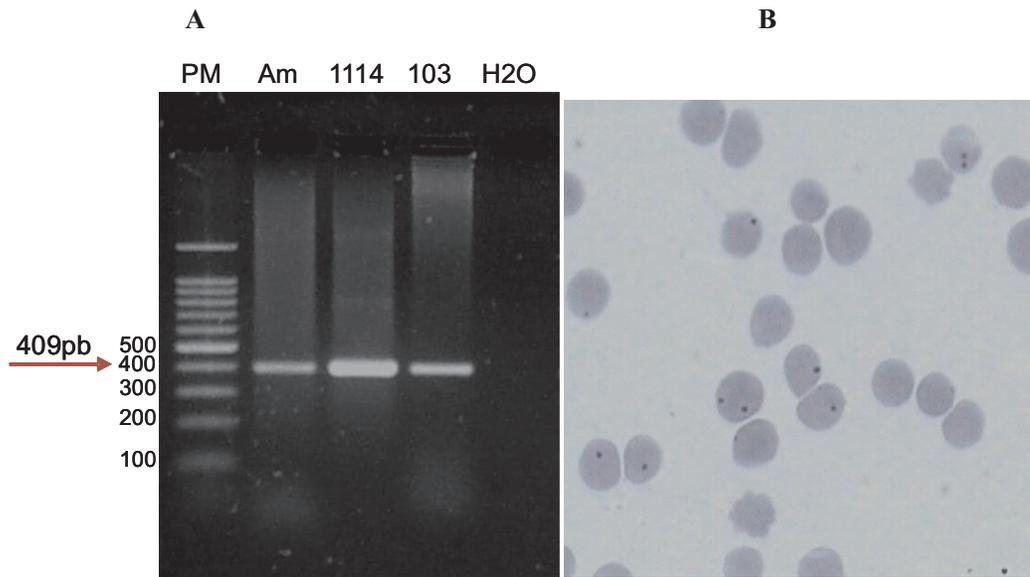
## Extracción de ADN y ensayo de PCR.

La extracción de ADN en ambas muestras, sangre con anti-coagulante y sangre colectada sobre papel de filtro, fue realizado por el clásico método de fenol-cloroformo [15]. El ensayo de PCR fue llevado a cabo utilizando los oligonucleótidos BAP-2 (5' GTA TGG CAC GTA GTC TTG GGA TCA - 3') y AL34S (5' CAG CAG CAG CAA GAC CTT CA-3'), los cuales amplifican el gen que codifica la sub-unidad de la proteína mayor de superficie (msp1) de *Anaplasma marginale*, generando bandas de 409 pb [16]. La mezcla de reacción fue preparada con 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,8mM dNTP; 1,8 µM de cada primer y 1,25 U de taq polimerasa; siendo el volumen de ADN problema de 5 µL. La amplificación del producto de PCR fue realizada en 32 ciclos, incluyendo una fase inicial de desnaturación a 94°C/1min, seguida de la fase de alineamiento a 60°C/1 min y extensión a 72°C/ 0,5 min. Los productos amplificados de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, coloreados con bromuro de etidio. Como controles positivos fueron utilizadas dos muestras de ADN genómico de *A. marginale* en stock en el laboratorio, obtenidas de sangre de ejemplares de la raza Holstein número 1114 y 103, los cuales presentaron sintomatología aguda y muerte por anaplasmosis siendo diagnosticados hematológica y molecularmente (FIG.1).

**TABLA I**  
**IDENTIFICACIÓN DE BOVINOS MUESTREADOS, DETECCIÓN DE *Anaplasma marginale* EN VACAS ASINTOMÁTICAS Y DEMOSTRACIÓN DE TRANSMISIÓN TRANSPLENTARIA UTILIZANDO UN ENSAYO DE PCR/ SAMPLE**  
**IDENTIFICATION, DETECTION OF *A.marginale* IN SYMPTOMLESS COWS AND DEMONSTRATION BY PCR OF TRANSPLENTAL TRANSMISSION**

Código madre	Muestreo en vacas				Muestreo en becerros			
	Edad (Años)	Nº de Partos	Condición Clínica	Diagnóstico PCR	Código hijo	Edad (Días)	Sexo	Diagnóstico PCR
2074	6	2	N	+	2074H	240	♀	+
10002	5	2	N	-	10002H	28	♀	-
1059	7	3	N	+	1059H	14	♂	-
306	12	4	N	+	306H	56	♀	+
02000	8	3	N	+	02000H	21	♀	-
07401	6	3	N	+	07401H	77	♀	-
11103	5	2	N	+	11103H	44	♀	-
02902	6	3	N	+	02902H	88	♀	+
2035	6	2	N	+	2035H	330	♂	+
402	15	NR	D	+	402H	50	♂	-
1015	7	3	T	+	1015H	17	♂	-
16004	3	1	N	+	16004H	46	♀	-
2156	5	2	N	-	2156H	20	♂	-
507	10	4	N	-	507H	30	♂	-
12003	5	2	N	+	12003H	45	♂	-
54	14	4	N	+	54H	40	♀	-
03401	7	3	N	+	03401H	36	♀	-
346	16	2	N	+	346H	46	♀	-
2082	6	2	N	+	2082H	45	♂	-
21504	3	1	N	+	21504H	28	♂	+
1016	7	3	T	+	1016H	50	♂	-
04201	7	3	N	+	04201H	3	♂	-
2038	6	2	N	+	2038H	1	♀	-
20	4	2	N	+	20H	NR	♀	-
16704	4	2	N	-	16704H	17	♀	-
073/02	6	3	N	-	073/02H	17	♀	-
027/02	6	3	N	-	027/02H	17	♀	+
373	NR	NR	N	+	373H	14	♀	+
157	NR	NR	N	+	157H	11	♀	+
509	NR	NR	N	-	509H	10	♀	-
44	NR	NR	N	-	44H	10	♂	-
23005	3	1	N	-	23005H	10	♀	+
318704 *				+	318704H1	8	♂	+
	4	2	N		318704H2	8	♂	+
140/03	5	3	N	+	140/03H	8	♂	+

\* Vaca de parto doble; T: Tratamiento contra anaplasmosis; N: Normal; D: Descartada; NR: No registrado.



**FIGURA 1. DETECCIÓN DE *Anaplasma marginale* EN MUESTRAS CONTROL UTILIZANDO METODOLOGÍA MOLECULAR (A) Y HEMATOLÓGICA (B). A: ENSAYO DE PCR REALIZADO CON ADN CONTROL POSITIVO (Am) Y CON MUESTRAS DE ADN EXTRAÍDO DE SANGRE DE BOVINOS CON ANAPLASMOSIS AMPLIFICANDO 409 pb (FLECHA). H<sub>2</sub>O: CONTROL DE REACCIÓN. PM: MARCADOR DE PESO MOLECULAR (100pb). B: EXTENDIDO DE MUESTRA DE SANGRE DE BOVINO CON ANAPLASMOSIS COLOREADO CON GIEMSA 10% EN BUFFER FOSFATO. NÓTESE LA PRESENCIA DE *Anaplasma marginale* DENTRO DE ERITROCITOS (1000X)./ DETECTION OF *A.marginale* IN CONTROL SAMPLES USING MOLECULAR (A) AND HEMATHOLOGIC (B) METHODS. A: PCR ASSAY CARRIED OUT WITH DNA CONTROL AND FROM SAMPLES OF ANIMALS WITH ANAPLASMOSIS GENERATING AMPLIFICATION OF 409 BP (ARROWED). H<sub>2</sub>O: REACTION CONTROL. PM: MOLECULAR WEIGHT (100BP). B. GIEMSA STAIN SHOWING *A. marginale* INSIDE BLOOD RED CELLS FROM AN INFECTED ANIMAL.**

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Detección de *Anaplasma marginale* en vacas lactantes asintomáticas

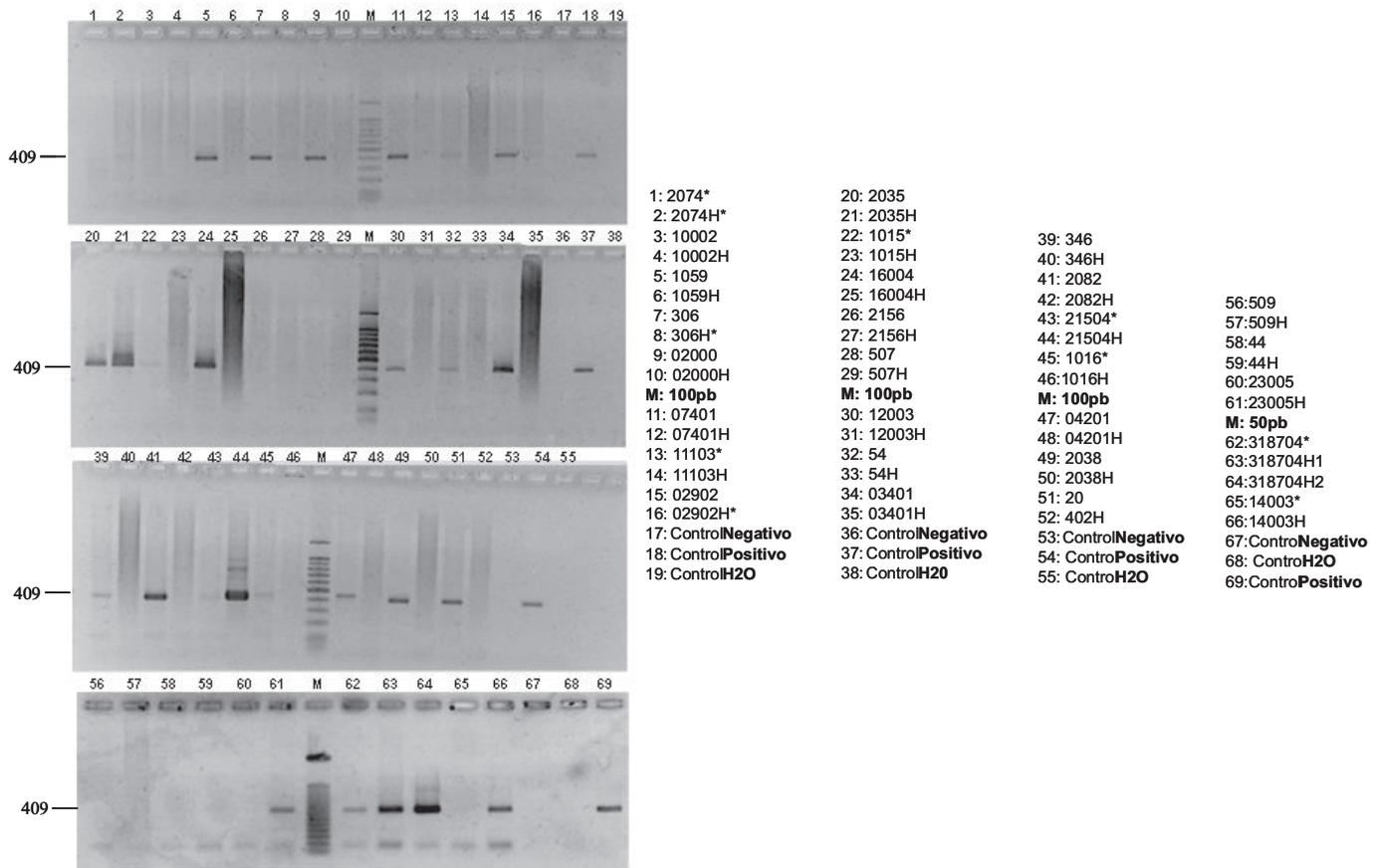
En el presente estudio, la realización de un ensayo de PCR específico para *A. marginale* en muestras sanguíneas de 31 vacas consideradas como asintomáticas reveló la presencia de parte del genoma de este organismo en 22 de ellas (70,9%). La prueba de PCR generó bandas de aproximadamente 409 pb, correspondientes a la amplificación del gen *msp1* de *A. marginale* [16]. Detalles sobre la identificación de cada vaca y el diagnóstico respectivo por PCR se muestra en la TABLA I. Asimismo, la positividad de la reacción de las diferentes muestras de animales asintomáticos mostrando una fuerte señal de PCR con el tamaño esperado de la banda, se presentan en la FIG. 2.

Los resultados 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. Asimismo, estos hallazgos parecieran indicar que la utilización de un método molecular (PCR), producto de la nueva biotecnología, podría resultar suficientemente sensible y específico en la detección de este tipo de infección como previamente ha

sido sugerido [11]. Este hecho, pareciera tener importancia epizootológica si se considera la posibilidad de que un animal que albergue infección subclínica pudiera, debido a compromisos inmunológicos, aflorar la condición clínica patente con síntomas y signos propios de la anaplasmosis, constituyéndose en fuente de infección para el resto de animales en el mismo rebaño, evento que ha sido observado con mucha frecuencia en otras dolencias [1, 6, 12]. Esta aseveración encuentra apoyo en los resultados de Eriks y col. [5] quienes concluyen que, bovinos recuperados de una infección aguda con *A. marginale* permanecen persistentemente infectados aunque a bajo umbral, pudiendo los mismos servir como reservorios en la transmisión de la infección. Asimismo, los autores sugieren que para comprender el rol de estos portadores en la prevalencia y transmisión de la infección, es esencial que los bajos niveles de infección sean detectados con precisión y cuantificados por métodos altamente sensibles y específicos como los ensayos de PCR empleados en el presente estudio.

### Detección de transmisión transplacentaria de *Anaplasma marginale* en becerros a partir de madres asintomáticas

La ejecución, en muestras de sangre de becerros, de un ensayo de PCR específico para ADN de *A. marginale*, igual al realizado en muestras de sus respectivas madres, permitió detectar la presencia de parte del genoma de este organismo en 10 hijos (5♀ y 5♂) de 9 vacas asintomáticas con PCR positivo.



**FIGURA 2. DETECCIÓN DE *Anaplasma marginale* EN MADRES E HIJOS BOVINOS UTILIZANDO ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS DE PCR EN GELES DE AGAROSA (2%) GENERADO POR AMPLIFICACIÓN DEL GEN MSP1 $\beta$ . NÚMERO DEL CARRIL IDENTIFICA CADA VACA Y SU RESPECTIVO BECERRO (Nº+H). \*: INDICA BANDA DÉBIL. M: PESO MOLECULAR/ DETECTION OF *A. marginale* IN MOTHER BOVINE AND THEIR OFFSPRING USING AGAROSE GEL (2%) ELECTROPHORESIS OF PCR PRODUCTS GENERATED AMPLIFICATION OF MSP1 $\beta$  GENE. LANE NUMBER IDENTIFY EACH COW AND ITS RESPECTIVE CALF (H). \*: INDICATE WEAK BAND. M: MOLECULAR WEIGHT.**

Detalles sobre la coincidencia de becerros PCR positivos a *A. marginale* y sus madres con infección subclínica causada por el mismo organismo y detectado con la misma técnica, se muestran en la TABLA I. Asimismo, las bandas correspondientes expresando positividad de vacas y becerros a *A. marginale* se presentan en la FIG. 2.

Es interesante notar que de los 10 becerros PCR positivos, 5 (50%) tenían menos de 15 días de nacidos y 3 de ellos (60%), 2 de los cuales eran gemelos, tenían 8 días de edad y habían sido mantenidos en vaquera, lo cual pudiera sugerir la transmisión de la infección de madre a hijo por vía transplacentaria. Otro elemento que pudiera reforzar esta interpretación sobre la demostración de la transmisión por esta vía, es el hecho de que becerros de la misma edad, mantenidos en las mismas condiciones e instalaciones, hijos de madres negativas resultaron negativos al ensayo de PCR para la detección de *A. marginale* en el 77,8%. Asimismo, pareciera poco probable que dos becerros gemelos pudieran adquirir la infección por vía vectorial, en tan poco tiempo y que ambos tuvieran un comportamiento similar ante la presencia del agente infeccioso.

Aunque pudiera pensarse que todos los 10 becerros que resultaron PCR positivos, hijos de madres con infección subclínica también PCR positivas a *A. marginale*, adquirieron la infección durante el período de gestación, es más sano para el análisis considerar que 5 de ellos pudieron haberse infectado por vía vectorial, dado el largo tiempo de lactancia para el momento del muestreo, el cual osciló entre los 2 y los 11 meses pos nacimiento. Aún así, la detección de la infección en el 50% de los becerros menores de 15 días o el 30% de aquellos con 8 días de nacidos, pareciera un hecho alarmante dado el alto porcentaje de anaplasmosis subclínica detectado en estos animales del rebaño, los cuales exhibían una condición clínica aparentemente normal, similar a la de sus madres.

Por otra parte, es imperativo llamar la atención sobre la alta proporción de vacas lactantes con infección asintomática o subclínica detectada en el presente trabajo (70,9%) y como las mismas parecen estar afectando la población de animales jóvenes, los cuales, a su vez, pudieran convertirse potencialmente en la génesis de una epidemia de anaplasmosis en el área de explotación.

## CONCLUSIONES

La demostración de la infección por *A. marginale*, mediante la detección por PCR de parte del genoma del organismo, en 22 de 31 (70,9%) vacas incluidas en el estudio y en, al menos, el 40% de sus hijos, todos con buen estado físico y sin manifestaciones clínicas aparentes sugestivas de anaplasmosis, refleja clara ventaja diagnóstica de la metodología molecular, producto de la nueva biotecnología, sobre los métodos convencionales utilizados en zonas ganaderas.

La presente observación permite concluir que la transmisión transplacentaria de *A. marginale* en bovinos de la región estudiada pareciera ser de frecuente ocurrencia y que la utilización de técnicas diagnósticas más eficientes como el ensayo de PCR podría ayudar a tener una aproximación a la realidad epizootiológica en los rebaños de esta y otras regiones de Venezuela.

## AGRADECIMIENTO

Estudio financiado por los proyectos FONACIT-G-2005000370 (NA-ULA) y Dirección de Investigación y Postgrado de UNESUR N° 035A-2009 (NAR). Se agradece la colaboración de la coordinación de unidad de Producción Hacienda "La Chiquinquirá" (UNESUR) por la logística durante el muestreo realizado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AÑEZ, N.; CRISANTE, G.; ROJAS, A.; CARRASCO, H.; PARADA, H.; YEPEZ, Y.; BORGES, R.; GUEVARA, P.; RAMIREZ, J.L. Detection and significance of inapparent infection in Chagas disease in western Venezuela. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 65(3):227-232. 2001.
- [2] BOLÍVAR, A.M.; URDANETA, D.; AÑEZ-ROJAS, N.; CRISANTE, G.; AÑEZ, N. Utilización del ensayo de PCR para detectar infecciones subclínicas por *Anaplasma marginale* en explotaciones ganaderas. **Bol. Malar. San. Amb.** XLVII, Supl.Nº1: 296-297.2007.
- [3] DÍAZ, D.; VALERA, Z.; DE ANDRADE, E.; PARRA, O.; ESCALONA, F.; RAMÍREZ, R. Prevalencia de *Anaplasma marginale* en bovinos del sector La Piñata, Municipio La Cañada de Urdaneta, estado Zulia, Venezuela. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XIII (3):193-198. 2003.
- [4] DUMLER, J.S; BARBET, A.C; BEKKER, C.P.J; DASCH, G.A; PALMER, G.H; RAY, S.C; RIKIHISA, Y; RURANGIRWA, F.R. : 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 subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 51:2145-2165. 2001.
- [5] ERICKS, I.S.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C.; ALLRED, D.R.; BARBET, A.F. Detection and quantitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. **J. Clin. Microbiol.** 27 (2): 279-284. 1989.
- [6] GARNHAM, P.C.C. The significance of inapparent infections in Chagas' disease and other forms of trypanosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 75:181-188. 1980.
- [7] GONÇALVES, R.C.; GOMES da SILVA, D.P.; CHIACHIO, S.B.; BORGES, A.S.; AMORIM, R.M.; BANDARRA, E.P.; TAKAHIRA, R.K. Anaplasmosis neonatal em bezerro. **Vet. Not. Uberlandia.** 11(1):95-98. 2005.
- [8] HUGH-JONES, M.E.; SCOTLAND, K.; APPEWHAITI, L.M.; ALEXANDER, F. M. Seroprevalence of anaplasmosis and babesiosis in livestock on St. Lucia, **Trop. Anim. Health Prod.** 20:137-139. 1988.
- [9] KOCAN, K.M; de la FUENTE, J. ; BLOUIN, E.F. Advances toward understanding the molecular biology of the *Anaplasma*-tick interface. **Frontiers in Biosci.** 13:7032-7045. 2008.
- [10] MELÉNDEZ, R.D.; FORLANO, M. Seroprevalence and incidence of babesiosis and anaplasmosis in a Carora breed herd from Venezuela. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 6:105-109.1997.
- [11] MELMAN, S.; HARTT, Y.; GIARDINA, S. El uso de la biología molecular en el diagnóstico de *Anaplasma marginale*. **Croizatia.** 3:40-52.2004.
- [12] NICOLLE, C. Les infections inapparentes. **Scientia.** 33:181-271. 1933.
- [13] PAYNE, R.C.; SCOTT, J.M. Anaplasmosis and babesiosis in El Salvador. **Trop. Anim. Health Prod.** 14:75-80. 1982.
- [14] REY-VALEIRON, C.; ASO, P.M.; CORONADO, A. Prevalencia de *Anaplasma marginale* y anticuerpos específicos en becerros neonatos. **Acta Cient. Venez.** 54:121- 126. 2003.
- [15] SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *In vitro* amplification of DNA by the PCR. In: **Molecular cloning, a laboratory manual.** Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA E.3-E.4; E.10-E11pp. 1989.
- [16] STICH, R.; BANTLE, J.A.; KOCAN, K.M.; FEKETE, A. Detection of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales:Anaplasmataceae) in hemolymph of *Dermacentor andersoni* (Acari:Ixodidae) with the Polymerase Chain Reaction. **J. Med. Entomol.** 30(4):781-788. 1993.
- [17] VIDAL, A. Utilização dos produtos Oxivet LA® e Ganaseg® no tratamento de tourinhos submetidos à pre-munição. **Hora Vet. Porto Alegre.** 19 (114):15-19.2000.
- [18] ZAUGG, J.L. Bovine anaplasmosis: Transplacental transmission as it relates to stages of gestation. **Am. J. Vet. Res.** 46:570-572. 1985.