

# Universidad de Guadalajara

Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia



V 8

Estudio sobre la Relación Antigénica entre  
Anaplasma marginale y Iperythrozoön suis.

T e s i s

que para obtener el Título de

Médico Veterinario Zootecnista  
presenta

Octavio Jorge García Ortiz

Primera Generación 64 - 69

Guadalajara, Jal., Junio de 1971

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

ESTUDIO SOBRE LA RELACION EN-  
TRE ANAPLASMA MARGINALE Y --  
EPERYTHROZOOM SUIS.

Tesis que sustenta:

OCTAVIO JORGE GARCIA ORTIZ.

Para la obtención del Título de:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.

*Con mi más profunda admiración  
y respeto a mis padres:*

*OCTAVIO L. GARCIA LOYA.  
CARMEN O. DE GARCIA LOYA.*

*Que con su maravilloso ejemplo  
y su desinteresado esfuerzo lo  
graron hacer de mí un Profesio  
nista con un enorme deseo de en  
grandecer a México.*

*A mis hermanos:*

*Lic. María Teresa  
C.P. Carmen Aída  
Ing. Arturo  
Cuauhtemoc  
José Luis  
Carlos Mario  
Leoncio*

*A mi novia:*

*Biol. Jolly de Silva D.*

A TODOS MIS MAESTROS,  
QUE DESINTERESADAMENTE,  
SUPIERON IMPARTIRME  
SUS SABIOS CONOCIMIENTOS  
Y QUE SON EJEMPLOS DE  
PROFESIONISTAS DIGNOS.

A mi padrino de generación:  
M.V.Z. RAMON FERNANDEZ DE CEBALLOS.

A los Doctores:

JAVIER RIVERA HERNANDEZ

RAMON NARANJO JIMENEZ

J. JESUS GUIZAR

ENEAS RENDON.

- I.- INTRODUCCION.
- II.- MATERIAL Y METODOS.
- III.- RESULTADOS.
- IV.- DISCUSION.
- V.- CONCLUSIONES.
- VI.- SUMARIO.
- VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

## 1.- INTRODUCCION.

La elaboración de este trabajo está encaminada a contribuir al estudio de ciertos microorganismos, que en mucho afectan a la economía de la ganadería y que en nuestro país están ampliamente distribuidos, como lo son: Anaplasma marginale y Eperythroozoon suis.

De los casos presentados al Laboratorio de Diagnóstico Animal de Tlaquepaque, Jal., en lo que a cerdos se refiere, nos revela que la Eperitroozonosis ocupa el décimo lugar en importancia, y que además, el número de cerdos afectados por esta enfermedad, va en aumento año por año. (16).

En cuanto a la Anaplasmosis marginale sus trabajos nos reportan que esa enfermedad, ocupa el quinto lugar en importancia dentro de la zona que abarca la cuenca Lerma-Santiago, y el tercer lugar en los Estados de Nayarit, Jalisco, Colima, Zacatecas y Michoacán. (16), (17).

El objetivo que se persigue, dada la gran importancia que para México representan estas dos enfermedades, es determinar si existe entre estos dos microorganismos alguna relación antigénica, debido al gran parecido que los dos tienen, tanto en su morfología como en su forma de vida parasitaria, así como también su susceptibilidad a los mismos medicamentos, ya que son combatidos con eficacia por los compuestos arsenicales, la tetraciclina, clorotetraciclina, óxitetraciclina y la neoarsfenamina. (1), (2), (3), (4), (7).

## II. - MATERIAL Y METODOS.

### MATERIAL:

- (a) Jeringas de cristal de 20 c. c.
- (b) Agujas hipodérmicas del No. 18.
- (c) Tubos de ensaye con tapón de vaquelita.
- (d) Portaobjetos.
- (e) Tubos Capilares.
- (f) Mechero.
- (g) Matraz.
- (h) Balanza.
- (i) Gavetas de plástico.
- (j) Incubadora.
- (k) Taladro.
- (l) Micropipeta.
- (m) Papel filtro.
- (n) Cámara de luz difusa.

### REACTIVOS:

- (a) Oxalato de sodio.
- (b) Alcohol absoluto.
- (c) Colorante de Giemsa.
- (d) Antígeno estandarizado de A. marginale.
- (e) Agar-Agar.
- (f) Acido Bórico.
- (g) Tetraborato de sodio deshidratado.
- (h) Suero Sanguíneo de lechones.
- (i) Solución salina.
- (j) Suero Sanguíneo de bovino.

### METODOS:

1.- Se seleccionaron cincuenta animales clínicamente enfermos, procedentes de diez y seis granjas situadas en puntos diferentes de los alrededores de la ciudad de Guadalajara. El sangrado se llevó a cabo en lechones de ocho a cincuenta -

días de edad, existiendo en las zahurdas donde se tomaron las muestras, problema de ectoparásitos (*Haematopinus suis*). Cada una de las muestras fueron recogidas en tubos de ensaye con oxalato de sodio y sin anticoagulante, y colocadas en gradillas para evitar al máximo la hemólisis.

2.- A cada uno de los casos se les hizo un frotis sanguíneo coloreado, con el objeto de comprobar la presencia de corpúsculos de *Eperythrozoon suis*. La solución colorante que se usó fué de Giemsa, la cual debe de diluirse antes de usarse (una gota en 1 c. c. de agua), y con esta solución se tiñe durante treinta minutos la preparación fijada. En seguida se lava en el chorro de agua y se seca, para finalmente, hacer la observación microscópica.

3.- Una vez probada la presencia de corpúsculos de *Eperythrozoon suis* mediante frotis sanguíneo a las muestras de sangre contenidas en los tubos sin anticoagulante se les extrae el suero sanguíneo, con el cual se va a realizar la aglutinación en tubo capilar y la inmunodifusión. Los sueros, así obtenidos, deben estar exentos de hemólisis y partículas extrañas. El suero se guarda en congelación hasta que se vaya a usar, o para exámenes posteriores.

4.- El antígeno (*Anaplasma marginale*) debe guardarse a 4° C. y ser agitado siempre que se vaya a usar.

5.- Aglutinación en tubo capilar.- A la sangre de los animales clínicamente enfermos y que son positivos a *Eperythrozoon suis*, mediante frotis sanguíneo, se los separa el suero en la forma ya descrita. Se inactiva éste, colocándose en bañomaría a 56° C. durante treinta minutos. Pasado este tiempo, se deja enfriar a la temperatura ambiente para proseguir con los siguientes pasos: (5), (14)

(a) El exceso de antígeno se limpia con una gasa o papel filtro.

(c) El mismo extremo del capilar que contiene el an



tígeno, se sumerge en el suero problema llenando los dos tercios restantes del capilar. El antígeno es empujado por el suero al otro extremo del capilar.

(d) El tubo capilar se invierte de manera que el antígeno queda abajo y es, precisamente, el extremo del capilar que contiene al antígeno el que se invierte con posición vertical en la tablilla de arcilla.

(c) El extremo superior del capilar se sella con la resina para evitar la evaporación, dejándose reposar por 24-48 horas y a temperatura ambiente antes de hacer la lectura.

(f) La lectura se hace colocando un papel negro por detrás del tubo capilar. La prueba es negativa cuando el suero no ha cambiado de aspecto, y es positivo, cuando en el suero se aprecia la formación de grumos blanquecinos.

(g) Siempre debe usarse en esta prueba la presencia de dos testigos conocidos, uno positivo y otro negativo (Ristic).

6.- IMMUNODIFUSION.- La sangre de los animales enfermos obtenida como ya se describió, y que fueron positivos a Eperythrozoon suis mediante frotis sanguíneo, se le separa el suero en la forma que se indicó. En esta prueba no se inactiva el suero pasándose de inmediato a realizar los siguientes pasos: (6)

(a) Preparación del medio difusor.- En un matraz aforado se colocan 0,95 grs. de agar en 100 ml. de solución Boffer (6.7 grs. de ácido bórico, 13.4 grs. de tetraborato de sodio deshidratado en 1,000 ml de agua destilada). Esta mezcla se calienta hasta que casi hierva para que se diluya y debe ser clara.

(b) El medio difusor se debe conservar en refrigerador. Cada vez que éste sea usado se calienta hasta que se haga líquido y pueda manejarse con pipeta, para vaciarse en las gavetas de plástico de la incubadora.

(c) En cada gaveta en las que se colocan seis portaobje

tos se ponen 20 ml. del medio, usándose una pipeta; la gaveta se coloca en una superficie bien nivelada para evitar así que unas partes sean más gruesas que otras.

(d) El medio debe solidificarse en quince minutos a temperatura ambiente.

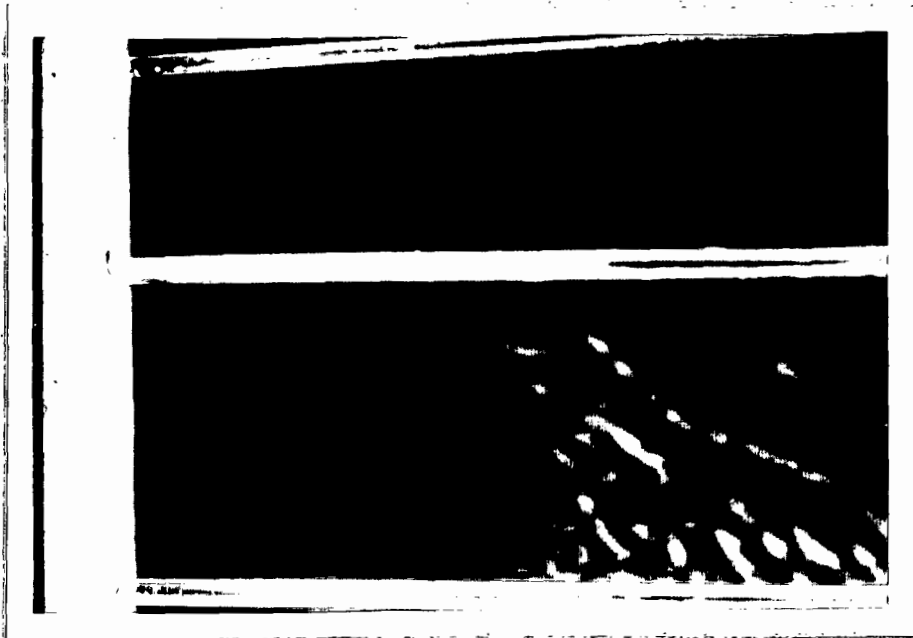
(e) Se hacen las depresiones necesarias y en la forma que se deseen sobre los portaobjetos, conteniendo el medio con un taladro. En seguida se extraen los bocados que el taladro deja por succión quedando la depresión en forma de poder usarse.

(f) El antígeno debe estar diluído para que su difusión, a través del gel, sea más fácil. Se usaron las diluciones -- 1:30 y 1:45 en solución salina (0.9 grs. de cloruro de sodio en 100 ml. de agua destilada). (6).

(g) Las depresiones se llenan con anticuerpo y antígeno indistintamente, tratando de que reaccionen en varias posibilidades.

(h) Las gavetas se colocan en la incubadora, en la cual se pone en el fondo unos papeles filtro humedecidos con agua -- para evitar en esta forma la resequedad de las placas que contienen el medio.

(i) La primera lectura se hace a las 24 horas.- Se siguen haciendo las lecturas cada 12 horas hasta que aparezca -- la reacción. Se considera negativa si después de 96 horas no aparecen las bandas blanquecinas de precipitación que nos indica la reacción positiva.



PRUEBA DE AGLUTINACION EN TUBO CAPILAR  
REACCION POSITIVA.



EQUIPO DE INMUNODIFUSION.



COLOCACION DEL ANTIGENO  
Y ANTICUERPO.



PLACA DE IMMUNODIFUSION TERMINADA.

**III.- RESULTADOS:**

Los resultados obtenidos en el presente trabajo están en relación al título de anticuerpos alcanzado en cada uno de los casos y a las diluciones en que el antígeno se usó.

SUEROS SANGUINEOS DE LECHONES.

No.	EDAD DIAS	FROTIS SANGUINEO	ATC	INMUNODIFUSION	DILUSION	ECTOPARASITOS
1	8	Positivo	Positivo			Positivo
2	8	Positivo	Positivo			Positivo
3	8	Positivo	Positivo			Positivo
4	15	Positivo	Positivo			Negativo
5	15	Positivo	Positivo			Negativo
6	15	Positivo	Positivo			Negativo
7	18	Positivo	Positivo			Negativo
8	18	Positivo	Positivo			Negativo
9	42	Positivo	Positivo			Positivo
10	42	Positivo	Positivo	Negativo	1:45	Positivo
11	42	Positivo	Positivo	Negativo	1:45	Positivo
12	50	Positivo	Negativo			Positivo
13	50	Positivo	Negativo			Positivo
14	22	Positivo	Positivo			Positivo
15	28	Positivo	Positivo			Positivo
16	24	Positivo	Positivo			Positivo
17	44	Positivo	Negativo			Negativo
18	33	Positiv	Positivo			Positivo
19	33	Positivo	Positivo			Positivo
20	21	Positivo	Positivo			Positivo
21	21	Positivo	Positivo			Positivo
22	21	Positivo	Positivo			Positivo
23	36	Positivo	Positivo			Positivo
24	36	Positivo	Positivo			Positivo

79

SUEROS SANGUINEOS DE LECHONES.

No.	EDAD DIAS	FROTTIS SANGUINEO	ATC	INMUNODIFUSION	DILUSION	ECTOPARASITOS
25	36	Positivo	Positivo			Positivo
26	44	Positivo	Negativo			Negativo
27	44	Positivo	Negativo			Negativo
28	38	Positivo	Positivo			Negativo
29	38	Positivo	Negativo			Negativo
30	45	Positivo	Positivo	Positivo	1:30	Positivo
31	45	Positivo	Positivo	Positivo	1:30	Positivo
32	37	Positivo	Positivo	Negativo	1:45	Positivo
33	37	Positivo	Positivo	Positivo	1:30	Positivo
34	49	Positivo	Negativo			Negativo
35	49	Positivo	Negativo			Negativo
36	44	Positivo	Positivo			Positivo
37	44	Positivo	Positivo	Positivo	1:30	Positivo
38	44	Positivo	Positivo	Positivo	1:30	Positivo
39	44	Positivo	Positivo			Positivo
40	44	Positivo	Positivo			Positivo
41	37	Positivo	Negativo			Negativo
42	37	Positivo	Positivo			Negativo
43	50	Positivo	Positivo	Positivo	1:30	Positivo
44	50	Positivo	Positivo			Positivo
45	30	Positivo	Negativo			Positivo
46	30	Positivo	Positivo			Positivo
47	15	Positivo	Positivo	Negativo	1:45	Positivo

CUADRO No. 1  
SUEROS SANGUINEOS DE LECHONES.

No.	EDAD DIAS	FROTIS SANGUINEO	ATC	INMUNODIFUSION	DILUSION	ECTOPARASITOS
48	75	Positivo	Positivo	Positivo	1:30	Positivo
49	48	Positivo	Positivo	Positivo	1:30	Positivo
50	45	Positivo	Negativo			Positivo
Totales		50	39	9		36

CUADRO No. 2  
PORCENTAJE DE RELACION.

TOTAL DE ANIMALES	FROTIS SANGUINEO	ATC	INMUNODIFUSION	ECTOPARASITOS
50	100%	78%	60%	72%



CUADRO No. 3  
 SUEROS SANGUINEOS DE BOVINOS.

No.	EDAD MESES	FROTIS SANGUINEO	ATC	INMUNODIFUSION	DILUSION	ECTOPARASITOS
1	24	Positivo	Positivo	Negativo	1:45	Positivo
2	24	Positivo	Positivo	Negativo	1:45	Positivo
3	10	Positivo	Positivo	Positivo	1:30	Positivo
4	9	Positivo	Positivo	Positivo	1:30	Positivo
5	6	Positivo	Positivo	Positivo	1:30	Positivo
6	6	Positivo	Positivo	Positivo	1:30	Positivo
7	3	Positivo	Positivo	Positivo	1:30	Positivo
8	3	Positivo	Positivo	Positivo	1:30	Positivo
8		8	8	6		8
Totales:						

=10=

CUADRO NO. 4  
 PORCENTAJE DE RELACION.

TOTAL DE ANIMALES	FROTIS SANGUINEO	ATC	INMUNODIFUSION	ECTOPARASITOS
8	100%	100%	75%	100%

Los sueros cuyo grado de positividad fué mayor en la prueba de aglutinación en tubo capilar, se seleccionaron para llevar a cabo la inmunodifusión.

Las observaciones hechas en las diferentes situaciones en que se colocaron, antígeno y anticuerpo, nos indicaron -- que en aquellas donde predominaban las deprecaciones llenas con anticuerpos, las bandas de precipitación eran más claras, así como también la difusión del antígeno fué mejor en la proporción de 1:30, y que los usados en la proporción de 1:45 las bandas de precipitación no aparecieron.

En los casos en que se observó la aparición de dos bandas, se dieron por positivos. Aquellos en los que apareció una banda se deshecharon dándose por negativos.

En los casos trabajados con sueros de bovinos se dieron por positivos los casos en los que aparecieron tres bandas de precipitación.

#### IV. - DISCUSSION.

Tanto *Eperythrozoon* como *Anaplasma*, son parásitos sanguíneos muy parecidos en muchas de sus particularidades. Estos dos microorganismos producen en los animales que parasitan, -- dos signos predominantes, como lo son: la anemia y la ictericia, siendo generalmente evidente la infección por un corto período para posteriormente hacerse latente.

Las transmisiones producidas en vías de experimentación -- por inoculación a los animales susceptibles, de sangre infectada, ocurren rápidamente y son vistas con igual frecuencia, tanto en los eritrocitos como libres en el plasma, a diferencia de otro parásito muy similar a ambos, como lo es *Haemobartonella* que no se encuentra en plasma. La forma más común de observar los *eperythrozoones* y los *anaplasmas*, es en el margen de los eritrocitos parasitados. (11)

*Eperythrozoon* y *Anaplasma* cuando son tratados con tinciones de Romanovsky, no se les observa ninguna diferencia dentro de su núcleo y citoplasma. La medida de su diámetro es aproximadamente la misma (*E. suis* 0.8 micras y *A. marginale* 0.3-1 micras), siendo en ocasiones un poco más grande *E. suis*. La forma más común es redondeada, aunque se pueden encontrar en ocasiones tanto en una como en otra formas de varilla y cuando éstas están presentes, son cortas y no dispuestas en cadena. (11)

Al microscopio aparecen los corpúsculos de *Eperythrozoon* sobre los eritrocitos y libres en el plasma (Splitter y Willian son 1950), conteniendo más cromatina que otras especies de este género (Ristic) (1953) en forma anular de 0.8 micras de diámetro siendo ésta la forma principal, sin embargo, al momento de un ataque parasitario, puede aparecer un gran anillo de forma discoidal de 12.5 micras de diámetro. Estos anillos pueden ser desfigurados y la cromatina aparecer irregularmente distribuida alrededor del anillo; las formas discoidales pueden ser vistas como platos sólidos con masas de cromatina. Cocos, va-

rillas y otras varias formas también son vistas, debiéndose estos cambios rápidos en su forma, por la adición a la sangre de citrato u oxalato, predominando en estas muestras sanguíneas las formas de cocos y varillas. Su coloración es muy oscura.

Los animales esplenectomizados experimentalmente que parasitan uno y otro, son muy susceptibles a la infección. Los cultivos *In vitro* no se han podido llevar a cabo hasta ahora en ninguno de estos dos parásitos.

Ristic (11), encontró en sus investigaciones, que algunos animales pueden tener infecciones subclínicas con *Eperythrozoon* o *Haemobartonella*, los cuales interfieren con el desarrollo de la enanplasmosis.

Kreier y Ristic en 1963 y posteriormente Small y Ristic en 1967, realizaron exhaustivos estudios en la morfología de los corpúsculos de *Anaplasma*, *Eperythrozoon* y *Haemobartonella*, encontrando en sus investigaciones que estos tres organismos parecen estar estructuralmente muy relacionados, por lo que en algunos casos resulta dificultosa y en ocasiones hasta arbitraria la diferenciación entre ellos. (11)

Splitter en 1958, por la técnica de fijación de complemento usando antígeno de *Anaplasma marginale* y suero obtenido de animales infectados con *Eperythrozoon suis*, encontró reacciones positivas en cerdos clínicamente enfermos, resultando esta prueba negativa para detectar infecciones subclínicas (12). Sin embargo, el mismo autor en sus estudios sobre la relación antigénica entre *Eperythrozoon suis* y *Eperythrozoon parvum*, produjo un antígeno de eritrocitos lisados de cerdos afectados con estos dos parásitos y haciéndolos reaccionar con sueros de cerdos infectados, no encontró reacciones positivas, indicando con esto que entre *Eperythrozoon suis* y *Eperythrozoon parvum* no existe reacción serológica cruzada.

La identificación de anticuerpos para *A. marginale* por el método de aglutinación en tubo capilar, fué introducido por Ristic en el año de 1963; prueba que ahora utilizamos en el presente estudio para la detección de anticuerpos -

de S. suis usando antígeno de A. marginale.

Hace 24 años, la Swedish Biologist Orjan Gunderberg, ideó un experimento muy simple para investigar la inmunidad biológica, el cual consiste en hacer difundir a través de una placa de gelatina de agar, el antígeno y el anticuerpo, los que al reaccionar en una zona intermedia de sus puntos de partida forman una delgada media luna blanca, indicándonos esto que se llevó a cabo la neutralización química del antígeno por el anticuerpo. (6) Esta técnica también la usamos en este -- trabajo, seleccionando los sueros cuyo grado de positividad -- fué mayor en la prueba de aglutinación en un tubo capilar para hacerlos reaccionar con antígeno de A. marginale diluido en solución salina en proporciones de 1:30 y 1:45, con el objeto de que su difusión a través del gel fuera más fácil. -- Observándose que los sueros trabajados en inmunodifusión a la dilución de 1:45 no dieron ninguna reacción positiva.

El grado de positividad en cada caso, está en relación -- al nivel de anticuerpos alcanzado y a la dilución empleada, -- así como también al número de vectores biológicos encontrados en cada lechón Haemaphysalis suis.

Por lo que como podemos observar en la tabla No. 1, existen -- casos en los que siendo positivos a frotis sanguíneo, no lo son ni a aglutinación en tubo capilar ni a la inmunodifusión, haciéndonos pensar que posiblemente en estos casos se haya conservado Eperythrozoon parvum, o el nivel de anticuerpos haya sido muy bajo.

Es de considerar, que la transmisión de la Eperythrozoonosis no es únicamente a través de vectores biológicos, sino también por medio de vectores físicos, por lo que en la tabla No. 1 y en la tabla No. 2, se aprecia una cierta desproporción en cuanto a la positividad en frotis sanguíneo y aglutinación en tubo capilar, en relación con la columna hospederos.

V. - CONCLUSION.

1. - Tanto el Eperythrozoon suis como Anaplasma marginale son similares en su morfología.

2. - Ristic (11), en sus publicaciones sugiere sobre las bases de sus características biológicas, que los tres organismos (Eperythrozoon, Anaplasma y Haemobartonella), se agrupen en uno solo como lo sería en el orden de las Rickettsiales.

3. - Conforme a los resultados obtenidos existen dos antígenos de Anaplasma marginale que son similares a Eperythrozoon suis.

4. - Existe una gran relación entre el vector biológico (Haematopinus suis) y la presencia de Eperythrozoon.

VI.- SUMARIO.

La selección de animales clínicamente enfermos de ocho a cincuenta días de edad, en las granjas situadas en los alrededores de la ciudad de Guadalajara y con problemas de parasitosis externa, en la gran mayoría de los casos.

El sangrado de los animales.

Frotis sanguíneo coloreado para comprobar la presencia de corpúsculos de Eperythrozoon suis.

La separación del suero sanguíneo a las muestras de sangre positivas a Eperythrozoon suis.

La detección de anticuerpos en lechones por el método de aglutinación en tubo capilar, usando antígeno de Anaplasma marginale.

La detección de anticuerpos por el método de inmunodifusión de Eperythrozoon suis, usando antígeno de Anaplasma marginale, únicamente en aquellos casos en que la positividad fué mayor en la prueba de aglutinación en tubo capilar.

Eperythrozoon suis y Anaplasma marginale son similares a los de Eperythrozoon suis.

El número de vectores biológicos está en relación directa a la presencia de Eperythrozoonosis.

La transmisión de la Eperythrozoonosis también es a través de vectores físicos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. E. J. L. Soulsby. HELMINTHS, ARTHROPODS OF DOMESTIC ANIMALS. 6a. Edición 1968. Pags. 733-735.
- 2.-1. A. Marchant, R. de Pecker, Acróbica. PARASITOLOGIA Y VIROLOGIA VETERINARIA. 6a. Edición Pags. 735.
- 3.- D. C. Blood y J. A. Manderson. Interamericana. MEDICINA VETERINARIA. 3a. Edición 1954. Pag. 532.
- 4.- W. W. Arnold, J. A. Manderson, T. L. Jones, J. W. Mc Loan, G. B. Scoble. Board. THE MERCK VETERINARY MANUAL - 3a. Edición 1967. Pags. 340-341.
- 5.- Joseph Walter P. H. D. CAPILLARY TUBE AGGLUTINATION IN THE CONTROL OF ANAPLASMOSIS. RESEARCH DEPARTMENT DIXOND LAB. Pags. 79-83.
- 6.- C. L. Strong. SCIENTIFIC AMERICAN. 1969. Pags. 248-253.
- 7.- J. F. Smithers, E. J. Catcott. PROGRESS IN SWINE -- PRACTICE. 1a. Edición 1966.
- 8.- C. L. Vickers D. V. M. VET. MED. 55:37-40. 1960 --- Columbia South Carolina.
- 9.- Winter. SOUTHWESTERN VET. 1960. 13:150-151.
- 10.- H. D. Anthony D. V. M., M. S. ; D. C. Kelley, D. L. Nelson D. V. M. y W. J. Twiehaus D. V. M. VETERINARY MEDICINE Kansas State University. 1962. 58:702-703.
- 11.- Miodrag Ristic; David Weinman. INFECTIOUS BLOOD -- DISEASES OF MAN AND ANIMALS. Academic Press. 1968. Pags. 114-115.
- 12.- Ruy Pérez Tamayo, Carlos Larralde, Roberto R. -- Kretschmer IMMUNOPATOLOGIA. Prensa Médica Mexicana. 1963. - Pags. 16-161.
- 13.- Ristic M. AGGLUTINATION TEST FOR ANAPLASMOSIS. - J. A. V. M. A. 141. Pags. 385-394, 504-508. 1962.
- 14.- Broadly G. A. and Jungher. E. E. Ristic. ANAPLASMOSIS Academic Press. N. Y. U. S. A. Vol. 6. 1966.



15.- *Plan Lerma Asistencia Técnica. OPERACION DE 5 AÑOS DEL LABORATORIO DE PATOLOGÍA DE TLAQUEPAQUE, Jal. 1955-1959. Pags. 15-A-17, 19-A.*

16.- *Incidencia de anticuerpos contra Anaplasmas en animales clínicamente sanos. En algunas zonas de Nayarit y Jalisco. Tesis Dr. José Ibarra Arias.*