

겨울철에 발생한 Holstein 송아지의 *Anaplasma marginale* 감염

이주목 · 권오덕 · 송희종 · 박진호 · 최경성

전북대학교 수의과대학
(1997년 9월 7일 접수)

Anaplasma marginale infection in Holstein calves during winter

Joo-mook Lee, Oh-deog Kwon, Hee-jong Song, Jin-ho Park, Kyoung-seong Choi

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

(Received Sep 7, 1997)

Abstracts : We observed an outbreak of calf anaplasmosis at a farm in Chonbuk area during winter season, which was diagnosed by the hematological and serological tests. The results are as follow.

On hematological observation for infected thirteen calves (ages 1 to 25 days) showed anemia with hematocrit $27.7 \pm 7.7\%$, erythrocyte $6.9 \pm 1.9 \times 10^6/\mu\text{l}$, hemoglobin $11.3 \pm 3.2 \text{ g/dl}$, MCV 40.6 $\pm 1.5\text{fl}$, MCH $16.3 \pm 1.6\text{pg}$ and MCHC $40.5 \pm 3.6\text{g/dl}$.

Anaplasma marginale was observed in all of the calves's erythrocytes by Diff-Quick and acridine orange staining, and were reacted by ELISA.

key word : calves, *Anaplasma marginale* , winter season.

서 론

Anaplasmosis는 rickettsia속인 *Anaplasma* sp에 기인하는 주혈원충성 질병으로서 소를 비롯하여 양, 산양, 사슴, 야생반추수 등에 감염되며, 진드기에 의한 매개 뿐만 아니라 기계적 전파 및 태반감염에 의해서도 전파되고 우리나라를 비롯하여 남아프리카, 오스트리아, 아시아, 러시아, 미국 등 전세계적으로 발생하고 있다^{1~9}.

소에서 anaplasmosis를 일으키는 원인체로서는 *A-*

naplasama marginale , *A centrale* 등이 알려져 있으나 이 중 *A marginale* 이 병원성이 강한 것으로 보고되고 있다^{9, 11, 18}. Anaplasmosis는 모든 연령의 소에 감염될 수 있으나 나이가 많을수록 폐사율이 증가하여 3세 이상의 연령에서는 급성형이 유발되는 반면, 6개월령 이하의 송아지는 감수성은 있으나 모우의 초유를 통해 받은 항체로 인해 저항성을 나타내어 임상증상을 나타내는 경우는 드물다고 알려져 있다^{4, 6, 8, 19}.

Anaplasmosis는 발열, 빈혈 등의 임상증상을 나타내며, 만성형에 있어서는 다른 질병에 대한 감수성이 증가하

고 영양부족이나 환경변화 등과 같은 stress가 가해질 경우는 급성 증상을 나타내어 폐사할 수도 있다고 알려져 있다^{6,8,17}.

국내에서 *Anaplasma* sp에 대한 연구로는 분포조사, 미세구조, 항원성 등에 관한 연구보고는 있으나²⁰⁻²⁴ 송아지에 대한 발생이나 연구보고는 찾아보기 힘든 실정이다.

저자 등은 최근 전라북도내 한 목장에서 생후 1개월령 전후의 Holstein 송아지 13두가 겨울철에 원인불명으로 계속 폐사되었던 바 그 원인을 규명하기 위하여 동일농장에서 사육중인 생존한 생후 1일~25일령의 송아지 13두를 대상으로 혈액학적 및 혈청학적 검사를 실시하였다. 바 대부분이 빈혈증상과 더불어 *A marginale*에 감염되어 있음을 확인할 수 있었다. 이와같이 종전의 보고 예와는 달리 겨울철의 어린송아지에서 anaplasmosis가 발생하였다는 점이 특이하여 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

발증목장 : Holstein 품종 60여두를 사육하는 전라북도내의 한 목장에서 1996년 12월부터 1997년 1월사이에 생후 1개월령을 전후한 13두의 송아지가 뚜렷한 증상없이 폐사하였다. 그 원인을 규명하고자 동일농장에 생존하여 있는 나머지 생후 1일~25일령의 송아지 13두의 경경 맥에서 혈액을 채취하여 혈액학적 및 혈청학적 검사를 실시하였다. 한편 다른 목장에서 사육중인 동일연령의 건강한 Holstein 송아지 6두를 대조군으로 사용하였다.

일반혈액검사 : 적혈구수, hemoglobin량, hematocrit치, 백혈구수 및 혈소판수는 자동혈액분석기(MINOS-VET, Japan)를 이용하여 검사하였으며, 혈장 설포소량은 Miller법²⁶에 준하여 측정하였다. 혈청단백량은 혈청화학자동분석기(SPOT-CHEM, Japan)를 이용하여 측정하였다. 또한 혈액을 도말하여 Diff-Quick 용액으로 염색한 후 백혈구감별계산 및 *A marginale*의 감염여부를 검사하였다.

Acridine orange 염색 : Acridine orange 염색은 Gainier²⁷ 및 Kong과 Chung²⁸의 방법에 준하여 실시하였다. 먼저 혈액을 도말한 후 methanol로 10분간 고정하고 0.1% acridine orange(Sigma Co) 용액에 30초간 염색한 다음 형광현미경(Nikon Co)을 이용하여 *A marginale*의 감염여부를 검사하였다.

혈청학적 검사 : ELISA법을 이용하여 혈청내 *A mar-*

*ginale*에 대한 항체가를 측정하였다. 감염혈액으로부터 백혈구를 제거한 다음 nitrogen cationization method로 적혈구를 용혈시켜 초원심분리하여 침전물을 ultrasonication한 후 Triton X-100으로 희석하여 positive 항원으로 사용하였다. 또한 야외 감염우의 혈청을 screening 하여 항체가가 가장 높게 나오는 것을 positive 항체로 사용하였다. 감염동물의 항체가 측정은 Thoen²⁹과 Nakamura et al³⁰의 방법에 준하여 실시하였다. 항원을 96 well microplate에 coating한 후 3% non-fat dried milk(M-7409, Sigma)를 분주하여 incubation을 하였다. 여기에 시료 혈청을 PBS/Tween 20으로 희석하여 분주한 후 affinity purified antibody peroxidase-labeled goat anti-bovine IgG conjugate(14-12-02, Kirkegaard & Perry Lab, Inc)를 재분주하여 30분간 incubation 하였다. 그리고 ELISA reader(KC3, Bio-Tek Ins, Inc)를 이용하여 405nm에서 항체가를 측정하였다.

치료 : 송아지의 말초혈액내에서 *Anaplasma* 총체를 확인한 후 Roby et al³¹ 및 Magonigle과 Newby³²의 방법에 준하여 tetracycline(20mg/kg)으로 치료를 실시하였다. 치료 후 2주 간격으로 재혈하여 혈액검사를 실시하였다.

결 과

혈액검사 : 감염 송아지군의 혈액학적 소견은 Table 1에 표시한 바와 같이 대조군의 송아지(Table 2)에 비해 대부분이 빈혈소견을 나타내었다. 즉, 적혈구수; $6.9 \pm 1.9 \times 10^6/\mu\text{l}$, hematocrit치; $27.7 \pm 7.7\%$ 는 각각 대조군의 $9.2 \pm 1.1 \times 10^6/\mu\text{l}$ 와 $35.2 \pm 3.1\%$ 에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다($p < 0.05$). MCV; $40.6 \pm 1.5\text{fl}$, MCH; $16.3 \pm 1.6\text{pg}$, MCHC; $40.5 \pm 3.6\text{g/dl}$ 는 대조군의 MCV; $38.1 \pm 1.9\text{fl}$, MCH; $12.2 \pm 0.6\text{pg}$, MCHC; $34 \pm 3\text{g/dl}$ 에 비하여 유의성 있는 증가를 나타내었다($p < 0.01$). 그러나 혈청단백량; $6.0 \pm 0.7\text{g/dl}$, hemoglobin; $11.3 \pm 3.2\text{g/dl}$, 백혈구; $12.1 \pm 6.2 \times 10^3/\mu\text{l}$, 혈소판수; $514 \pm 216 \times 10^3/\mu\text{l}$, mean platelet volume; $4.4 \pm 0.1\text{fl}$ 은 각각 대조군의 혈청단백량; $6.4 \pm 0.3\text{g/dl}$, hemoglobin; $11.5 \pm 1.2\text{g/dl}$, 백혈구; $11.1 \pm 3.9 \times 10^3/\mu\text{l}$, 혈소판수; $462 \pm 108 \times 10^3/\mu\text{l}$, mean platelet volume; $4.6 \pm 0.2\text{fl}$ 과 비교하여 유의성 있는 변화는 인정되지 않았다.

적혈구내 *A marginale* 확인 : 혈액을 도말하여 Diff-Quick 염색과 acridine orange 염색으로 검사한 결과 모든 송아지에서 *A marginale*를 확인할 수 있었다(Fig 1, Fig 2).

Table 1. Hematological values of *A marginale* infected calves

Item	No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Days		20	25	10	10	5	7	15	15	7	20	6	4	1
RBC($\times 10^6/\mu\text{l}$)		8.3	7.6	5.4	10.1	7.9	5.8	5.2	8.9	4.2	9.5	4.8	6.5	5.2
Hb(g/dl)		13.5	13.2	8.8	17.2	12.4	11.8	7.2	14	6.4	14.6	8.2	10.9	8.8
Ht(%)		32	29	22	41	33	24	21	36	17	38	19	26	22
MCV(fл)		39	38	41	41	42	42	40	40	41	40	40	40	44
MCH(pg)		16	17	16	17	15	20	14	16	15	15	17	16	17
MCHC(g/dl)		41	45	40	41	37	48	35	39	37	38	43	42	39
S.P.(g/dl)		6	5.8	7.4	5.4	6.2	5.6	5.5	6.8	5.6	4.8	7.1	6.8	5.4
PLT($\times 10^3/\mu\text{l}$)		519	287	939	319	391	590	751	361	881	468	471	354	358
MPV(fл)		4.3	4.2	4.5	4.6	4.2	4.5	4.2	4.3	4.4	4.6	4.8	4.4	4.3
WBC($\times 10^3/\mu\text{l}$)		7.1	19.3	12.1	12.6	8.6	29.1	7.6	15.4	8.1	7.4	19.2	26.0	22.6
D.C. (%)														
Neutro		16	58	25	21	29	59	35	37	32	28	20	40	69
segm		15	53	22	29	22	50	31	36	30	27	15	33	67
band		1	5	3	2	7	9	4	1	2	1	5	7	2
Eosine		1	2	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	1
Lympn		80	39	71	78	68	38	63	59	67	71	69	49	24
Mono		4	1	4	2	2	4	2	3	1	1	9	11	5

Table 2. Hematological values of noninfected calves

Item	No.	1	2	3	4	5	6
Days		20	25	20	24	21	15
RBC($\times 10^6/\mu\text{l}$)		9.3	11.3	8.7	9.3	8.7	8.1
Hb(g/dl)		12.0	13.4	10.1	12.0	11.2	10.3
Ht(%)		37	40	32	36	34	33
MCV(fл)		39	35	37	38	40	40
MCH(pg)		13	12	12	13	13	12
MCHC(g/dl)		33	33	32	34	33	34
S.P.(g/dl)		6.5	6.1	6.0	6.7	6.6	6.8
PLT($\times 10^3/\mu\text{l}$)		425	365	482	413	420	671
MPV(fл)		4.6	4.4	4.4	4.4	4.6	5.0
WBC($\times 10^3/\mu\text{l}$)		12.9	16.2	9.6	8.1	5.8	14.4
D.C. (%)							
Neutro		12	39	19	15	16	28
segm		11	37	19	15	15	27
band		1	2	-	-	1	1
Eosino		4	4	1	3	2	1
Lympn		84	57	78	80	81	69
Mono		-	-	2	2	1	2



Fig 1. *A marginale* in erythrocytes of calves(Diff-Quick stain $\times 1,000$).



Fig 2. *A marginale* in erythrocytes of calves(Acridine orange stain $\times 1,000$).

Table 3. Antibody titer in serum of calves against *A marginale* by ELISA

No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
O.D.*	0.51	0.52	0.49	0.26	0.38	0.41	0.59	0.29	0.49	0.31	0.56	0.51	0.47

* Optical Density.

Table 4. Changes of hematological values of calves after treated with tetracycline(20mg/kg)

	Tetracycline treatment		
	Before	After	
		15 days	30 days
RBC($\times 10^6/\mu\text{l}$)	6.9 \pm 1.9*	8.0 \pm 1.1	8.8 \pm 1.8
Hb(g/dl)	11.3 \pm 3.2	11.9 \pm 1.8	11.3 \pm 3.1
Ht(%)	27.7 \pm 7.7	29.5 \pm 4.4	33.4 \pm 8.1
MCV(U ³)	40.6 \pm 1.5	36.8 \pm 1.9	37.5 \pm 3.0
MCH(pg)	16.3 \pm 1.6	14.9 \pm 2.1	12.8 \pm 1.6
MCHC(g/dl)	40.5 \pm 3.6	40.3 \pm 4.1	33.5 \pm 1.8
S.P.(g/dl)	6.0 \pm 0.7	6.0 \pm 0.8	5.8 \pm 0.6
Fib.(mg/dl)	1654 \pm 781	1419 \pm 614	1156 \pm 394
PLT($\times 10^3/\mu\text{l}$)	514 \pm 216	579 \pm 148	546 \pm 199
MPV(U ³)	4.4 \pm 0.1	4.3 \pm 0.2	4.4 \pm 0.3
WBC($\times 10^3/\mu\text{l}$)	12.1 \pm 6.2	15.3 \pm 10.7	9.5 \pm 2.5

* Mean \pm SD.

혈청학적 검사 : ELISA 방법을 이용하여 송아지의 혈청내 *A marginale*에 대한 항체가를 측정한 결과 optical density(O.D.)값은 Table 3에 표시된 바와 같다.

치료결과 : Tetracycline으로 치료한 후 2주간격으로 혈액검사를 실시한 결과 Table 4에 표시한 바와 같이 적혈구수, hematocrit치, hemoglobin량은 증가경향을, MCV, MCH 및 MCHC는 감소경향을 나타내어 빈혈이 호전되는 것을 확인할 수 있었다.

고 칠

Rickettsia성 전염병인 anaplasmosis는 진드기와 흡혈성 파리, 모기 등에 의하여 매개되거나 태반을 통해 감염되어 용혈성 빈혈을 일으키는 것으로 알려져 있다^{10,12,13,16}. 이 목장에서의 발병은 매개곤충이 활동하지 못하는 겨울철이며, 외부기생충의 기생을 발견할 수 없었던 점, 용혈성 빈혈을 일으킬 수 있는 기타 요인이 존재하지 않는 점, 어미소의 혈액에서 충체를 검출할 수 있었던 점 그리고 생후 1일령의 송아지에서 *Anaplasma organism*을 검출할 수 있었던 점 등으로 미루어 보아, 본 예의 경우는 태반감염에 의한 것으로 추측된다.

신생자축은 *Anaplasma sp*에 대한 감수성은 있으나 이에 대한 항체생성능 및 초유를 통한 수동면역의 결과로 감염에 대한 저항성을 가지기 때문에 임상증상을 나타내지는 않는다고 알려져 있다. 그러나 이러한 모체이행

항체가 빈혈 등의 발증을 자연시킬 수는 있지만 송아지의 *A marginale* 감염을 완전히 방어하지는 못한다고 보고하고 있다⁴. 실제로 임신중기 및 말기에 *Anaplasma sp*를 감염시키면 출생한 송아지에서 CF 및 RCA 양성반응이 나타나며^{5,7}, 태반감염된 송아지는 11주령 이상의 혈청에서도 모체이행 항체가 검출되나 경미한 anaplasmosis의 증상이 나타난다고 하였다^{4,32}. Anaplasmosis로 인한 빈혈의 발생기전은 적혈구내의 충체감염율이 증가함에 따라 감염적혈구 및 비감염적혈구에 대한 세망세포계의 탐식작용, 충체 및 적혈구에 대한 항체가 생성되어 빈혈을 유발한다고 하였다^{10,12,13,16,33-35}. 본 혈액검사와 EL-ISA 검사결과의 경우, 빈혈소견과 함께 높은 O.D.값을 나타내었다. 더우기 6두(각각 생후 1일~15일령)의 송아지에서는 높은 O.D.값과 함께 심한 빈혈(No. 3, 7, 9, 11, 12, 13)소견을 나타내었다. 대조군 송아지의 혈액검사결과와 비교하여 T-검정을 실시한 결과 MCV, MCH 그리고 MCHC는 99% 이상의 유의성이, 적혈구수와 hematocrit치는 95% 이상의 유의성이 인정되었다. 또한 모든 송아지의 적혈구내 감염율은 비교적 유사하게 낮은 편(PPE<0.5%)이었으나 빈혈의 정도는 개체마다 상당한 차이(Ht: 17.3~41.4%, Hb: 6.4~17.2g/dl, RBC: 4.24~10.24/ μl)를 나타내었다. 이러한 결과는 *Anaplasma sp*에 감염된 송아지의 감염율 및 모체이행 항체, 세망세포계의 탐식작용, 이로 인한 빈혈의 정도, 기타 질병에의 감수성, 폐사 등의 관계에 대한 세부적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

*Anaplasmosis*의 치료에는 long-acting(LA) tetracycline을 주사하거나 imidocarb와 LA tetracycline을 병용하면 효과적이라고 하였으나 이러한 치료에도 *Anaplasma sp*를 완전히 제거하기는 힘들다고 하였다^{31,32,35,36}. 또한 tetracycline으로 치료한 후에는 *Anaplasma sp*의 모양이 vacuole 모양이나 부정형으로 변형된다고 보고하였다³⁸. 본 발생예에서도 tetracycline으로 치료한 후 2주간격으로 혈액검사를 실시한 결과 빈혈의 정도는 개선되었으나 *A. anaplasma sp*를 혈액내에서 완전히 제거하지는 못하였다. 또한 Simpson³⁸의 보고에서와 같이 치료후에 *Anaplasma sp*의 모양이 변형되는 경향을 나타내었으나 뚜렷한 것은 아니었다.

본 목장에서 1996년 12월부터 2개월여 동안 생후 1개월령 전후의 송아지 13두가 폐사하였지만 이에 관한 정확한 폐사원인은 알 수가 없다. 그러나 살아있는 송아지

를 대상으로 혈액검사를 실시한 결과, *A marginale*의 감염을 확인하고 tetracycline으로 치료한 후에는 1개월 이상 동안 더이상 폐사하지 않은 점으로 미루어 보아 anaplasmosis가 송아지의 폐사의 일부 원인으로써 작용한 것으로 추측된다. 따라서 송아지의 anaplasmosis, 특히 *A marginale*의 감염시에 겨울철의 심한 온도하강과 같은 stress가 질병의 발생에 미치는 영향에 관한 세부적인 연구가 수행되어져야만 할 것으로 생각된다.

결 론

전라북도내 한 목장에서 1개월령 전후의 송아지 13두가 식욕부진, 기립불능 등의 증상을 나타내며 겨울철에 원인불명으로 계속 폐사되었던 바, 그 원인을 규명하기 위해 생존한 송아지 13두(1일~25일령)의 혈액학적 및 혈청학적 검사를 실시하였던 바, 다음과 같은 결과를 얻었다.

혈액검사에서는 대부분의 송아지에서 빈혈소견을 나타내었다. 즉, hematocrit; $27.7 \pm 7.7\%$ ($p<0.05$), erythrocyte; $6.9 \pm 1.9 \times 10^6/\mu l$ ($p<0.05$), hemoglobin; $11.3 \pm 3.2 g/dl$, MCV; $40.6 \pm 1.5 fl$ ($p<0.01$), MCH; $16.3 \pm 1.6 pg$ ($p<0.01$), MCHC; $40.5 \pm 3.6 g/dl$ ($p<0.01$)로서 대조군에 비하여 유의성 있는 변화를 나타내었다.

혈액도말표본을 Diff-Quick과 acridine orange 염색으로 검사한 결과, 모든 송아지의 적혈구내에서 *A marginale*를 확인할 수 있었으며 ELISA검사에서 대부분이 양성반응을 나타내었다.

참 고 문 헌

- McCallon BR. Anaplasmosis. *J Dairy Sci*, 59:1171-1174, 1976.
- Renshaw HW, Vaughn HW, Magonigle, et al. Evaluation of free roaming mule deer as carriers of anaplasmosis in an area of Idaho where bovine anaplasmosis is enzootic. *Am J Vet Res*, 170:334-339, 1977.
- Baumgartner W, Stoger J, Marktl W. Demonstration of the oral path of infection with *Anaplasma marginale* in calves. *Vet Rec*, 133:64-66, 1983.
- Zaugg JL, Kuttler KL. Bovine anaplasmosis: *In utero* transmission and the immunologic significance of ingested colostral antibodies. *Am J Vet Res*, 45:440-443, 1984.
- Zaugg JL. Bovine anaplasmosis: Transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *Am J Vet Res*, 46(3):570-572, 1985.
- Jain NC. Hemolytic anemias associated with some infectious agents. In: *Schalm's Veterinary Hematology*. 4th ed, Lea & Febiger, Philadelphia: 589-626, 1986.
- Zaugg JL. Ovine anaplasmosis: *In utero* transmission as it relates to stage of gestation. *Am J Vet Res*, 48: 100-103, 1987.
- Radostits OM, Blood DC, Gay CC. Anaplasmosis. In: *Veterinary Medicine*. 8th ed, Tindall, Bailliere:963-972, 1994.
- Jain NC. Hemolytic anemias associated with some infectious agents. In: *Essentials of Veterinary Hematology*. Lea & Febiger, Philadelphia:177-191, 1993.
- Julius PK, Miodary R, William S. The pathogenesis of anemia produced by infection with *Anaplasma*. *Am J Vet Res*, 25:343-352, 1964.
- Kuttler KL. Clinical and hematologic Comparision of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* infections in cattle. *Am J Vet Res*, 27:941-946, 1966.
- Jatkar PR, Kreiver JP. Relationship between severity of anemia and plasma erythropoietin titer in Anaplasma-infected calves and sheep. *Am J Vet Res*, 28: 107-113, 1967.
- Schroeder WF, Ristic M. Blood serum factors associated with erythrophagocytosis in calves with Anaplasmosis. *Am J Vet Res*, 29:1991-1995, 1968.
- Anderson IL, Jones EW, Morrison RD, et al. *Anaplasma marginale*: hemoglobin patterns in experimentally infected young calves. *Exp Parasitol*, 32: 265-271, 1972.
- Young MF, Kuttler KL, Adams LG. Experimentally induced anaplasmosis in neonatal isohemolytic anemia-recovered calves. *Am J Vet Res*, 38:1945-1947, 1977.
- Ristic M. An autoantibody and symptomatic macrocytic anemia. *Am J Vet Res*, 22:871-876, 1961.
- Lincoln SD, Zaugg JL, Maas J. Bovine anaplasmosis:

- Susceptibility of seronegative cows from an infected herd to experimental infection with *Anaplasma marginale*. *JAVMA*, 190:171-173, 1987.
18. Roby TO, Gates DW, Mott LO. The comparative susceptibility of calves and adult cattle to bovine anaplasmosis. *Am J Vet Res*, 27:941-946, 1966.
 19. Klaus GG, Jones EW. The immunoglobulin response in intact and splenectomized calves infected with *Anaplasma marginale*. *J Immunol*, 100:991-999, 1968.
 20. 전영, 한태우. 아나플라즈마병에 관한 혈청학적 분포조사. 농시보고, 12:57, 1969.
 21. 전영. 아나플라즈마병에 관한 연구. 대한수의학회지, 18:19-22, 1978.
 22. 서명득, 장두환. 도입우의 진드기매개 주혈원충 감염상과 *Theileria sergenti* 의 치료예방에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지, 6:33-57, 1982.
 23. 백병걸, 진찬문, 김병수 등. 한우에 있어서 *Anaplasma marginale* 의 항원성에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지, 13:233-239, 1989.
 24. 백병걸, 손구례. 산양의 anaplasmosis에 대한 역학적 조사 Ⅲ. 혈액치의 계절적 변화. 대한수의학회지, 35:137-142, 1995.
 25. 손제영, 이현범, 장인호. 경북지방 산양에 발생한 Anaplasmosis, 경북대학교 논문집 제9집. 99-109. 1965.
 26. Millar HR, Simpson JG, Stalker AL. An evaluation of the heat precipitation method for plasma fibrinogen estimation. *J Clin Pathol*, 24:827-830, 1971.
 27. Gainer JH. Demonstration of *Anaplasma marginale* with the fluorescent dye, acridine orange; comparisons with the complement-fixation test and wright's stain. *Am J Vet Res*, 22:882-886, 1961.
 28. Kong HH, Chung DI. Comparison of acridine orange and giemsa stains for malaria diagnosis. *Kor J Parasitol*, 33:391-394, 1995.
 29. Thoen CO. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in cattle in a herd in which anaplasmosis was diagnosed. *J Clin Microbiol*, 11:499, 1980.
 30. Nakamura Y, Shimizu S, Minami T. Enzyme-linked immunosorbent assay using solubilised antigen for detection of antibodies to *Anaplasma marginale*. *Trop Anim Health Prod*, 20:259-266, 1988.
 31. Roby TO, Simpson JE, Amerault TE. Elimination of the carrier state of bovine anaplasmosis with a long-acting oxytetracycline. *Am J Vet Res*, 39:1115-1116, 1978.
 32. Magonigle RA, Newby TJ. Elimination of naturally acquired chronic *Anaplasma marginale* infections with a long-acting oxytetracycline injectable. *Am J Vet Res*, 43:2170-2172, 1982.
 33. Trueblood MS, Swift BL, Bear PD. Bovine fetal response to *Anaplasma marginale*. *Am J Vet Res*, 32: 1089-1090, 1971.
 34. Genrald MB. Cell-mediated immune responses in calves with anaplasmosis. *Am J Vet Res*, 34:757-763, 1973.
 35. Schroeder WF, Ristic M. An analysis of autoantigens in infected and normal bovine erythrocytes. *Am J Vet Res*, 26:679-682, 1965.
 36. Kuttler KL. Dynamics of *Anaplasma marginale* in splenectomised calves treated with either imidocarb or oxytetracycline. *Trop Anim Health Prod*, 18:91-96, 1986.
 37. Wilson AJ, Parker R, Parker M, et al. Chemotherapy of acute bovine anaplasmosis. *Aust Vet J*, 55:71-73, 1979.
 38. Simpson CF. Morphologic alteration of *Anaplasma marginale* in calves after treatment with oxytetracycline. *Am J Vet Res*, 36:1443-1446, 1975.