

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DIAGNÓSTICO DE SITUACIÓN Y PLANES DE CONTROL DE TRISTEZA
PARASITARIA EN ESTABLECIMIENTOS COMERCIALES**

por

**ANDRÉS LUQUE, María Sol
LATEULADE DE LEÓN, Lucía**

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Estudio de caso

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2019**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Zully Hernández

Segundo miembro (Tutor):

Eleonor Castro

Tercer miembro:

José M. Venzal

Cuarto miembro (Co-tutor):

Cecilia Miraballes

Quinto miembro (Co-tutor):

Stephanie Lara

Fecha:

5 de abril de 2019

Autores:

María Sol Andrés Luque

Lucía Lateulade de León

AGRADECIMIENTOS

- A Cecilia Miraballes y Stephanie Lara por su paciencia, comprensión, conocimientos y tiempo dedicado.
- A Eleonor Castro por aceptar formar parte de nuestra tesis, guiarnos y acompañarnos en este tiempo.
- A INIA y DILAVE Tacuarembó por abrirnos sus puertas para llevar a cabo nuestro trabajo práctico.
- A Facultad de Veterinaria por los conocimientos, experiencias y amistades adquiridas.
- A nuestra familia y amigos por el apoyo incondicional y contención en todo momento a lo largo de nuestra carrera.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDO	4
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. <i>Rhipicephalus microplus</i>	10
2.2. Tristeza parasitaria	13
2.2.1. Generalidades.....	13
2.2.2. Babesiosis	14
2.2.3. Anaplasmosis.....	17
2.2.4. Diagnóstico de la tristeza parasitaria	19
2.2.5. Tratamiento.....	20
2.2.6. Profilaxis	20
2.2.7. Estabilidad o inestabilidad enzoótica a la tristeza parasitaria ..	22
2.3. Caracterización del problema	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo general.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1. Establecimientos	24
4.2. Análisis de riesgo de reintroducción de <i>R. microplus</i>	24
4.3. Resistencia de <i>R. microplus</i> a garrapaticidas	25
4.4. Técnicas serológicas.....	25
4.4.1. Aglutinación en tarjeta para el diagnóstico de anticuerpos contra <i>A. marginale</i> (Protocolo IICA 1987-DILAVE).....	25
4.4.2. Inmunofluorescencia indirecta para el detección de anticuerpos contra <i>B. bigemina</i> y <i>B. bovis</i> . (Protocolo IICA 1987-DILAVE).	26
4.5. Planes de control de tristeza parasitaria	28
5. RESULTADOS	28
5.1. Situación de tristeza parasitaria.....	31
5.2. Planes de control de tristeza parasitaria	32
6. DISCUSIÓN	35
7. CONCLUSIONES	38
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Resumen de las encuestas dirigidas a los productores y análisis de riesgo.....	29
Tabla 2. Grado de resistencia de las <i>Rhipicephalus microplus</i> a los diferentes garrapaticidas.....	30
Tabla 3. Serología de los establecimientos aplicada para diferentes categorías de animales.....	31
Tabla 4. Planes de control de tristeza parasitaria adaptados para cada establecimiento.....	34
Figura 1. Mapa del Uruguay delimitado por zonas libre y de control de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i>	10
Figura 2. Modelo conceptual de <i>Rhipicephalus microplus</i>	11
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Babesia bigemina</i> en el vacuno y en la garrapata.....	16
Figura 4. Vista microscópica de eritrocitos bovinos infectados con <i>Anaplasma marginale</i>	18
Figura 5. Esquema del ciclo de desarrollo de <i>Anaplasma marginale</i> en garrapatas y bovinos.....	19
Figura 6. Placas para aglutinación en tarjeta.....	26
Figura 7. Portaobjetos dividido en cuadrantes.....	27
Figura 8. Observación en microscopio de epifluorescencia.....	28
Figura 9. Frecuencia de estabilidad enzoótica para <i>Babesia bigemina</i> , <i>B. bovis</i> y <i>Anaplasma marginale</i> estratificados por categoría animal.....	32

RESUMEN

Las garrapatas y los agentes de enfermedades que transmite están ampliamente distribuidas en el mundo y producen pérdidas económicas importantes en la producción bovina. En Uruguay, la garrapata común del ganado *Rhipicephalus microplus* transmite los agentes responsables del complejo denominado tristeza parasitaria, que comprende dos enfermedades: babesiosis y anaplasmosis. El objetivo de este trabajo fue determinar la situación epidemiológica de la tristeza parasitaria en 16 establecimientos comerciales ubicados al norte del país y proponer alternativas para su control. Los establecimientos seleccionados presentaban infestación con *R. microplus* y antecedentes de muertes por hemoparásitos. Los mismos ya tenían datos sobre la sensibilidad toxicológica de la garrapata a los diferentes ixodicidas aprobados por la Campaña Sanitaria. Para los estudios seroinmunológicos se usó suero de terneros, sobreaño y adultos (n=402). El diagnóstico de estabilidad o inestabilidad enzoótica se realizó en base a las pruebas serológicas. Se usó la técnica de aglutinación en tarjeta para *A. marginale* e inmunofluorescencia indirecta para *Babesia* spp. El punto de corte para considerar cada establecimiento en inestabilidad fue entre 20% y 75% de muestras positivas. Los valores que quedaron por encima o por debajo de estas cifras se corresponden a situaciones de estabilidad enzoótica para tristeza parasitaria. Solamente un establecimiento presentó estabilidad enzoótica para las categorías muestreadas frente a los tres hemoparásitos en estudio. Sin embargo, el resto de los establecimientos fueron inestables para al menos un hemoparásito en una categoría. Los planes de control de tristeza parasitaria propuestos fueron el uso de la hemovacuna y medidas de bioseguridad para *A. marginale* en ciertos establecimientos. Para la mayoría de los establecimientos se sugirió el control de la garrapata teniendo en cuenta el tratamiento generacional. Para algunos establecimientos se recomendó la erradicación de *R. microplus*, teniendo en cuenta la probabilidad de reintroducción de la garrapata. El presente trabajo confirma la situación de inestabilidad enzoótica para estos hemoparásitos, debida a que el país se encuentra en una zona marginal para el desarrollo de la garrapata.

SUMMARY

Ticks and tick-borne diseases are widely distributed in the world and produce significant economic losses to livestock production. In Uruguay, the cattle tick *Rhipicephalus microplus* transmits the agents responsible for the complex called tick fever, which involves two diseases: babesiosis and anaplasmosis. The aim of this study was to determine the epidemiological situation of the tick fever in 16 commercial farms located in northern Uruguay and to propose alternatives for controlling it. The selected farms had infestation by *R. microplus* and history of deaths by hemoparasites. These farms already had data regarding the toxicological sensitivity to different ixodicides approved by the Health Campaign. To perform seroimmunological studies, samples of serum from calf, yearlings and adults (n= 402) were used. Diagnosis of enzootic stability or instability were performed based on serology. The Card Test was used for *A. marginale* and indirect immunofluorescence for *Babesia spp.* The cutoff considered for each farm to be in enzootic instability was between 20% and 75% of positive samples. The values above or below these cutoffs were considered as a farm in enzootic stability for tick fever. Only one farm showed enzootic stability for all the sampled categories for the three hemoparasites studied. The rest of the farms were unstable for at least one hemoparasite in one category. To control the tick fever, the use of the hemovaccine and biosecurity measures to prevent outbreaks of *A. marginale* were proposed. For most farms, the tick control was suggested considering the generational treatment. In some farms, eradication of *R. microplus* was recommended, considering the likelihood of reintroduction of the tick. This work confirms the status of enzootic instability for these hemoparasites, since the country is in a marginal area for the development of the tick.

1. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas y las enfermedades que transmiten están ampliamente distribuidas en el mundo, mayoritariamente en países tropicales y subtropicales (FAO, 2003). En Uruguay, la garrapata común del ganado *Rhipicephalus microplus* transmite el complejo denominado tristeza parasitaria, que comprende dos enfermedades: babesiosis y anaplasmosis (Rubino, 1946; Draghi y col., 1997). La babesiosis es producida por los protozoarios *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, siendo su transmisión únicamente a través de garrapatas infectadas (Mehlhorn y Schein, 1985). El estadio de larva de *R. microplus* es responsable de inocular *B. bovis*; ninfas y adultos inoculan *B. bigemina*. La anaplasmosis es una enfermedad infecciosa que afecta a varias especies y en el caso de los bovinos es causada por la rickettsia *Anaplasma marginale* (Kuttler, 1984). Esta rickettsia es transmitida de forma mecánica mediante insectos hematófagos y por *R. microplus*. También se puede transmitir por vía iatrogénica a través de instrumentos contaminados como agujas, jeringas, cuchillos, etc. (Rubino, 1946).

De todos los casos clínicos diagnosticados en la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) de Paysandú entre los años 1993 y 2003, la enfermedad más frecuentemente diagnosticada en los bovinos, después de la mastitis, fue la tristeza parasitaria (Buroni, 2014). Su sintomatología es conocida y a veces confundida con otras enfermedades similares por los trabajadores rurales, quienes generalmente frente a la presencia de síntomas o muertes, aplican tratamientos a los animales del rodeo, pero sin llegar al diagnóstico confirmatorio (Carrquiry, 2010). Cabe destacar que los brotes no sólo llevan a la muerte, sino que los animales que manifiestan sintomatología clínica nunca van a recuperar el peso perdido, disminuyendo la rentabilidad del sistema (Solari, 1991; Solari, 2006).

Mundialmente las pérdidas económicas ocasionadas por infestaciones de garrapatas fueron estimadas en US\$ 7 billones anuales, de los cuales un billón corresponde a América Latina (FAO, 2004) y US\$ 32,7 millones por año corresponden a Uruguay (Ávila, 1998). El impacto económico de las enfermedades transmitidas por la garrapata se debe a pérdidas directas, como mortalidad y disminución en la producción; y a pérdidas indirectas debidas a los costos de los tratamientos, establecimiento de medidas de control y barreras para la comercialización de los productos de origen animal (Ortiz y col., 2012). En establecimientos donde ocurren brotes de tristeza parasitaria, se han estimado pérdidas de 7,3 dólares por cabeza considerando únicamente las muertes y los costos por tratamientos (Solari, 2006).

En nuestro país han ocurrido una serie de cambios ambientales a lo largo de los años. Se han aumentado las hectáreas dedicadas a la agricultura y a la forestación, por lo que el área destinada al ganado ha disminuido pero el número de bovinos se ha incrementado. Esto trae como consecuencia una mayor dificultad para el control de las garrapatas, debido al aumento en la tasa de encuentro de las garrapatas con el ganado (Miraballes y Riet-Correa, 2018). En áreas forestadas, principalmente en los departamentos del norte del Uruguay, se utiliza el ganado para disminuir el riesgo de incendio y para

aprovechar el área de pastoreo. Generalmente, una misma área es pastoreada por bovinos de más de un productor, aumentando el riesgo de infestación de garrapatas junto con el riesgo de la aparición de brotes de tristeza bovina ya que pueden coexistir animales que provengan de diferentes zonas epidemiológicas, tanto estables como inestables (Solari y col., 2013).

Para prevenir los brotes de tristeza parasitaria es necesario realizar un diagnóstico de la situación de estabilidad o inestabilidad enzoótica en los establecimientos, a través de la detección de anticuerpos en sangre, lo que facilita tomar decisiones de forma eficiente (Smith y col., 2000). Un alto porcentaje de establecimientos en nuestro país están categorizados como enzoóticamente inestables, es decir, entre el 20 y el 75% de los animales presentan anticuerpos contra *Babesia* spp. y/o *Anaplasma marginale*, por lo que se encuentran en riesgo de enfermar (Cuore, 2016). Por otro lado, la estabilidad enzoótica ocurre cuando las relaciones entre el medio ambiente, el hospedero y el vector se encuentran en equilibrio y no se observa clínicamente la enfermedad (Perry, 1996).

El conocimiento de la epidemiología de *R. microplus* ha permitido elaborar metodologías de control que incluyen el tratamiento generacional y el control integrado de parásitos (Nari y col., 1979; Solari, 1991; Sanchís y col., 2008). El tratamiento generacional destaca la rotación de principios activos con mecanismos de acción diferente, donde cada generación es tratada con uno diferente, con el objetivo de disminuir la presión de selección para resistencia (Cuore y col., 2009). El control integrado de parásitos, considera que pueden haber animales con cierta carga parasitaria sin manifestar pérdidas productivas de importancia (Cuore, 2016). Incluye, además de los tratamientos con químicos, hongos entomopatógenos, vacunas contra *R. microplus* y hemoparásitos, rotación de pasturas y manejo de las mismas con animales resistentes o especies con menor susceptibilidad (Fiel y Nari, 2013; Perry y col., 1998). Tener en cuenta cuáles son las razas presentes en los establecimientos es fundamental, ya que en las razas cebuinas hay una marcada resistencia a la infestación por garrapatas, y esto puede ser utilizado en el corto plazo como una herramienta de control de la tristeza parasitaria (Uilenberg, 1995). Además, el ganado europeo es altamente susceptible a contraer enfermedades transmitidas por las garrapatas (Guglielmone, 1995). Un manejo sugerido es el uso de animales centinelas, donde se determina un umbral para realizar el tratamiento garrapaticida, siempre dentro de una producción sostenible. Al utilizar un umbral de infestación, se disminuye el número de tratamientos y la aparición de resistencia (Nari y col., 2013). El conocimiento de todas estas herramientas contribuye al éxito del control de la tristeza parasitaria, personalizado para cada establecimiento.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Rhipicephalus microplus*

Rhipicephalus microplus no es una garrapata nativa de América, sino que proviene del continente asiático y/o africano, llegando a nuestro continente junto con el ganado en pie en la época de la colonización (Gonzales, 2003). Es un parásito considerado endémico en Asia, noroeste australiano, Madagascar, sudeste africano y varios países de América del Sur y Central. A pesar de haberse logrado su erradicación en Estados Unidos, esporádicamente se encuentran ejemplares en los estados de Texas y California, zona definida como de cuarentena por ser fronteriza con México (OIE, 2010).

En Uruguay, la primera referencia de *R. microplus* fue en 1901 (Hooker, 1909). Su control fue establecido por la Ley N° 3.606, desde 1910 (MAP, 1910), luego en 1941 fue declarada obligatoria su erradicación en todo el territorio nacional. El interés científico por *R. microplus* y los hemoparásitos causantes de tristeza parasitaria en nuestro país comenzó en 1921 y en la década del 70 se comenzó a estudiar su epidemiología (Nari y col., 1979).

Actualmente rige la Ley N° 18.268 que divide al país en dos zonas: 1) Control, donde se puede convivir con el parásito; y 2) Libre, donde, en caso de que algún establecimiento tenga presencia de *R. microplus*, su erradicación es obligatoria (Errico y col., 2009). En la Figura 1 se ilustran las zonas. Además, está prevista la erradicación de predios considerados de alto riesgo dentro de la zona de control. Los predios pueden ser considerados de alto riesgo si se encuentran poblaciones multirresistentes a los garrapaticidas o muertes por tristeza. Para que un predio logre el *status* de erradicado, debe cumplir con un año de monitoreo sin constatare la presencia de *R. microplus* (Cuore y col., 2015).



Figura 1 Mapa del Uruguay delimitado por zonas libre y de control de la *Rhipicephalus microplus*. Fuente MGAP 2016.

El ciclo de *R. microplus*, dividido en ciclo parasitario y no parasitario, se ve influenciado por las condiciones climáticas (Nari y col., 1979), las cuales condicionan el desarrollo de dos a tres generaciones por año, donde el ciclo no parasitario se ve suspendido en el invierno. La primera generación comienza a la salida del invierno (julio/ agosto), finalizando en noviembre. La segunda generación ocurre desde fines de primavera a inicio de verano, mientras que la tercera generación se desarrolla en el otoño, que es cuando existe alta población de garrapatas sobre los animales, coincidiendo con numerosas muertes por tristeza parasitaria (Cardozo y Franchi, 1994). En la Figura 2 se ejemplifican las tres generaciones de garrapatas.

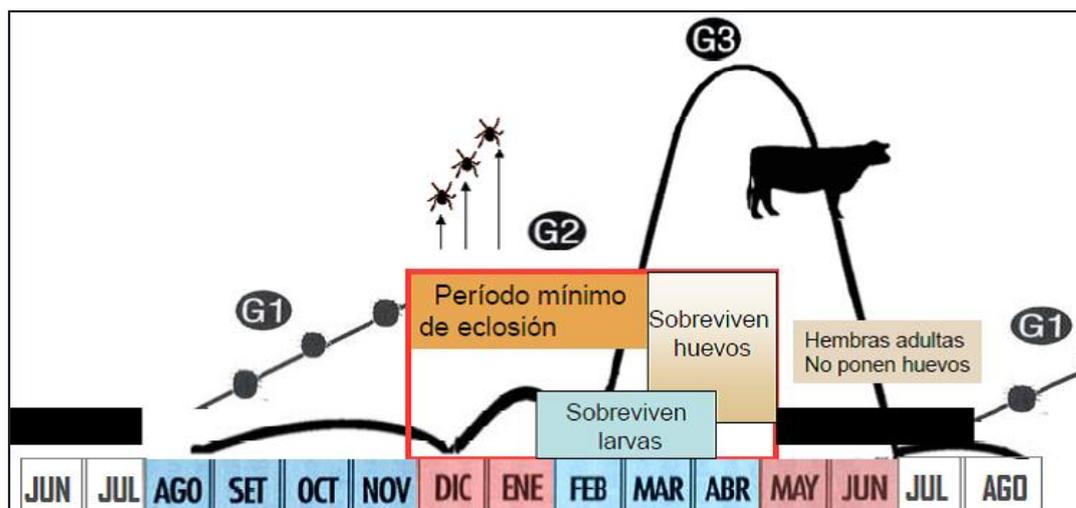


Figura 2. Modelo conceptual de *Rhipicephalus microplus*. Fuente Nari y Solari, 1990.

Uruguay se encuentra en un área marginal para el desarrollo de *R. microplus* (paralelo 30° - 35° Latitud Sur) y dentro de la zona de control, se presentan diferentes situaciones epidemiológicas donde en algunos establecimientos, debido a sus características, como abundancia de bosques nativos y forestación; falta de infraestructura, alambrados en mal estado, potreros sin delimitar y/o personal no capacitado, es imposible considerar la erradicación de *R. microplus*, debiéndose convivir con ella tratando de no producir pérdidas económicas importantes. En cambio, existen establecimientos donde el ambiente es propicio para intentar la erradicación de *R. microplus*, obteniendo mejores beneficios económicos en el mediano plazo (Miraballes y col., 2018).

Los estudios realizados en el país, considerando la epidemiología de *R. microplus*, han permitido el desarrollo de medidas eficientes de control de este parásito y, en consecuencia, sobre los hemoparásitos que la garrapata transmite (Cardozo, 1989). También, a nivel mundial se han diseñado planes de control y erradicación de la garrapata buscando incrementar la producción bovina. En Estados Unidos se logró eliminar la tristeza parasitaria mediante la erradicación del ácaro vector *Boophilus annulatus*; sin embargo, no se ha registrado tal suceso en otros países del mundo (Vanzini y Ramírez, 1994).

A pesar de las distintas estrategias de control de parásitos implementadas, tendientes a disminuir el uso de los garrapaticidas, no ha sido posible prevenir

el desarrollo de la resistencia antiparasitaria (van Veen, 1997). Los baños de inmersión con arsénico fueron las primeras formas de control de la garrapata en Uruguay. En 1950 se hallaron cepas resistentes al arsénico, aunque estos diagnósticos no fueron confirmados mediante pruebas de laboratorio (Cuore, 2016). Actualmente, hay 6 grupos químicos destinados a controlar la garrapata *R. microplus*: organofosforados, piretroides sintéticos, amidinas, fipronil, lactonas macrocíclicas y fluazurón. En 1978, se comprobó resistencia a los organofosforados, en 1994 a piretroides sintéticos (Cardozo, 1995). En 2006 se encontró resistencia a fipronil (Cuore y col., 2007), en 2009 al amitraz (Cuore y col., 2012) y en 2010 a lactonas macrocíclicas (ivermectina y moxidectin) (Cuore y col., 2015). Cuando en 2009 se comprobó la resistencia al amitraz, también se diagnosticó que dichas garrapatas eran resistentes simultáneamente a piretroides y a la combinación de piretroides con organofosforados, declarándose así el primer diagnóstico oficial de una población de garrapatas multirresistente (Cuore y Solari, 2014). Hasta principios de 2018 el fluazurón era el único principio activo sin diagnóstico oficial de resistencia en nuestro país (Cuore, 2016), sin embargo, recientemente existe un establecimiento con sospecha de resistencia a este fármaco en Uruguay (Saporiti, 2018). En Brasil, desde el año 2013 se han diagnosticado garrapatas resistentes a dicho compuesto (Reck y col., 2014).

La resistencia del *R. microplus* a los antiparasitarios es resultado de un cambio genético que es seleccionado por el uso de los acaricidas. A mayor frecuencia más rápida es la selección. Estudios epidemiológicos constatan que dicha resistencia puede introducirse en lugares donde las poblaciones de garrapata no eran resistentes, debido al ingreso de bovinos infestados provenientes de establecimientos en los cuales se constató resistencia (Nari, 1995). La aparición de resistencia parasitaria junto con el aumento de la exigencia de los mercados en relación con la seguridad alimentaria, fomentan el uso racional de los tratamientos antiparasitarios, con el objetivo principal de impedir la presencia residuos en alimentos de origen animal (Cuore, 2016).

A su vez, debe ser tenido en cuenta que existen factores que afectan la eficacia de los garrapaticidas y no están relacionados con la resistencia. Se debe prestar atención a errores operativos como las fallas en el cálculo de dosis; concentración de principios activos en los baños de inmersión; tener en cuenta que los productos *pour on* disminuyen su residualidad frente a lluvias extremas. Es fundamental que los productores se asesoren con su veterinario para conocer las características de la droga a utilizar y seguir las instrucciones del fabricante (Cuore, 2016).

Otro punto a tener en cuenta, en relación al uso de los acaricidas, es conocer el poder residual de los productos sobre los animales. Los piretroides, combinaciones con organofosforados y amitraz usados en baños de aspersión o inmersión y las lactonas macrocíclicas al 1%, no tienen poder residual, debiéndose repetir el tratamiento al cabo de 21 días. Los baños de inmersión, sobre todo el grupo de las amidinas, responden con una capacidad de volteo superior que los de aspersión, resultando en bajas cargas de garrapatas viables luego del tratamiento. Por esta razón, es probable que el riesgo epidemiológico ante un traslado de animales sea menor cuando los animales

son tratados bajo esta forma (Cuore, 2016), siendo ésta la vía de aplicación de elección para el despacho de tropas (Cuore y col., 2009). Contrariamente, fipronil, el fluazurón y las lactonas macrocíclicas a concentraciones de 3,15%, tienen alto poder residual, debiendo sumar 21 días a los días de residualidad mencionados previamente para encontrar la presencia de las primeras teleóginas luego del tratamiento (Cuore, 2016).

2.2. Tristeza parasitaria

2.2.1. Generalidades

Las primeras investigaciones científicas en nuestro país llevadas a cabo en 1920 demostraron que *B. bigemina*, *B. bovis* y *A. marginale* eran los responsables de los brotes de tristeza bovina (Rubino, 1946).

En 1941 se evidenció que el ganado joven presentaba resistencia natural a brotes de tristeza, y se sugirió vacunar a los terneros de 3 a 6 meses de edad (Rubino, 1946). La inmunidad pasiva adquirida por calostro materno dura aproximadamente 2 meses en el ternero. Luego actúa la inmunidad innata desde los 3 a 9 meses de edad (Mahoney y Ross, 1972). En esta etapa de vida, si hay contacto con el agente, no se observarán síntomas clínicos importantes y los animales posteriormente adquirirán inmunidad sólida por un largo período de tiempo (Dalgliesh, 1993). Si son expuestos al agente luego de los 9 meses de edad, los bovinos se encontrarán frente a una situación de inestabilidad enzoótica, en la cual pueden presentar la enfermedad (Callow, 1984). La inmunidad inespecífica entonces, es inversamente proporcional a la edad del animal, y debe tenerse en cuenta epidemiológicamente (FAO, 1984).

En Uruguay, en general se afectan animales con más de seis meses, aumentando la severidad con la edad. Esto ocurre debido a que no todos los terneros se infestan naturalmente, ya que la época de parición coincide con las dos primeras generaciones de garrapatas, cuando el desafío es bajo, por lo que, en las siguientes temporadas, cuando los animales son susceptibles, tendrán un riesgo mayor de contraer la enfermedad (Solari, 2006). A su vez, un brote de tristeza parasitaria bovina puede presentarse luego de movimientos de ganado desde una zona con menor prevalencia de tristeza parasitaria a una zona de mayor prevalencia o cuando aparecen garrapatas infectadas en una zona libre (Solari, 2006).

Los brotes de *Babesia* spp. en general son agudos, transcurriendo en un período de 10 días, con mayor frecuencia entre marzo y mayo. En la anaplasmosis se dan muertes en goteo generalmente por tener un período de incubación mayor, incluyendo el invierno (Solari, 2006). El período de incubación de *Babesia* spp. es de 8 a 16 días, mientras el de *A. marginale* puede variar entre 3 a 5 semanas (Vanzini y Ramírez, 1994).

La presentación de la enfermedad se debe a la multiplicación de *Babesia* spp. y/o *Anaplasma* sp. dentro de las células sanguíneas. La etapa aguda de la babesiosis dura de 3 a 7 días, la fiebre se presenta antes que otros síntomas

se evidencien. Se observan signos de anorexia, taquipnea, depresión del sensorio, debilidad, postración y hemoglobinuria, por lo que en algunos países la enfermedad es conocida como *red water*. En casos más graves, se observa ictericia y anemia. Las vacas preñadas pueden abortar a causa de la fiebre que acompaña la enfermedad (Callow, 1984), y se pueden presentar casos donde disminuya la fertilidad de los toros con una duración de 6 a 8 semanas (Singleton, 1974).

Cuando *B. bovis* alcanza al sistema nervioso central, además de que el bovino manifiesta una variedad de síntomas como temblores y deambulación, el desenlace casi siempre es fatal. En la necropsia se observa esplenomegalia, hepatomegalia, vesícula biliar agrandada con presencia de bilis granular, riñones congestivos, anemia e ictericia generalizada. Frecuentemente se observa edema de pulmón, hemorragias petequiales y congestión de otros órganos (Bock y col., 2004).

La anaplasmosis cursa con anemia, pérdida de peso, abortos e incluso la muerte. Los animales que logran superar la etapa aguda de la enfermedad mantienen su infección quedando como persistentemente infectados con rickettsias tan bajas que no pueden ser detectables microscópicamente, (Zaugg y col., 1996).

Solari y col. (2013) realizaron un relevamiento de datos entre los años 1980 y 2013 de los tres laboratorios oficiales de nuestro país. Los resultados indicaron que, de 400 brotes de tristeza parasitaria, el 49,3% de los casos tenían como agente causal a *B. bovis*, 37,8% a *A. marginale* y 12,9% a *B. bigemina*.

2.2.2. Babesiosis

Historia

En el año 1888 en Rumania, Babes escribió sobre un microorganismo intraeritrocitario del ganado vacuno, que se relacionaba epidemiológicamente con hemoglobinuria enzoótica bovina, y concluyó que se trataba de una bacteria, la cual llamó *Haematococcus bovis*. En 1893, Smith y Kilborne clasificaron el agente de la “Fiebre de Texas” como un protozooario llamado *Piroplasma bigemina*, destacando la garrapata *Boophilus annulatus* como vector de dicha fiebre. Ésta fue la primera publicación científica donde se explicaba la transmisión de un protozooario a un mamífero a partir de un artrópodo (Bock y col., 2004). Lignières (1903), en Argentina estudió dos tipos de *Babesia*, una como forma A, que luego fue conocida como *B. bigemina* y otra como forma B, que luego fue *B. argentina* (*B. bovis*).

Starcovici en 1983 estudió la similitud del descubrimiento de Babes c *Piroplasma bigemina*, apareciendo un nuevo género llamado *Babesia* en homenaje a Babes; donde *H. bovis* comenzó a llamarse *Babesia bovis* y *P. bigemina* cambió su nombre a *Babesia bigemina*. Se han encontrado al menos seis especies de *Babesia* spp. parasitando el ganado bovino: *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. major*, *B. ovata* y *B. jakimovi* (Purnell, 1981).

Taxonomía

El género *Babesia* spp. actualmente se encuentra dentro de la siguiente clasificación: subreino: *Protozoa*, filo: *Apicomplexa*, clase *Sporozoasida*, orden *Eucoccidiorida*, suborden *Piroplasmorina*, familia *Babesiidae*. Por ser parásitos intraeritrocitarios, son considerados hemoparásitos (Levine, 1971).

Morfología

La babesiosis en Uruguay es producida por los protozoarios *B. bovis* y *B. bigemina*, siendo su transmisión a través de garrapatas infectadas (Mehlhorn y Schein, 1985). El estadio de larva de *R. microplus* es responsable de inocular *B. bovis*; ninfas y adultos inoculan *B. bigemina*. *Babesia bovis* puede ser u observarse de forma redondeada (1 a 2,5 micras), piriforme (2 a 2,5 micras) o alargada; estar en el borde de la célula y con poca frecuencia en la superficie de los glóbulos rojos. Ambas especies presentan amplia variación morfológica, lo que hace difícil diferenciarlas únicamente por su morfología (Callow, 1984). Generalmente se agrupan ante un frotis de sangre y pueden hallarse más de dos parásitos de *Babesia* spp. dentro de un eritrocito. *Babesia bigemina* es mayor que *B. bovis*, midiendo de 4 a 5 micras. Se observa más al centro del eritrocito, pudiendo ser de forma redondeada, oval o irregular. Normalmente se observa de forma bigeminada (Rodríguez, 1992).

Transmisión

Un factor importante en la transmisión de *Babesia* spp. tiene que ver con el desarrollo y la alimentación del vector *R. microplus* (Mahoney y Mirre, 1979). La introducción de una garrapata al rodeo es suficiente para transmitir babesiosis en los lugares donde hay bovinos con parasitemia, sin embargo, al tener bajas tasas de infección el proceso de transmisión es lento.

La presencia de *Babesia* spp. en el rodeo depende de muchos factores, entre los que se encuentran la raza y la edad de los animales, la estacionalidad de la población de garrapatas y el ambiente en el que viven (Späth, 1986).

Ciclo biológico

La *Babesia* spp. tiene dos formas de reproducción: 1) sexuada en la garrapata y 2) asexuada en el bovino (Levine, 1971). En el bovino se multiplican por fisión binaria transformándose en trofozoíto y merozoíto dentro de los eritrocitos. Cuando una garrapata ingiere estos eritrocitos infectados, los merozoitos evolucionan hasta diferenciarse en gametos (masculino y femenino), para luego fusionarse y formar un cigoto. Durante 3 o 4 días, este protozoario parasita libremente el intestino de *R. microplus*, donde luego se diseminan por vía hemolinfática y se forman los vermículos que llegan a los órganos reproductivos, especialmente los ovarios, donde se produce la transmisión transovárica. El desarrollo de los esporozoítos empieza una vez que la garrapata infectada parasita al bovino. Los esporozoítos infecciosos en *B. bovis*, se desarrollan en las glándulas salivales de la garrapata luego de 2 a 3 días de fijados, encontrándose en los estados larvarios, donde comienzan a ser infectivos. Una etapa del desarrollo de *B. bigemina*, se produce en las larvas de

Los bovinos jóvenes hasta los 9 meses de edad tienen inmunidad innata; esto no es así para bovinos adultos (Goff y col., 2001). Al principio se creía que se debía a la transferencia de inmunidad mediante anticuerpos presentes en calostro; pero los terneros hijos de madres no inmunizadas también desarrollaron tal inmunidad (Riek, 1963). Goff y col. (2001) plantean que la interleuquina 12 (IL-12), el interferón gamma y la enzima óxido nítrico sintetasa están implicados en la inducción de la expresión por parte del bazo desde temprana edad, colaborando con la inmunidad innata de los terneros. Las citoquinas son importantes en la respuesta inmune frente a *Babesia* spp. La inmunidad depende entre otras cosas del momento y la cantidad de citoquinas producida. Un exceso en la producción de estos factores puede causar vasodilatación con la consecuente hipotensión, edema, trastornos en la coagulación y estasis circulatorio (Wright y col., 1989). La inmunidad innata no es específica, depende de factores genéticos, la relación huésped-parásito y la respuesta por parte de mononucleares y polimorfonucleares del hospedador (Mahoney y col., 1973).

2.2.3. Anaplasmosis

La anaplasmosis es una enfermedad de los bovinos y otros rumiantes causada por la rickettsia *Anaplasma marginale* (Kuttler, 1984). Es una bacteria intraeritrocitaria obligatoria tanto de animales domésticos como silvestres (Kuttler y col., 1984). La anaplasmosis bovina está presente en los 6 continentes del mundo. En las regiones tropicales y subtropicales es considerada endémica ya que hay gran cantidad de vectores, a diferencia de los lugares de clima templado, donde la infección ocurre en forma esporádica (Kocan y col., 2010).

Historia

Sir Arnold Theiler en Sudáfrica en 1910, investigando frotis sanguíneos de bovinos enfermos encontró puntos marginales en los eritrocitos a los que atribuiría la enfermedad similar a la "Fiebre de Texas", denominando su hallazgo como *A. marginale*, clasificándolo también como un protozoario. En 1893, Smith y Kilborne describieron a *B. bigemina*, dedujeron que los puntos marginales hacían parte de dicho microorganismo. Unos años más tarde, Theiler concluye que la babesiosis y la anaplasmosis eran enfermedades diferentes que podrían coexistir en el mismo bovino (Kocan y col., 2010).

Taxonomía

Anaplasma marginale se halla dentro del orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae y género *Anaplasma*. En la misma familia están incluidos también los géneros *Ehrlichia*, *Wolbachia* y *Neorickettsia* (Dumler y col., 2001).

Morfología

Anaplasma marginale miden de 0,55 a 0,85 micras de diámetro y contienen cuerpos iniciales que son gránulos rodeados por una doble membrana de 40 a 50 micras de espesor (Ristic y Watrach, 1963) (Figura 4).

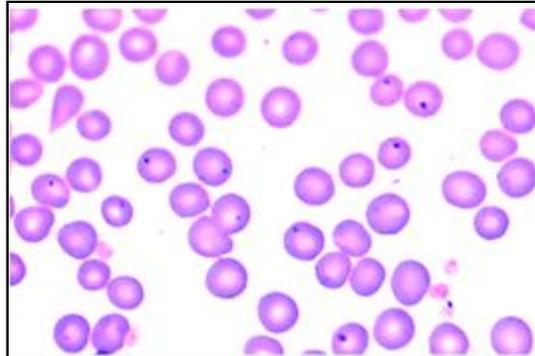


Figura 4. Vista microscópica de eritrocitos bovinos infectados con *A. marginale*.
Fuente: Muñoz-Guarniz y col., 2017.

Transmisión

Anaplasma marginale es transmitida mediante insectos hematófagos y las garrapatas adultas pueden actuar como transmisores biológicos. También se puede transmitir por vía iatrogénica a través de instrumentos como ser agujas, jeringas, cuchillos, etc. (Rubino, 1946). *Anaplasma marginale* es la más patógena en relación a otras especies de *Anaplasma*, por este motivo tiene mayor relevancia en los bovinos (Vidotto y Marana, 2001). Existen varios artrópodos implicados como vectores biológicos de la anaplasmosis, destacándose las garrapatas de la familia Ixodidae y dípteros hematófagos de la familia Tabanidae (Radostits y col., 2002).

Como se mencionó anteriormente, *A. marginale* se disemina tanto a través de vectores biológicos como mecánicos. Es posible que ocurran brotes de la enfermedad luego de utilizar instrumentos para el descorne, vacunación, castración o muestras de sangre de forma colectiva sin considerar la correcta desinfección del instrumental. Existe también alto riesgo de transmisión en transfusiones sanguíneas y por vía transplacentaria (Radostits y col., 2002). Además, el empleo de instrumentos contaminados con sangre en trabajos reproductivos como son las cánulas, equipos de inseminación, entre otros, ocasionalmente pueden transmitir la enfermedad (Kessler, 2001).

Ciclo biológico

La garrapata *R. microplus* a través de la saliva transmite la rickettsia a la sangre del bovino. La fuente de infección es el animal portador, que puede o no desarrollar la enfermedad. *Anaplasma marginale* penetra al eritrocito bajo la forma corpuscular inicial por una invaginación de la membrana que da origen a una vacuola; luego se multiplica por fisión binaria formando cuerpos de inclusión que invadirán nuevas células propagando la infección (Kocan y col., 2010) (Figura 5).

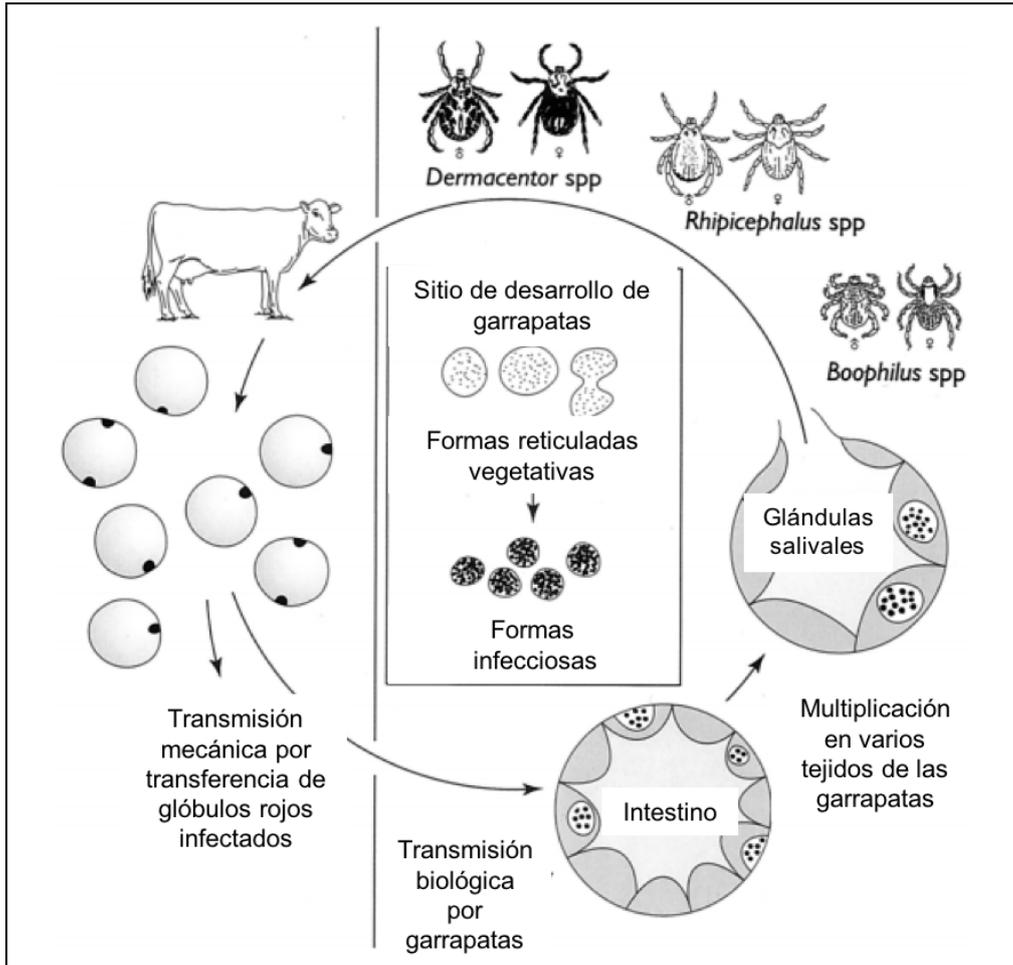


Figura 5. Esquema del ciclo de desarrollo de *A. marginale* en garrapatas y bovinos. Adaptado de Kocan y col., 2003.

2.2.4. Diagnóstico de la tristeza parasitaria

Para diagnosticar un brote de tristeza parasitaria es necesario recopilar datos mediante anamnesis, diagnóstico presuntivo de campo y confirmatorio de laboratorio identificando los agentes en frotis de sangre periférica y central con tinción de Giemsa (Miraballes y col., 2018).

La prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de babesiosis consiste en detectar inmunoglobulinas del suero animal en estudio, por intermedio de dos reacciones: 1) con el parásito y 2) con la antiglobulina bovina teñida con fluoresceína (IICA, 1987). Para anaplasmosis se realiza la prueba de aglutinación en tarjeta, presentando una sensibilidad del 91% y una especificidad de 84% (Gonzales y col., 1983). Dicha técnica consiste en la reacción de un antígeno de *A. marginale* con las inmunoglobulinas del suero del animal en estudio. La prueba es sencilla y rápida de realizar (IICA, 1987). El uso de ambas pruebas permite determinar la estabilidad o inestabilidad enzoótica del rodeo a los hemoparásitos.

Además, se reportan otras técnicas de diagnóstico como ser ELISA y PCR multiplex, donde la primera evidencia la presencia de anticuerpos mientras que la segunda está basada en el diagnóstico del ADN del agente (Bolívar, 2013).

2.2.5. Tratamiento

Los principios activos recomendados para babesiosis son aceturato de diminazene y diprionato de imidocarb. El diminazene actúa rápidamente contra *B. bovis* y *B. bigemina* a dosis de 3,5mg/kg vía intramuscular (de Vos, 1979).

Como tratamiento para la anaplasmosis se recomiendan oxitetraciclina a dosis de 10-15 mg/kg vía intramuscular o tetraciclina de larga acción a dosis de 20 mg/kg vía intramuscular (Draghi y col., 1997).

Los bovinos afectados clínicamente deben tratarse inmediatamente. Frente a un brote grave, se aconseja tratar a todo el ganado (imidocarbo, diminazeno) acompañado de tratamiento sintomático a los clínicos (Bock y col., 2004).

2.2.6. Profilaxis

Para la profilaxis de estas enfermedades, se pueden aplicar medidas tendientes al control de los vectores, la quimioprofilaxis y la inmunización a través de vacunas (Gonçalves, 2000).

Para disminuir el impacto de estas enfermedades es posible elaborar planes específicos dentro de un foco ecológico-epidemiológico con el fin de erradicar o controlar los vectores. Dichos planes permiten la observación y el análisis simultáneo de las formas de transmisión, desarrollo de la inmunidad, presencia de resistencia a los químicos y del contacto de los huéspedes con los vectores (Uilenberg, 1995).

Gran parte de las vacunas disponibles en el mercado se producen en laboratorios que cuentan con apoyo del gobierno de cada país. Los países que actualmente comercializan vacunas son Argentina, Australia, Uruguay, Israel y Sudáfrica (Bock y col., 2004).

En Uruguay existen vacunas comerciales contra tristeza parasitaria desde 1941 (Rubino, 1946). La vacuna refrigerada es producida en el Dpto. de Parasitología de División Laboratorios Veterinarios – Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (DILAVE-MGAP). En 1996, un laboratorio privado desarrolló una vacuna congelada que tiene como ventaja una larga vida útil (Laboratorio Biosur, 2018). Las dos vacunas, ambas producidas a partir de terneros esplenectomizados, están presentes hoy en día en el mercado nacional, pero a pesar de su bajo costo, posiblemente, debido a inconvenientes de manejo como ser el transporte, la conservación y la falta de difusión hacen que no sean utilizadas por un amplio número de productores (Miraballes y Riet-Correa, 2018). Sin embargo, en Australia, también es posible adquirir vacunas a un bajo costo, y se han vendido 35 millones de dosis entre los años 1966 y 2003 (Bock y col., 2004).

Para la producción de éstas hemovacunas, es necesario aislar y purificar cepas de *B. bovis* y *B. bigemina* para babesiosis (organismos vivos atenuados), y contar con la cepa *A. centrale* que es un heterólogo apatógeno del *A. marginale*. Para atenuar *B. bigemina*, son necesarios pases lentos por terneros de 6 a 8 meses de edad esplenectomizados; para *B. bovis*, se realizan pases rápidos. Los terneros en los cuales se multiplicarán los hemoparásitos, deben ser esplenectomizados, además debe existir un control sanitario de su madre. Luego de inocularse las “semillas” de los hemoparásitos, se controla la reacción para luego obtenerse sangre infectada con la cual se elaborará la hemovacuna (Solari, 2006).

La vacuna es una herramienta biológica destinada a terneros de establecimientos que se encuentran en desequilibrio enzoótico, o sea, que tienen altas probabilidades de enfermar cuando sean adultos (susceptibles). La vacuna proporciona inmunidad a lo largo de toda la vida productiva del bovino, evitando pérdidas por muertes y pérdidas subclínicas en la producción (Solari y col., 2013).

Entre los riesgos de vacunación es importante considerar: 1) la contaminación con otros agentes patógenos dado a que son producidas a partir de terneros esplenectomizados y la cadena de frío no siempre se mantiene al transportarlas y 2) las reacciones de hipersensibilidad de diferentes grupos sanguíneos. La frecuencia de reacciones adversas producidas por la vacuna ha disminuido con la aparición de las cepas atenuadas; pero no se descarta la probabilidad de que aparezcan luego de que se inmunicen bovinos adultos altamente susceptibles. Como los terneros de 3 a 9 meses tienen inmunidad natural, presentan bajas probabilidades de reacciones adversas. El rodeo *Bos indicus* raramente presenta tales reacciones (Bock y col., 2004). En vacas preñadas, las consecuencias pueden ser más graves, debido a que pueden abortar por la fiebre que pueda causar la inmunización. Aun así, este riesgo es mucho menor por vacunación que por infección natural. Los toros pueden sufrir infertilidad temporal (6 a 8 semanas) por la fiebre que se pueda presentar luego de la vacunación (Singleton, 1974).

Se consideran al menos tres situaciones donde sería necesario el uso de la hemovacuna: 1) en animales susceptibles que ingresen a áreas enzoóticas, 2) prevención de muertes por reintroducción de garrapatas infestadas a establecimientos y 3) animales que estén en zonas donde la población de garrapatas infestadas no sea suficiente para que adquieran inmunidad innata en los primeros meses de vida (Vanzini y Ramírez, 1994). Si la garrapata está presente y no hay animales serológicamente positivos, posiblemente no haya presencia de hemoparásitos y por lo tanto no es recomendable aplicar la vacuna, pero puede existir el riesgo de ingreso de garrapatas infestadas de otro origen con los consecuentes brotes con alta mortalidad (Plan de sensibilización y extensión en control de garrapata y tristeza parasitaria, 2016).

Antes de comenzar con la vacunación se deberá determinar el riesgo de brotes. Para esto se deberá extraer sangre de adultos y terneros, en un porcentaje cercano al 10% teniendo como máximo 20 muestras (Cuore, 2016).

2.2.7. Estabilidad o inestabilidad enzoótica a la tristeza parasitaria

El concepto de estabilidad enzoótica fue estudiado en Australia y en el continente americano, donde las interacciones entre la enfermedad y el vector son bastante conocidas. Sin embargo, en África, la complejidad aumenta y las predicciones en cuanto a la estabilidad de los predios son cada vez más complicadas (Bock y col., 2004).

Se considera que un rodeo se encuentra en estabilidad enzoótica cuando el porcentaje de seropositivos es menor a 20% o mayor al 75% para cada uno de los tres hemoparásitos; mientras que valores entre 20% y 75% indican inestabilidad (Cuore, 2016).

Por ende, existen dos situaciones de estabilidad enzoótica:

1) Cuando el rodeo se compone de animales seropositivos (mayor al 75% del rodeo para los tres agentes): en este caso generalmente la presencia de garrapatas es alta y el riesgo de enfermar es muy bajo. En el caso que estos establecimientos se proponga controlar la garrapata de forma efectiva, se recomendará vacunar anualmente a los terneros de 3 a 9 meses de edad, porque las cargas de *R. microplus* serán menores y los animales que nacerán luego de instalado el control no estarán fuertemente inmunizados (Cuore, 2016).

2) Cuando el rodeo está compuesto mayormente por animales seronegativos a cualquiera de los tres agentes (entre 0 al 20% de positivos). En esta situación hay escasa o nula presencia de garrapatas o éstas presentan grados menores de infestación. En este caso es aconsejable no vacunar al rodeo y monitorearlo serológicamente por posibles cambios de situación epidemiológica (Cuore, 2016).

Cuando el rodeo se encuentra en inestabilidad generalmente los animales presentan síntomas clínicos (Brown y col., 1990).

Para proponer planes de control para tristeza parasitaria bovina, es necesario saber cuáles son los vectores, cuántos hospederos el vector parasita a lo largo de su ciclo evolutivo y qué animales pueden actuar como hospederos (Radostits y col., 2002). Otra de las grandes incógnitas en el control de la tristeza parasitaria bovina son los animales persistentemente infectados, ya que, aunque tienen inmunidad y no desarrollan la enfermedad clínica, son el principal reservorio para animales susceptibles (Kocan y col., 2010).

2.3. Caracterización del problema

Las pérdidas de producción por tristeza parasitaria en nuestro país y en el mundo, hacen que se planteen inquietudes con el fin de entender estas enfermedades, sus vectores y formas de transmisión para lograr erradicar la

enfermedad. Dado que aún queda mucho para alcanzar este cometido, es que debemos tratar de convivir con la enfermedad de la manera más armónica posible, disminuyendo las pérdidas, para luego intentar eliminar los principales vectores en la transmisión de los agentes de esta enfermedad, como lo es *R. microplus*.

La siguiente tesis pretende destacar la importancia del diagnóstico serológico, dado que determinar la situación de estabilidad o inestabilidad enzoótica de los distintos predios es fundamental para la elección de tratamientos y/o medidas de control para disminuir los brotes de tristeza parasitaria.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Diagnosticar la situación epidemiológica de la tristeza parasitaria en establecimientos comerciales con presencia de *R. microplus* con antecedentes de muertes por hemoparásitos y proponer alternativas para su control.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar la situación de estabilidad o inestabilidad enzoótica de tristeza parasitaria de cada establecimiento.
- Elaborar planes de control de la tristeza parasitaria adaptados para cada establecimiento.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia para el desarrollo del presente trabajo fue la siguiente: seleccionar establecimientos con *R. microplus* y sospecha de muerte por tristeza bovina. Se contó también con que estos establecimientos tuvieran test de susceptibilidad toxicológica para la garrapata (test de resistencia), datos anamnésticos que pudieran usarse para la realización del análisis de riesgo de reintroducción de la garrapata, y que se les haya extraído sangre a los bovinos para la realización de la serología. Una vez determinada la estabilidad o inestabilidad enzoótica, se analizó cada predio y se sugirieron planes de control de tristeza parasitaria.

4.1. Establecimientos

Se seleccionaron 16 establecimientos ganaderos ubicados al norte del Río Negro y en el departamento de Cerro Largo. Dichos establecimientos tenían como característica en común presencia de garrapatas y sospecha de muertes por tristeza parasitaria.

Para la caracterización de los establecimientos se usaron datos obtenidos en una encuesta previa (Miraballes y col., 2018): ubicación, tipo de producción; medidas de bioseguridad (sendas de paso, estado de alambrados, animales en la calle); instalaciones y tratamientos para el control de la tristeza parasitaria.

En la Tabla 1 se presenta la caracterización de los establecimientos.

Cabe destacar que el predio 10 fue dividido en 10a y 10b porque se estudió la serología de los potreros del frente y del fondo separadamente.

4.2. Análisis de riesgo de reintroducción de *R. microplus*

Para el análisis de riesgo fue utilizada una *network* basada en un sistema Bayesiano desarrollado por Miraballes y col. (datos sin publicar). Esta red predice la probabilidad de reintroducción de la garrapata al predio. Se ingresaron los siguientes datos de los establecimientos a la *network*: región (alta prevalencia/baja prevalencia); tipo de producción (cría/ciclo completo/invernada); presencia de infestación en los animales (si/no), época del año que fue visitado el establecimiento (favorable/desfavorable), presencia de senda de paso (si/no), estado de alambrados (buenos/malos), vecinos infestados (si/no).

En dicho estudio se consideró que un establecimiento estaba ubicado en una región de alta prevalencia de garrapatas si se encontraba al norte del Río Negro y en el departamento de Cerro Largo. Por otro lado, los establecimientos ubicados en una región de baja prevalencia de *R. microplus* eran los que se encontraban en los departamentos de Treinta y Tres, Lavalleja, Rocha y Maldonado. La zona libre no fue considerada en este análisis de riesgo. La época del año considerada favorable para el desarrollo de *R. microplus* fue desde noviembre a mayo (segunda y tercera generación) y la considerada desfavorable desde junio a octubre (invierno y primera generación).

En base a los resultados del análisis de riesgo se decidió por la erradicación o el control de *R. microplus* según las probabilidades de reintroducción de cada establecimiento. Se consideró que los establecimientos pueden tener como objetivo erradicar la garrapata cuando la probabilidad de introducción de garrapatas al establecimiento sea menor al 37% mientras que, resultados mayores deberían optar por el control de *R. microplus* ya que las probabilidades de reinfección son altas.

4.3. Resistencia de *R. microplus* a garrapaticidas

Utilizando los perfiles de resistencia de *R. microplus* de cada establecimiento (Saporiti, 2018), se evaluaron los posibles principios activos a ser utilizados. Fue realizado el test del paquete de larvas TPL (Stone y Haydock, 1962) considerándose que: entre 1 y 20% de supervivencia la resistencia era baja; entre 21 y 50% la resistencia era media y mayor a 50%, la resistencia al producto era alta (Tabla 2).

4.4. Técnicas serológicas

Se analizaron 402 muestras de suero provenientes de 16 establecimientos, que fueron almacenadas a -20°C, extraídas al azar de bovinos adultos, sobreaño y terneros. En algunos establecimientos, debido al tipo de sistema de producción y/o de manejo, no fue posible muestrear a todas las categorías deseadas. De los 16 establecimientos, sólo en dos de ellos se pudieron tomar muestras de todas las categorías; en 7 establecimientos se tomaron muestras de una categoría y en los restantes se muestrearon dos categorías (Tabla 3).

Se contaba en promedio con 10 muestras de suero de terneros (mínimo 6 - máximo 15); 15 sueros de sobreaño (mínimo 14 - máximo 16) y 15 sueros de adultos (mínimo 6 - máximo 18).

La situación de estabilidad o inestabilidad enzoótica de la tristeza parasitaria se determinó mediante las técnicas de diagnóstico descritas en el manual de IICA (1987) y padronizadas en DILAVE, Montevideo. Para el diagnóstico de anticuerpos contra *A. marginale* se utilizó la técnica de aglutinación en tarjeta (AT). Para el diagnóstico de babesiosis se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Estas técnicas fueron llevadas a cabo en los laboratorios de INIA Tacuarembó y DILAVE Regional Norte.

Con los resultados de las pruebas serológicas se calculó la prevalencia para cada agente causal. Se determinó el punto de corte para estabilidad a porcentajes entre 0 y 20, y mayores a 75 de bovinos con presencia de anticuerpos. Los valores que quedan entre estas cifras corresponden a situaciones de inestabilidad enzoótica para tristeza parasitaria (Cuore, 2016).

4.4.1. Aglutinación en tarjeta para el diagnóstico de anticuerpos contra *A. marginale* (Protocolo IICA 1987-DILAVE).

- 1) En cada una de las cuadrículas de la placa, se colocan 38µl de suero normal bovino; el cual fue brindado por el Laboratorio de Parasitología de DILAVE. El suero normal bovino debe ser conservado a -80°C y luego de descongelarse puede ser utilizado por 24 horas siempre y cuando se mantenga en heladera.
- 2) Se ordenan los sueros problema por número correlativo de caravana de los animales y se agregan 38µl de suero en cuadrículas de la N° 1 a la N° 10. En cuadrícula N° 11 se colocan 38µl suero normal bovino; en ésta se observa el control negativo.
- 3) En cuadrícula N° 12 se colocan 38µl de suero control positivo (brindado por Laboratorio DILAVE).

- 4) Se agregan 15µl de antígeno de *A. marginale* en todas las cuadrículas tratando de que aún no contacte con lo puesto previamente en la cuadrícula. Se debe mantener el antígeno refrigerado. El antígeno fue brindado por Laboratorio DILAVE.
- 5) Se homogeinizan los sueros de las cuadrículas con el antígeno, comenzando con la N° 11 que corresponde al control negativo.
- 6) Incubar en estufa a 37°C con 70% de humedad por 4 minutos.
- 7) Se retira de estufa rotando suavemente la placa de vidrio; una vez que el suero positivo (N° 12) comienza a precipitar hacer incidir luz indirecta en la placa para realizar la lectura.
- 8) La lectura finaliza cuando el control negativo (N° 11) comienza a precipitar (Figura 6).

Los resultados fueron clasificados como:

Negativo: ausencia de grumos de aglutinación.

Positivo: presencia de grumos de aglutinación.



Figura 6. Placas para aglutinación en tarjeta

4.4.2. Inmunofluorescencia indirecta para el detección de anticuerpos contra *B. bigemina* y *B. bovis*. (Protocolo IICA 1987-DILAVE).

- 1) Para los controles, se identifican tubos de Eppendorf como preparación A, B y C. Colocar 240µl de dilución de PBS al 10% en los tres tubos. En el tubo A, agregar 10µl de suero positivo de *B. bigemina*. En el tubo B, agregar 10µl de suero positivo para *B. bovis*. En el tubo C, agregar 10µl de suero normal bovino. Los sueros controles fueron brindados por Laboratorio DILAVE. Los sueros positivos para *B. bovis* y *B. bigemina* se conservan en freezer.
- 2) Para las muestras, luego de ordenar los sueros problemas por número correlativo, colocar en tubos Eppendorf 240µl de PBS diluido al 10% y 10µl de suero problema.
- 3) Se contará con dos portaobjetos con el antígeno correspondiente previamente adherido. Los portaobjetos deben estar divididos en 24 cuadrantes iguales (3 filas de 8 columnas) (Figura 7). Los cuadrantes de los extremos (N° 1, N° 8, N° 17 y N° 24) serán destinados a ser controles. Los N° 1 y N° 24 serán controles positivos, el N° 8 el negativo y el N° 17 el inespecífico.

- 4) En el portaobjetos para *B. bigemina*, en los cuadrantes control positivo (Nº 1 y 24), colocar 10µl de la preparación del tubo A. En el cuadrante de control inespecífico (Nº 17), colocar 10µl de la preparación B. En el control negativo (Nº 8), agregar preparación C. En el resto de los cuadrantes, agregar 10µl de la preparación de los sueros problema.
- 5) En cada uno los tubos Eppendorf con los preparados, se agregan 25µl de PBS diluido.
- 6) En el portaobjetos para *B. bovis*, agregar 10µl de la preparación B en los cuadrantes de control positivo. En el cuadrante de control inespecífico, agregar 10µl de la preparación del tubo A. Para el cuadrante de control negativo, agregar 10µl de la preparación C. En el resto de los cuadrantes, agregar 10µl de los sueros problema.
- 7) Incubar ambos portaobjetos a una temperatura de 37°C con 70% de humedad por 45 minutos.
- 8) Retirar de estufa y realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS diluido al 10%.
- 9) Secar la superficie inferior del portaobjetos con sumo cuidado en mechero.
- 10) Colocar en cada cuadrante 10µl de conjugado (fluoresceína) diluido con PBS.
- 11) Repetir pasos 8 y 9.
- 12) Leer en microscopio de epifluorescencia a 40x (Figura 8).



Figura 7 Portaobjeto dividido en cuadrantes.

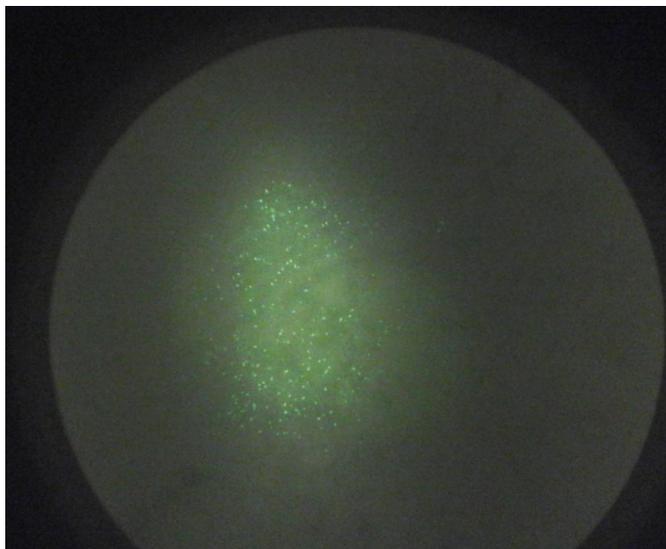


Figura 8 Observación en microscopio de epifluorescencia

4.5. Planes de control de tristeza parasitaria

Se analizó cada predio de forma individual donde, en base a toda la información previamente recabada (resultados serológicos, análisis de situación enzoótica e historial de vacunación) se establecieron planes de control de tristeza parasitaria como la utilización de hemovacunas, implementación de medidas de bioseguridad (alambrados en buen estado, control de animales en la calle) para el control o erradicación de *R. microplus*. Para el control de la garrapata se consideró la utilización del tratamiento generacional. En la cantidad de tratamientos a realizar se tomó en cuenta la frecuencia de administración de acuerdo a lo sugerido por Cuore y col. (2008a).

Queremos destacar también que la decisión de recomendar o no el uso de la hemovacuina en los establecimientos, dependió de los antecedentes de cada establecimiento y del contacto con los productores.

5. RESULTADOS

En la Tabla 1 se presenta la información recopilada de las encuestas dirigidas a los productores y los resultados del análisis de riesgo. Se puede observar que el 100% de los productores reporta que los establecimientos vecinos también están infestados con garrapata, mientras que el 80% menciona que hay ganado en la calle frecuentemente, y, sólo un 36% inmuniza al menos una categoría de animales contra la tristeza bovina. Solamente dos establecimientos presentaron baja probabilidad de reintroducción de garrapatas.

Tabla 1. Resumen de las encuestas dirigidas a los productores y análisis de riesgo

ID*	Sistema**	Razas***	Estado de Instalaciones**** y características del predio					Historial de uso de vacunas					Análisis de riesgo (%)
			Cuarentena	Tubo	Baño	Alambrados	Senda	Ganado en la calle	Vecinos infestados	Terneros	Sobreaño	Adultos	
1	CC	Cruzas	No	B	R	B	Si	Si	Si	No	No	Si	93
2	Cría	Cruzas	No	B	No	R/M	Si	No	Si	No	No	No	99
3	Cría	Cruzas	No	B	No	B	Si	Si	Si	No	No	No	86
4	CC	<i>Bos taurus</i>	Si	R/M	B	R/M	No	Si	Si	Si	Si	Si	99
5	CC	<i>Bos taurus</i>	Si	MB	B	B	No	-	Si	No	No	No	21
6	Cría	Cruzas	No	B	MB	B	No	No	Si	Si	Si	Si	26
7	Cría y recría	<i>Bos taurus</i>	Si	MB	MB	MB	Si	Si	Si	Si	Si	Si	83
8	Cría	Cruzas	No	MB	B	B	Si	Si	Si	No	Si	Si	41
9	Cría y recría	<i>Bos taurus</i>	Si	B	No	MB	Si	Si	Si	No	No	No	83
10 ^a	Cría y recría	<i>Bos taurus</i>	Si	R/M	No	B	No	Si	Si	No	No	No	89
10 ^b	Cría y recría	<i>Bos taurus</i>	Si	R/M	No	B	No	-	Si	No	No	No	89
11	Cría	Cruzas	No	B	MB	MB	No	Si	Si	No	No	No	91
12	Cría	Cruzas	No	MB	No	B	No	Si	Si	No	No	No	54
13	Cría	<i>Bos taurus</i>	Si	B	B	B	No	No	Si	No	No	No	76
14	Cría	<i>Bos taurus</i>	No	R/M	B	B	Si	Si	Si	No	No	No	86
15	Cría	<i>Bos taurus</i>	No	MB	MB	R/M	No	Si	Si	No	No	Si	100
16	Cría y recría	<i>Bos taurus</i>	Si	MB	MB	R/M	No	Si	Si	Si	Si	Si	99

*Número de identificación de cada establecimiento. **CC= Ciclo Completo. *** Cruzas *Bos taurus* con *Bos indicus*. ****MB= Muy Bueno; B= Bueno; R= Regular; M= Malo; R/M= Regular malo; -= sin dato.

En la Tabla 2 se presentan los resultados del test de resistencia a los garrapaticidas (Saporiti, 2018). El establecimiento 10 se encuentra dividido en 10a y 10b debido a que se realizaron dos test de resistencia ya que se sospechaba que podían encontrarse distintos perfiles de susceptibilidad en el predio porque los potreros estaban bajo diferentes formas de manejo.

Surge de los resultados que la mayoría de los establecimientos tenían principios activos que eran eficaces para el control de la garrapata. Sin embargo, todos los predios presentaron cierto grado de resistencia por lo menos a un principio activo. Cabe destacar que sólo 2 tenían resistencia alta a un principio activo y 3 establecimientos tenían resistencia alta a dos principios activos.

Tabla 2. Grado de resistencia de las *Rhipicephalus microplus* a los diferentes garrapaticidas.

ID*	Garrapaticidas					
	Cipermetrina	Amitraz	Fipronil	Ivermectina	Flumetrina	Ethion
1	Media	Baja	Alta	Nula	Media	Baja
2	Baja	Nula	Nula	Nula	Media	-
3	Alta	Baja	Baja	Nula	Alta	-
4	Media	Nula	Baja	Baja	Media	-
5	Sin garrapatas suficientes para realizar el test					
6	Alta	Baja	Media	Media	-	Baja
7	Media	Nula	Nula	-	Media	-
8	Baja	Nula	Nula	Baja	-	Nula
9	Media	Baja	Nula	Baja	Media	Baja
10 ^a	Media	Nula	Nula	Nula	Media	Nula
10 ^b	Media	Nula	Baja	Nula	Baja	Nula
11	Sin garrapatas suficientes para realizar el test					
12	Baja	Nula	Nula	Nula	Baja	Baja
13	Baja	Nula	Nula	Nula	Baja	Nula
14	Alta	Baja	Nula	Baja	Alta	Nula
15	Alta	Baja	Nula	Baja	Alta	Nula
16	Nula	Baja	Nula	Baja	Nula	Nula

*Número de identificación de cada establecimiento. (Datos adaptados de Saporiti, 2018). Nula= 1-20%; Baja= 21-50%; Media= >50%; -= sin datos.

5.1. Situación de tristeza parasitaria

Los resultados de serología realizados por *Card test* para *A. marginale* e Inmunofluorescencia indirecta para *Babesia* spp. en las diferentes categorías y para cada establecimiento se presentan en la Tabla 3. En cuanto al análisis de estabilidad enzoótica, solamente el establecimiento N° 15 presentó estabilidad enzoótica para las categorías muestreadas frente a los tres hemoparásitos en estudio. Sin embargo, el resto de los establecimientos fueron inestables al menos en una categoría para un hemoparásito. Todos los terneros, resultaron ser inestables para al menos un hemoparásito.

Tabla 3. Serología de los establecimientos aplicada para diferentes categorías de animales

ID*	Categoría	Nº animales	<i>B. bovis</i> (%)	<i>B. bigemina</i> (%)	<i>A. marginale</i> (%)
1	Terneros	15	67	100	93
	Sobreaño	16	56	75	100
	Adultos	15	87	93	80
2	Sobreaño	15	47	27	60
	Adultos	16	50	44	50
3	Sobreaño	15	40	47	20
	Adultos	15	60	80	66
4	Sobreaño	14	29	78	50
	Adultos	15	53	80	87
5	Adultos	18	0	5	72
6	Adultos	16	0	56	0
7	Adultos	15	27	87	33
8	Terneros	10	30	70	10
	Sobreaño	15	100	93	67
	Adultos	14	78	86	50
9	Adultos	14	57	21	7
10	Adultos	14	57	21	7
11	Adultos	15	0	7	67
12a	Terneros	6	67	83	17
	Adultos	6	67	67	0
12b	Adultos	17	23	82	23
13	Sobreaño	16	62	100	0
	Adultos	13	54	100	15
14	Sobreaño	16	0	56	50
	Adultos	16	0	62	56
15	Sobreaño	15	13	87	13
	Adultos	15	87	100	0
16	Sobreaño	15	100	93	60

* Número de identificación de cada establecimiento.

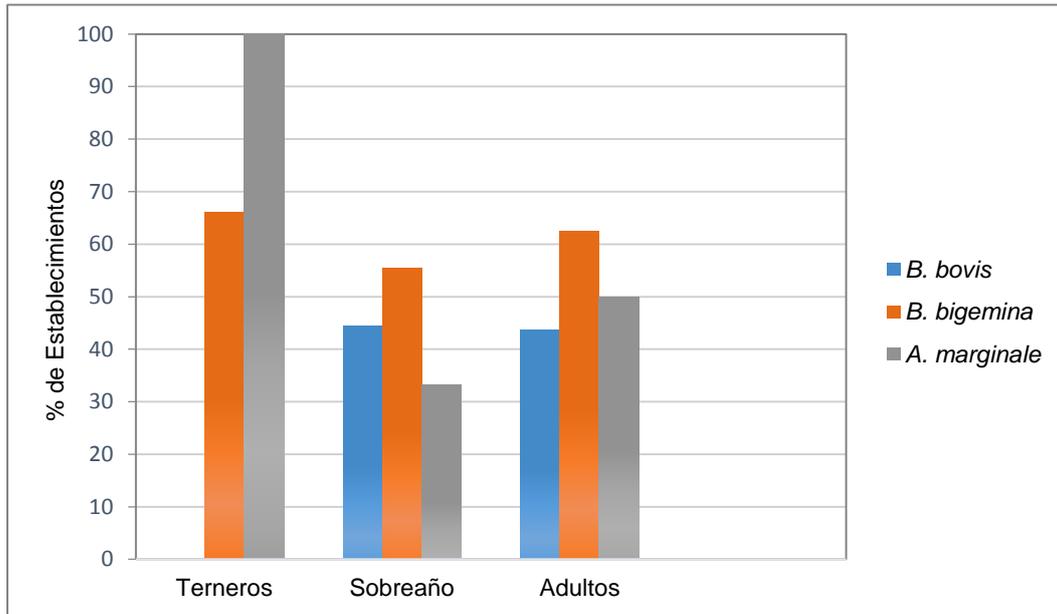


Figura 9. Frecuencia de estabilidad enzoótica para *B. bigemina*, *B. bovis* y *A. marginale* estratificados por categoría animal

En el 75% de los establecimientos se detectaron animales serológicamente positivos a *B. bovis*, de los cuales el 62,5% se encontraba en situación de inestabilidad enzoótica. Todos los establecimientos resultaron tener serología positiva para *B. bigemina* (el 43,7% fueron inestables). En el caso de *A. marginale* del 87% de los establecimientos que presentaron anticuerpos, el 56,2% estaba en inestabilidad enzoótica

En la Figura 9, se presentan los datos de estabilidad enzoótica para cada agente según la categoría estudiada. La categoría terneros resultó ser enzoóticamente inestable en todos los predios para *B. bovis*. Contrariamente, fueron estables para *A. marginale*. Por otro lado, el número de predios que fue estable para *B. bigemina* (n=9) fue mayor que para *B. bovis* (n=6) en todas las categorías.

5.2. Planes de control de tristeza parasitaria

En la Tabla 4 se presentan las medidas de control sugeridas para *R. microplus* con su correspondiente tratamiento generacional y planes de control para la tristeza parasitaria para cada establecimiento.

De los 16 establecimientos evaluados, sólo a 3 (Nº 5, 6 y 12) se le recomendó la erradicación la garrapata ya que en los establecimientos restantes dicha medida resultaba imposible conociendo las características de cada predio y sus instalaciones.

En el establecimiento Nº 12, pese a que el resultado del análisis de riesgo (54%) indicaba la decisión de controlar las poblaciones de garrapata, se recomendó la erradicación, ya que la infestación de garrapatas era reciente, en un número

reducido de animales (n=11) y el potrero donde se encontraban los animales afectados era chico (5 hectáreas) y de fácil control.

Se recomendó vacunar a todos los establecimientos al menos en una categoría por lo menos para un agente debido a la inestabilidad enzoótica.

En términos generales, los planes de control se pueden resumir en:

- 1) Empleo de hemovacunas en la categoría terneros, sobreaño y/o adultos.
- 2) Implementación de medidas necesarias para evitar la transmisión iatrogénica de *A. marginale* (ej. uso de una única aguja por animal).
- 3) Erradicación y control de *R. microplus* basándose en el tratamiento generacional de la garrapata (Cuore y col., 2008b).

Además, se recomendó el tratamiento de animales con síntomas clínicos con aceturato de diminazene para el control de *Babesia* spp. o tetraciclinas de larga acción para el control de *A. marginale* y el empleo de imidocarb cuando los brotes son mixtos. Cuando la vigilancia diaria de los animales frente a un brote no fuera posible, se recomendó el uso de estos principios activos en todo el rodeo.

Tabla 4. Planes de control de *R. microplus* y tristeza parasitaria adaptados para cada establecimiento

ID*	Medidas para <i>R. microplus</i>	Tratamiento generacional			Medidas de control de tristeza
		Generaciones			
		1º (**)	2º (**)	3º (**)	
1	Control	Ivermectina (2)	Fluazurón (1)	Amitraz (2)	Vacunar terneros
2***	Control	Ivermectina (2)	Fipronil (2)	Fluazurón (1)	Vacunar terneros y sobreaño
3***	Control	Ivermectina (2)	Fipronil (2)	Fluazurón (1)	Vacunar terneros
4	Control	Ivermectina (2)	Fipronil (2)	Amitraz (2)	Vacunar terneros y sobreaño
5	Erradicación	Fluazurón (2)	Fipronil (3)	Amitraz (4)	Vacunar y medidas de bioseg. para <i>A. marginale</i>
6	Erradicación	Fluazurón (2)	Fipronil (3)	Amitraz (4)	Continuar vacunando terneros hasta erradicar
7	Control	Fluazurón (1)	Fipronil (2)	Amitraz (2)	Continuar vacunando terneros
8	Control	Ivermectina (2)	Fipronil (2)	Amitraz (2)	Continuar vacunando terneros
9***	Control	Ivermectina (2)	Fipronil (2)	Fluazurón (1)	Vacunar a todos
10a***	Control	Ivermectina (2)	Fipronil (2)	Fluazurón (1)	Vacunar a todos
10b***	Control	Ivermectina (2)	Fipronil (2)	Fluazurón (1)	Vacunar a todos
11***	Control	Ivermectina (2)	Fipronil (2)	Fluazurón (1)	Vacunar a todos
12***	Erradicación	Ivermectina (4)	Fipronil (3)	Fluazurón (2)	Vacunar y tratamiento de enfermos
13	Control	Ivermectina (2)	Fipronil (2)	Amitraz (2)	Vacunar terneros y sobreaño
14	Control	Ivermectina (2)	Fipronil (2)	Amitraz (2)	Vacunar terneros y sobreaño
15	Control	Ivermectina (2)	Fipronil (2)	Amitraz (2)	Vacunar terneros
16	Control	Ivermectina (2)	Fipronil (2)	Cipermetrina (2)	Vacunar terneros

* Número de identificación de cada establecimiento. **Cantidad de tratamientos. ***Establecimientos sin baño.

6. DISCUSIÓN

Dentro de las características generales de los establecimientos evaluados en esta tesis, es importante destacar la ausencia de potreros destinados a la cuarentena (Miraballes y Riet-Correa, 2018). Estos potreros son imprescindibles para la prevención de cualquier enfermedad que implique un problema para el rodeo, así como en el manejo de *R. microplus* para mantener animales posterior a su compra o, cuando, debido a una seca, deben salir a pastorear a la calle y volver a ingresar al predio.

Todos los establecimientos menos uno presentaron situación de inestabilidad enzoótica para por lo menos un hemoparásito. Esto posiblemente se debe a que el país se encuentra en un área marginal para el desarrollo de la garrapata donde las poblaciones de garrapatas no son suficientes para inducir a la estabilidad enzoótica cuando los animales son jóvenes. La alta presencia de garrapatas aumentaría el riesgo de que los animales cuando adultos enfermen por tristeza parasitaria (Solari y col., 2013). Estos casos de inestabilidad se observaron en la mayoría de los establecimientos

En términos generales, se recomendó la premunición con los tres agentes, aún en aquellos casos donde no se diagnosticó presencia de alguno de ellos. Ha sido demostrado que el riesgo de que una garrapata se infecte a través de un animal vacunado es muy improbable (Solari y col., 2013; Bock y col., 2004). A pesar de que no siempre está recomendado vacunar animales adultos, nosotros igual lo indicamos, para casos puntuales debido a que en Australia tienden a usar la vacunación en esta categoría (Bock y col., 2004).

Se encontraron establecimientos con categorías en estabilidad enzoótica por alta exposición a hemoparásitos, debido a que las reinfecciones seguidas fueron importantes para mantener altos niveles de inmunidad, teniendo menos riesgo de presentarse casos clínicos (Kurtti y col., 1983). Esta situación se observó en los establecimientos N° 1 y 15. Igualmente, se les propuso la vacunación ya que frente a la toma de medidas para controlar la garrapata, llegará un momento donde las poblaciones no serán suficientes para mantener el estatus de estabilidad enzoótica (Uilenberg, 1995). De no vacunarse, podrían ocurrir brotes de tristeza como los registrados por Sserugga y col., (2003) en situación similar.

En los establecimientos donde se aconsejó la erradicación (N° 5, 6 y 12), por las mismas razones, también se sugirió la vacunación. Una vez erradicada la garrapata, ya no se justifican las premuniciones (Bock y col., 2004). Conjuntamente se les recomendó que se realizara su vigilancia epidemiológica de acuerdo a la normativa de la Ley 18.268. Para ello se revisarán los animales para descartar la presencia de la garrapata y se pondrá atención a situaciones que impliquen riesgo de reintroducción, como ser alambrados en mal estado, presencia de ganado en la calle, utilización indiscriminada de la senda de paso, vecinos con garrapata, etc.

Bock y col. (2004) afirman que, en áreas endémicas, optar por controlar la enfermedad es la opción más razonable debido a que la erradicación de las garrapatas, a pesar de ser una excelente solución, pocas veces es considerada práctica, justificable económicamente y sostenible en las condiciones ambientales del predio (Bock y col., 2004). Con la vigilancia epidemiológica mencionada anteriormente, creemos que los establecimientos a los cuales se les aconsejó erradicar, podrían alcanzar y mantener su estatus de libres de garrapata aún estando en una zona endémica.

En el establecimiento N° 5, que resultó ser inestable únicamente para *A. marginale*, aunque se haya eliminado la presencia de las garrapatas, no podemos asegurar que la transmisión de la anaplasmosis no va a ocurrir, debido a que ésta puede ser transmitida a través de utensilios contaminados, dípteros hematófagos, entre otros (Guglielmo 1995). Por dicha razón, a este establecimiento en particular, se le recomendó extremar los cuidados inherentes a la transmisión iatrogénica.

El establecimiento N° 12, a pesar de que el resultado del análisis de riesgo indicaba una alta probabilidad de reintroducción de garrapatas, se optó por la erradicación debido a particularidades en como reapareció *R. microplus* (después de 3 años) y el brote de tristeza en el predio, que sólo afectaron a los animales de un potrero. Éste, es un ejemplo que nos hace pensar que se debe tener una visión más global del predio y que la profundidad de conocimiento de cada establecimiento repercute en las decisiones a tomar. Se le recomendó también premunizar a todos los animales y prestar especial atención a animales valiosos, como son el plantel de cría y sus toros, a los cuales se aconsejó tomar temperatura rectal y tratar a los que estén hipertérmicos o que evidencien algún síntoma, siguiendo las sugerencias de Bock y col. (2004).

La alta frecuencia de establecimientos con estabilidad enzoótica para *B. bigemina* posibilita la menor frecuencia de brotes por este agente lo que puede estar en concordancia con los resultados de Solari (2006) quién lo ha diagnosticado en el 12,9% de los casos clínicos de tristeza parasitaria registrados en la década del 80. *Babesia bovis* se encontró en mayor inestabilidad enzoótica por lo cual también estaría en concordancia con los resultados de Solari (2006) donde este agente fue el responsable del 49,3% de los casos. Algo similar ocurre con *A. marginale*.

Es interesante destacar que aquellos establecimientos con cruza con *Bos indicus* tuvieron niveles de inestabilidad similares a los de *Bos taurus*; resultados que conciben con Bock y col. (2004) quienes afirman que las cruza índicas con británicas son susceptibles a contraer la tristeza parasitaria siempre y cuando las proporciones de sangre *Bos indicus* sean menores a 50%, situación en la que se encontraban estos establecimientos.

El hecho de que los establecimientos tuvieran al menos tres principios activos eficaces para combatir la garrapata, nos permitió realizar un tratamiento

generacional considerando todas las categorías de los animales, algunas de ellas susceptibles a nematodos gastrointestinales. Como principio general, se propuso que los establecimientos que tenían sobreaño, utilizaran ivermectina para la primera generación (agosto) para poder controlar conjuntamente las larvas hipobióticas de *Ostertagia ostertagi* cuyo pico mayor es en octubre- noviembre. A los establecimientos restantes también se les aconsejó tratar con ivermectina siempre y cuando no hubieran sido detectada resistencia.

Se aconsejó para la segunda generación, de forma general el uso de fipronil para simultáneamente controlar a *Haematobia irritans* cuyo primer pico es en diciembre (Castro Janer y col., 2008). Debido a que un establecimiento presentó resistencia a este producto, se sugirió la utilización de fluazurón. Para el control de la tercera generación de garrapatas (fines de febrero), se les sugirió a los establecimientos que no contaban con baño de inmersión, la utilización de fluazurón. Con esta recomendación se disminuyen los costos ya que se está realizando la aplicación sobre animales con pelaje de verano, y se maximiza la acción del *pour-on*. Ocho de los nueve establecimientos con baño de inmersión presentaron cierto grado de resistencia a cipermetrina, y baja o nula resistencia a amitraz; por dicha razón en estos casos se priorizó el uso de amitraz. Solamente en el establecimiento N° 16, se recomendó el uso de la cipermetrina dado a que no tenía resistencia a este compuesto, pero sí para amitraz. El alto número de establecimientos resistentes a cipermetrina era de esperarse, ya que desde mediados de los 90 se constató resistencia a este principio y se ha reportado su incremento en los últimos años. Por otro lado, la utilización de los piretroides sintéticos fue mayor debido a su costo más competitivo que amitraz (Cardozo y Franchi., 1994; Cuore, 2006).

Todos los establecimientos presentaron cierto grado de resistencia a los garrapaticidas, por lo que se les ha sugerido incorporar otro tipo de manejo para el control de la garrapata. Hace más de diez años que se está promoviendo, acertadamente, el control integrado de parásitos (CIP), el cual acepta animales con cargas parasitarias que no provoquen pérdidas de significancia (Nari y col., 2013; Cuore, 2016), por lo que es importante establecer un umbral de infestación. A aquellos establecimientos con alta presencia de garrapatas y con mayor compromiso de la eficacia de los principios activos que aún controlaban esta plaga, se les propuso manejar animales centinelas. Se les sugirió identificar 20 bovinos al azar a los cuales se les contaría las garrapatas (partenóginas) semanalmente (Mendes, 2015). Se establecería un umbral (mínimo de número de garrapatas) que cuando fuera sobrepasado se debería realizar el tratamiento. Con este manejo, también se esperaría una mejor relación costo-beneficio, ya que se disminuye el número de tratamientos y se retrasa la aparición de resistencia (Nari y col., 2013). En estos casos igualmente se mantuvo el concepto de tratamiento generacional, rotando los principios activos de acuerdo a la época y generación. También se les propuso la utilización de sangre índica en los rodeos para los que tenían cruza, que tienen una marcada resistencia a la infestación de garrapatas (Hernández, 2005).

7. CONCLUSIONES

- Se debe fomentar la utilización de las hemovacunas ya que la inestabilidad enzoótica para hemoparásitos fue la situación más frecuente en los establecimientos estudiados.
- El control de la garrapata es la propuesta más factible para acompañar la premunición en los establecimientos estudiados, ya que el riesgo de reintroducción de garrapatas es alto debido a la falta de potreros de cuarentena, pastoreo de ganado en la calle e infestación de garrapatas en los campos vecinos.
- Para llevar a cabo un plan de control de tristeza parasitaria se debería implementar en zonas endémicas el uso de la hemovacuna en la categoría de terneros al destete. La erradicación de *R. microplus* es otra estrategia para el control, adoptando medidas de vigilancia epidemiológica extremas que eviten la reintroducción de garrapatas. Además, teniendo presente las formas de transmisión de la anaplasmosis debemos adoptar medidas de bioseguridad en cuanto a la desinfección de instrumental contaminados, control de dípteros hematófagos con el fin de prevenir la transmisión de la enfermedad.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ávila, D. (1998). Análisis cuantitativo de los costos a nivel país y del productor por la presencia de la garrapata en el Uruguay. Informe IAEA-DILAVE-MGAP. 2p. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/>. Fecha de consulta: 11/10/2017
2. Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*; 129(S1):247-269.
3. Brown, C. G. D., Hunter, A. G., Luckins, A. G. (1990). Diseases caused by protozoa. *Handbook of Animal Diseases in the Tropics*. 4ª Ed, (Cambridge, Cambridge University Press, UK); 385p.
4. Bolívar, A. M. (2013). Metodología diagnóstica para hemoparásitos dentro de la ganadería bovina con énfasis en la reacción en cadena de la polimerasa y su variante múltiple. *Revista de Salud Animal*; 35(1):1-9.
5. Buroni Zeni, F. (2014). Caracterización de la demanda de diagnóstico en bovinos y ovinos en el período 1993-2013, utilizando una base de datos relacional en el litoral oeste de Uruguay. Tesis de maestría, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. 64p.
6. Callow, L. L. (1984). Animal health in Australia. Protozoal and rickettsial diseases. Australian Government Publishing Service; V 5: 264p.
7. Cardozo, H. (1995). Situación de la resistencia del *Boophilus microplus* en el Uruguay. Medidas para controlarla. Seminario Internacional de Parasitología Animal. Resistencia y Control de Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria. SAGAR-CANIFARMA-FAOIICA-INIFAP. México. pp.11-13.
8. Cardozo H., Franchi M. (1994). Epidemiología y control de *Boophilus microplus*. En: Nari, A., Fiel, A. Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos; Bases epidemiológicas para su prevención y control. Montevideo. Ed. Hemisferio Sur. pp.369-407.
9. Cardozo, M. (1989). Historia y control de erradicación de la garrapata. La erradicación de las garrapatas. FAO. Roma. 45-58p.
10. Carriquiry, R. (2010). Tristeza parasitaria: causas y prevención. Disponible en https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R134/R_134_56.pdf. Fecha de consulta: 11/10/2017.
11. Castro, E., Gil, A., Piaggio, J., Chifflet, L., Farias, N. A., Solari, M. A., & Moon, R. D. (2008). Population dynamics of horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.)(Diptera: Muscidae), on Hereford cattle in Uruguay. *Veterinary Parasitology*; 151(2-4):286-299.
12. Cuore, U. (2016). Estado de la resistencia a los garrapaticidas en Uruguay. 9p.
13. Cuore, U. (2006). Resistencia a los acaricidas, manejo y perspectivas. XXXIV Jornadas de Buiatría del Uruguay, Paysandú. pp.30-35.
14. Cuore, U., Acosta, W., Bermúdez, F., Da Silva, O., García, I., Pérez Rama, R., Solari, M. A. (2015). Tratamiento generacional de la garrapata. Aplicación de una metodología en un manejo poblacional para la erradicación de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistentes a lactonas macrocíclicas. *Veterinaria (Montevideo)*; 51(198):2-2.

15. Cuore, U., Altuna, M., Cicero, L., Fernández, F., Luengo, L., Mendoza, R., & Trelles, A. (2012). Aplicación del tratamiento generacional de la garrapata en la erradicación de una población multirresistente de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*; 48(187):5-13.
16. Cuore, U., Cardozo, H., Trelles, A., Nari, A., Solari, M. A. (2008a). Características de los garrapaticidas utilizados en Uruguay. Eficacia y poder residual. *Veterinaria (Montevideo)*; 43(Suppl 169):13-24.
17. Cuore, U.; Solari, MA; Cicero, L; Gayo, V; Nari, A; Trelles, A. (2008b). Tratamiento generacional de la garrapata. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/direccion-general-de-servicios-ganaderos/laborato/parasitologia/publicacionesrios-veterinarios>. Fecha de consulta: 11/10/2017.
18. Cuore, U., Trelles, A., Sanchís, J., Gayo, V., Solari, M. A. (2007). Primer diagnóstico de resistencia al Fipronil en la garrapata común del ganado *Boophilus microplus*. *Veterinaria (Montevideo)*; 42:35-41.
19. Cuore, U., Solari, M. A. (2014). Poblaciones multirresistentes de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*; 50:4-13.
20. Cuore, U., Solari, M. A., Cicero, L., Trelles, A., Gayo, V., Nari, A. (2009). Evaluación de los garrapaticidas actualmente disponibles en Uruguay para su utilización en los despachos de tropa. *Veterinaria (Montevideo)*; 45:23-30.
21. Dalglish, R. J. (1993). Babesiosis. *Immunology and Molecular Biology of Parasite Infections*. Oxford, Blackwell. Warren, S. K. pp.352–383.
22. De Vos, A. J. (1979). Epidemiology and control of bovine babesiosis in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*; 50(4):357-362.
23. Draghi, MG; Cetra, B; Ramírez, LM y Vanzini, VR (1997). Anaplasmosis y Babesiosis. INTA EEA Mercedes, Corrientes, Argentina. Serie Técnica N°28. pp.137-190.
24. Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rurangirwa, F. R. (2001). 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 ag'nt'as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 51(6):2145-2165.
25. Errico, F.; Nari, A.; Cuore, U. (2009). Una nueva ley de lucha contra la garrapata *Boophilus microplus* en el Uruguay. *Rev. Plan Agropecuario (Montevideo)*; 131:42-47.
26. FAO (2004). Resistance management and integrated parasite control in ruminants. Guidelines. Animal Production and Health Division. FAO. Rome: 1. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/ag014e/ag014e00.pdf> c 11/10/2017. Fecha de consulta: 22/11/2017.
27. FAO (2003). Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en

- América Latina. Serie Producción Animal y Sanidad Animal. No 157. FAO. Roma. 55p. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Joao_Martins28/publication/234058021_Resistencia_a_los_antiparasitarios_Estado_actual_con_énfasis_en_America_Latina_Estudio_FAO_Produccion_y_Sanidad_Animal_157/links/0a85e53c84266c0579000000/Resistencia-a-los-antiparasitarios-Estado-actual-con-énfasis-en-America-Latina-Estudio-FAO-Produccion-y-Sanidad-Animal-157.pdf Fecha de consulta: 21/02/2019.
28. FAO (1984). Ticks and tick-borne disease control. A practical field manual, Vol. 11. Rome, Italy,; 2º Ed. Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF8551017> Fecha de consulta: 11/10/2017.
 29. Fiel, C., Nari, A. (2013). Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes: fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control. Montevideo, Hemisferio Sur. 752p.
 30. Goff, W. L., Johnson, W. C., Parish, S. M., Barrington, G. M., Tuo, W., Valdez, R. A. (2001). The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. *Parasite Immunology*; 23(9):463-471.
 31. Gonçalves, P. M. (2000). Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. *Ciência Rural*, 30(1):187-194.
 32. Gonzales Andrade, I., Vega y Murguía, C. A., Rodríguez Camarillo, S., Juárez Flores, J., Fernández Ruvalcaba, M., López Sánchez, F. (1983). Experiencias con la prueba de aglutinación en tarjeta para el diagnóstico serológico de anaplasmosis (PATA). *Técnica Pecuaria en México*; 44:35-40.
 33. Gonzales J.C. (2003). O Controle do Carrapato do Boi. 3ª ed. Passo Fundo. Universidade de Passo Fundo; 128p.
 34. Guglielmone, A. A. (1995). Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*; 57(1-3):109-119.
 35. Hernández, F. (2005). El manejo integrado en el control de garrapatas. *Manual de Ganadería Doble Propósito*. Venezuela; 17:384-391.
 36. Hooker WA (1909). The geographical distribution of American ticks. *J Econ Entomol* 2:403–428.
 37. IICA (1987). Técnicas para el diagnóstico de Babesiosis y Anaplasmosis bovina. Comité de expertos sobre hematozoarios del área Sur del IICA. San José, Costa Rica. pp. 1-79. Disponible en: <http://repiica.iica.int/docs/B1335E/B1335E.PDF>. Fecha de consulta: 11/10/2017.
 38. Kessler, R. H. (2001). Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*; 21(4):177-179.
 39. Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., & Ewing, S. A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*; 167(2-4):95-107.

40. Kocan, K. M., De la Fuente, J., Guglielmone, A. A., Meléndez, R. D. (2003). Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical Microbiology Reviews*; 16(4):698-712.
41. Kuttler, K. L. (1984). *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: a review. *Journal of Wildlife Diseases*; 20(1):12-20.
42. Kuttler, K. L., Zaugg, J. L., Johnson, L. W. (1984). Serologic and clinical responses of preimmunized, vaccinated, and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale* isolates. *American Journal of Veterinary Research*; 45(11):2223-2226
43. Laboratorio BioSur (2018). HemoVac C Vacuna trivalente para *Babesia* y *Anaplasma*. Folleto informativo Disponible en: https://docs.wixstatic.com/ugd/9c91a6_09815731a1b74a0b8ff33165f2428454.pdf Fecha de consulta 24/11/2018.
44. Levine, N. D. (1971). Taxonomy of the piroplasms. *Transactions of the American Microscopical Society*; 90(1): 2-33.
45. Lignières, J. (1903). Bovine babesiosis. New investigations and observations on the multiplicity, the evolution and natural transmission of the parasites involved in the disease and on vaccination. *Archives de Parasitologie*; 7:398-407.
46. Mahoney, D. F., Mirre, G. B. (1979). A note on the transmission of *Babesia bovis* (syn *B. argentina*) by the one-host tick, *Boophilus microplus*. *Research in Veterinary Science*; 26(2):253-254.
47. Mahoney, D. F., Mirre, G. B. (1971). Bovine babesiosis: estimation of infection rates in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*; 65(3):309-317.
48. Mahoney, D. F., Ross, D. R. (1972). Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Australian Veterinary Journal*; 48(5):292-298.
49. Mahoney, D. F., Wright, I. G., Mirre, G. B. (1973). Bovine babesiosis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *B. bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infection. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*; 67(2):197-203.
50. MAP (1910). Ley 3606. Ley de Policía Sanitaria de los Animales. p. 1-10. Disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/leyes/3606-1910/2> Fecha de consulta: 21/02/2019.
51. Mehlhorn, H y Schein, E (1985). The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Advances in Parasitology*; 23:37-103.
52. Mendes, M. C. (2015). Controle estratégico do carrapato dos bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, no Estado de São Paulo. Veríssimo CJ. Resistência e controle do carrapato-do-boi. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia. pp.114-123.
53. Miraballes C, Riet-Correa F, Fuellis C, Araoz V (2018). Control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y de la tristeza parasitaria. *Revista INIA Montevideo*; 52:15–19.

54. Miraballes, C., Riet-Correa, F. (2018). A review of the history of research and control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, babesiosis and anaplasmosis in Uruguay. *Experimental and Applied Acarology*. pp.1-16.
55. Muñoz-Guarniz, T. R., Ayora-Fernández, P., Luzuriaga-Neira, A., Corona-González, B., Martínez-Marrero, S. (2017). Prevalencia de *Anaplasma marginale* en bovinos de la provincia Zamora Chinchipe, Ecuador. *Revista de Salud Animal*; 39(1):68-74.
56. Nari, A. (1995). Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Veterinary Parasitology*; 57(1-3):153-165.
57. Nari, A. Solari, M.A. (1990). Desarrollo y utilización de vacuna contra *Boophilus microplus*, babesiosis y anaplasmosis, perspectiva actual en el Uruguay. XVIII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú. 20p.
58. Nari, A., Bawden, R., Berdié, J., Canábez, F., Cardozo, H. (1979). Estudio preliminar sobre la ecología de *Boophilus microplus* (Can) en Uruguay: ciclo no parasitario en un área considerada poco apta para su desarrollo. VI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú. 8p.
59. Nari, A., Solari, M. A., Cuore, U., Lima, A., Casaretto, R., Valledor, S. (2013). Control integrado de parásitos en establecimientos comerciales del Uruguay. En: Fiel, C., Nari, A. (2013). Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Buenos Aires. Hemisferio Sur. pp.589-604.
60. OIE (World Organization for Animal Health) (2010): Bovine babesiosis Terrestrial Animal Health Code. Paris, OIE; pp.1-15.
61. Ortiz, EB; Palencia, NP; Gerds, OV; Hurtado, ÓB (2012). Criterios y protocolos para el diagnóstico de hemoparásitos en bovinos. *Revista Ciencia Animal*; 5:31-49.
62. Perry, B. D. (1996). Epidemiology indicators and their application to the control of tick-borne diseases. *Manual on tick and tick-borne disease control*. Rome, FAO, 13p.
63. Perry, B. D., Chamboko, T., Mahan, S. M., Medley, G. F., Minjauw, B., O'Callaghan, C. J., Peter, T. F. (1998). The economics of integrated tick and tick-borne disease control on commercial farms in Zimbabwe; 29(1): 21-29.
64. Plan de sensibilización y extensión en control de garrapata y tristeza parasitaria (2016). ¿Por qué es importante controlar la garrapata? Disponible en:
http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/cartilla_informativa_para_productores.pdf Fecha de consulta: 16/11/2017.
65. Purnell R. E. (1981). Babesiosis in various hosts. En: Ristic M, Kreier J. Babesiosis. New York: Academic Press. pp.25-31.
66. Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., Hinchcliff, K. W. (2002). Enfermedades causadas por Rickettsias. *Medicina Veterinaria*; 2:1495-1500.

67. Ramsay, G. C. (1997). Setting animal health priorities: a veterinary and economic analysis with special reference to the control of *Babesia bovis* in central Queensland. The University of Queensland. 357p.
68. Reck, J., Klafke, G. M., Webster, A., Dall'Agnol, B., Scheffer, R., Souza, U. A. de Souza Martins, J. R. (2014). First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Veterinary Parasitology*; 201(1-2):128-136.
69. Riek, R. F. (1963). Immunity to babesiosis. In *Immunity to Protozoa*. Pierce, A. E. & Roitt, I. (1963), Oxford, Blackwell. Garnham. pp.160–179.
70. Ristic, M., Watrach, A. M. (1963). Anaplasmosis. VI. Studies and a hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. *American Journal of Veterinary Research*; 24, 267p.
71. Rodríguez N. (1992). Infección experimental por *Babesia* spp. en bovinos. 1er. Taller internacional sobre diagnóstico y control de anaplasmosis y babesiosis en rumiantes. UADY. FMVZ. Yucatán, México; 24: 267-277
72. Rubino MC. (1946). Garrapata - tristeza - premunición. En: Rubino MC. *Compilación de trabajos científicos del Dr. Miguel C. Rubino*. Montevideo, Ed. Imp. Uruguaya, pp.113- 131.
73. Sanchís, J., Cuore, U., Gayo, V., Silvestre, D., Invernizzi, F., Trelles, A., Solari, M. A. (2008). Estudio sobre la ecología del *Boophilus microplus* en tres áreas del Uruguay. XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay. 6p.
74. Saporiti, T. (2018) Resultados de resistencia de *Rhipicephalus microplus* a los acaricidas en la region norte. VI Jornadas de actualización en salud animal en bovinos. Tacuarembó, Uruguay. Disponible en: <http://www.inia.uy/Documentos/P%C3%BAblicos/INIA%20Tacuaremb%C3%B3/2018/Destacada%20VI%20jornada%20salud%20bovinos/Viernes/Pruebas%20de%20resistencia%20Dra.%20Tatiana%20Saporiti.pdf> Fecha de consulta: 18/11/2018.
75. Singleton, E. F. (1974). The effect of heat on reproductive function in the bull. thesis, The University of Queensland. 62p.
76. Smith, T., Kilborne, F. L. (1893). Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. US Government Printing Office. 11p.
77. Smith, R. D., Evans, D. E., Martins, J. R., CeresÉr, V. H., Correa, B. L., Petraccia, C., Nari, A. (2000). Babesiosis (*Babesia bovis*) stability in unstable environments. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916(1): 510-520.
78. Solari, M A. (2006). Epidemiología y perspectivas en el control de hemoparásitos. XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, pp.36-40.

79. Solari, M A. (1991). Aspectos de la dinámica integral del *Boophilus microplus* y *Babesia* spp. en Uruguay. X Congreso Latinoamericano de Parasitología, I Congreso Uruguayo de Parasitología, Montevideo, Uruguay. 12p.
80. Solari, M.A., Dutra, F., Quintana, S., (2013). Epidemiología y prevención de los hemoparásitos (*Babesia sp.* y *Anaplasma marginale*) en el Uruguay. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Fiel C., Nari A. (2013). Montevideo. Hemisferio Sur. pp.689-714.
81. Späth, E. J. A. (1986). Un estudio epidemiológico de babesiosis y anaplasmosis bovina en el Valle de Lerma, provincia de Salta. Revista Médica Veterinaria. (Bs. As.); 67:274-281.
82. Sserugga, J. N., Jonsson, N. N., Bock, R. E., More, S. J. (2003). Serological evidence of exposure to tick fever organisms in young cattle on Queensland dairy farms. Australian Veterinary Journal; 81(3):147-152.
83. Stone, B. F., Haydock, K. P. (1962). A method for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). Bulletin of Entomological Research; 53(3):563-578.
84. Uilenberg, G. (1995). SInternational collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. Veterinary Parasitology: 57(1-3):19-41.
85. Van Veen, T. S. (1997). Sense or nonsense? Traditional methods of animal parasitic disease control. Veterinary Parasitology; 71(2):177-194.
86. Vanzini, V. R., Ramírez, L. M. (1994). Babesiosis y Anaplasmosis Bovina: Diagnóstico, epidemiología y control. RIA 25(3):137-190.
87. Vidotto, O., Marangoni Marana, E. R. (2001). Diagnóstico em anaplasnose bovina. Ciência Rural; 31(2):361-368.
88. Weber, G., Friedhoff, K. T. (1977). Preliminary observations on the ultrastructure of supposed sexual stages of *Babesia bigemina* (Piroplasma). Zeitschrift für Parasitenkunde; 53(1):83-92.
89. Wright, I. G., Goodger, B. V., Buffington, G. D., Clark, I. A., Parrodi, F., Waltisbuhl, D. J. (1989). Immunopathophysiology of babesial infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(Supplement). pp. 11-11.
90. Zaugg, J. L., Goff, W. L., Foreyt, W., & Hunter, D. L. (1996). Susceptibility of elk (*Cervus elaphus*) to experimental infection with *Anaplasma marginale* and *A. ovis*. Journal of Wildlife Diseases; 32(1):62-66.