

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* Y *Anaplasma marginale* EN ESTABLECIMIENTOS DEL DEPARTAMENTO DE TACUAREMBÓ

POR

BARIANI COMMAND, María Magdalena

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

2018

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dra. Zully Hernández

Segundo Miembro (Tutor):

Dra. Eleonor Castro

Tercer Miembro:

Dra. María Teresa Armúa

Cuarto Miembro:

Dra. Cecilia Miraballes

Quinto Miembro

Dra. Stephanie Lara

Fecha:

Autor:

María Magdalena Bariani Command

AGRADECIMIENTOS

- ✓ A la Facultad de Veterinaria por permitir mi formación académica y brindarme las herramientas para ser una profesional.
- ✓ A INIA Tacuarembó que me brindó el espacio físico para realizar mi trabajo.
- ✓ A los técnicos de la DILAVE Tacuarembó que me permitieron utilizar su microscopio de inmunofluorescencia.
- ✓ A Cecilia Miraballes y Stephanie Lara por haberme acompañado en todo el proceso desde el primer día.
- ✓ A Elinor Castro por su dedicación y sus conocimientos.
- ✓ A Rosina Vilaró y Alejandra Lasso de Biblioteca que me ayudaron con la información.
- ✓ A mi familia que siempre estuvo a mi lado.
- ✓ A mis amigos que son lo mejor que me dejó la Facultad.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	5
RESÚMEN	6
SUMMARY	7
1 INTRODUCCIÓN	8
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 <i>Babesia</i> spp.	14
2.1.1 Clasificación.....	14
2.1.2 Morfología.....	14
2.1.3 Ciclo biológico.....	15
2.2 <i>Anaplasma marginale</i>	17
2.2.1 Morfología.....	17
2.2.2 Ciclo biológico.....	18
2.3 Tristeza parasitaria.....	19
2.3.1 Signos clínicos tristeza parasitaria.....	20
2.3.2 Datos de necropsia	20
2.3.3 Técnicas diagnósticas.....	21
2.3.4 Tratamiento, medidas de control y prevención.....	22
2.4. Caracterización del problema	23
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo general.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4 MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1 Reseña de los establecimientos	24
4.2 Animales	25
4.3 Técnica de inmunofluorescencia indirecta	26
4.4 Técnica de Card Test	27
4.5 Criterio de análisis de los resultados	29
5 RESULTADOS	29
6 DISCUSIÓN	32
7 CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS	34
8 BIBLIOGRAFÍA	35

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1: Clasificación taxonómica de <i>Babesia</i> spp.....	14
TABLA 2: Porcentaje de seropositividad de los tres agentes causantes de tristeza parasitaria en bovinos adultos y de sobreaño.....	30
FIGURA 1: Zonas epidemiológicas de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> en el Uruguay. Fuente: MGAP-DIGESEGA, 2009.....	9
FIGURA 2: Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus microplus</i> . Fuente: Nuñez y col., 1982.....	12
FIGURA 3: Modelo epidemiológico conceptual de <i>Rhipicephalus microplus</i> en Uruguay. Fuente: Nari,1990.....	13
FIGURA 4: A) <i>Babesia bigemina</i> en eritrocitos bovinos. Frotis teñido con Giemsa. B) <i>Babesia bovis</i> en eritrocitos bovinos. Frotis teñido con Giemsa. Fuente: Mosqueda y col., 2012.....	15
FIGURA 5: Ciclo biológico de <i>Babesia bovis</i> . Fuente: Mosqueda y col.,2012.....	16
FIGURA 6: <i>Anaplasma marginale</i> en eritrocitos bovinos. Frotis teñido con Giemsa. Fuente: Salih y col., 2015.....	18
FIGURA 7: Ciclo de desarrollo de <i>Anaplasma marginale</i> en bovinos y garrapatas (Kocan y col., 2003).....	19
FIGURA 8: Distribución geográfica de los establecimientos con los que se trabajó.....	25
FIGURA 9: Portaobjetos con cuadrantes para IFI. Cuadrantes: Controles positivos (CP); Inespecífico (C Inesp); Control negativo (CN). Resto de los cuadrantes para sueros problemas.....	26
FIGURA 10: Placa de aglutinación para diagnóstico de <i>Anaplasma marginale</i> . Cuadrículas N°1 a N°10 suero problema. Cuadrícula N° 11 Control negativo. Cuadrícula N°12 Control positivo.....	28
FIGURA 11: Diagnóstico de situación de desequilibrio enzoótico de hemoparásitos en 9 establecimientos del Departamento de Tacuarembó.....	31

RESÚMEN

La garrapata *Rhipicephalus microplus* es uno de los ectoparásitos más importantes que afecta al ganado bovino debido a las pérdidas que ocasiona. Es el único transmisor de *Babesia bovis* y *B. bigemina*, así como uno de los vectores de *Anaplasma marginale*, agentes de la tristeza parasitaria bovina, lo que aumenta su importancia.

Los perjuicios que generan estos hemoparásitos pueden ser muy graves por las pérdidas directas e indirectas que ocasionan en los establecimientos agropecuarios del País, estando su control legislado desde hace muchas décadas.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal realizar el diagnóstico de seroprevalencia de *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale* en 9 establecimientos dedicados a la cría bovina ubicados en el Departamento de Tacuarembó que sólo controlaban la garrapata y no los hemoparásitos. Dicho Departamento se encuentra dentro de la denominada zona de control para *R. microplus* y es frecuente que estos establecimientos estén en inestabilidad enzoótica, sin conocimiento del productor. Se utilizó el suero de aproximadamente 15 bovinos adultos y 15 terneros de sobreaño, para cada establecimiento. Se aplicó la técnica de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de anticuerpos contra *B. bigemina* y *B. bovis*, y la técnica de Card Test para el diagnóstico de anticuerpos contra *A. marginale*. Para cada técnica se utilizaron controles positivos y negativos. Todos los establecimientos se encontraban en inestabilidad enzoótica por lo menos para uno de los agentes de tristeza parasitaria.

Los resultados obtenidos sugieren que en cualquiera de los establecimientos puede surgir un brote de tristeza parasitaria por lo que se recomienda que se incorpore la utilización de la hemovacuna a sus planes sanitarios.

SUMMARY

Rhipicephalus microplus (cattle tick) is one of the most important ectoparasites in the world due to the losses it produces. It is the only transmitter of *Babesia bovis* and *B. bigemina*, and one of the vectors of the *Anaplasma marginale*, which increases its importance.

The damages generated by these hemoparasites in Uruguay can be very serious due to the direct and indirect losses that produces in farms. Control of these parasites has been legislated during decades.

The present study aims to perform a diagnosis of seroprevalence in 9 breeding farms located in the Department of Tacuarembó, Uruguay, which only controlled the tick and not the hemoparasites. This department is located in an area of *R. microplus* control where the enzootic instability is frequent without the farmer knowledge. Serum was used from 15 adult bovines and 15 super aged, for each establishment. The indirect immunofluorescence technique was applied for the diagnosis of antibodies against *B. bigemina* and *B. bovis*, and the Card Test technique for the diagnosis of antibodies against *A. marginale*. For each technique, positive and negative controls were used.

All the establishments were in enzootic instability to at least one of the agents of sadness. The results obtained suggest that an outbreak of parasitic sadness may arise in any of the farms, which is why the implementation of the hemovaccine to their control plan is recommended

1 INTRODUCCIÓN

Las garrapatas y las enfermedades que éstas transmiten constituyen una de las principales limitantes sanitarias en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. En estas regiones la ganadería es una importante fuente de ingreso y uno de los principales recursos alimenticios (Vanzini y Ramirez,1994). El 80% del ganado bovino del mundo se encuentra afectado por *Rhipicephalus microplus* e incluso existen regiones en las cuales la ganadería no se ha podido establecer a causa de esta problemática (FAO, 2004).

Debido a que las garrapatas son parásitos obligatorios, se han distribuido por todo el mundo con sus hospederos (Romano,1994). En el transcurso de los siglos XVI a XVIII, *R. microplus* se introdujo en América junto con el ganado en pie traído por los conquistadores y al encontrar tierra fértil para el desarrollo, los bovinos y sus parásitos se expandieron rápidamente por todo el continente (Cardozo y Franchi,1994).

Uruguay es un país con tradición en la lucha contra la garrapata común del ganado (*R. microplus*). La ley 3.606 del 13 de abril de 1910 contemplaba específicamente el control de la tristeza parasitaria entre las enfermedades de los animales que darían lugar a la aplicación de medidas sanitarias. Posteriormente, en 1926, se resolvió legislar también la garrapata, dado que no era posible combatir la tristeza sin controlar la garrapata que la transmite (artículo 2º de la ley del 13 de abril de 1910). Trabajos realizados por el Dr. Miguel C. Rubino en la década de 1930 relacionados con “Garrapata, Tristeza y Premunición” destacaban la importancia de los hemoparásitos en la salud y producción pecuaria de Uruguay (Solari,2006). En 1940, se promulgó la primera Ley de “Lucha contra la garrapata” (Ley N° 9.965) y por decreto se creó el “Servicio de protección contra la tristeza” (Pasturino y Quiñones,1963). En 1953, luego de haber logrado la erradicación de los brotes al sur y sureste del país, se aprueba una nueva ley que determina la erradicación de la garrapata en todo el territorio nacional.

En 2008 se aprobó la Ley N°18.268 actualmente vigente, que divide al país según el riesgo epidemiológico, determinando que no existen posibilidades de erradicar el parásito. Los establecimientos son categorizados basados en su ubicación geográfica, carga parasitaria, resistencia a los acaricidas y riesgo de enfermedades asociadas. Por lo tanto, se establece una normativa que divide al país en zonas donde se debe erradicar o controlar a la garrapata (Errico y col., 2009).

Dichas zonas son las siguientes y se ilustran en la Figura 1: 1.*Zona o Área Libre*: es aquella en la cual no está presente la garrapata, ya sea por intervención planificada por la Autoridad Sanitaria y/o por condiciones ambientales en la cual no prospera el ectoparásito; 2.*Zona o Área de Control*: es aquella en la cual la garrapata se encuentra presente y la Autoridad Sanitaria establece medidas tendientes a disminuir la prevalencia del ectoparásito y de las enfermedades transmitidas por el mismo (MGAP-DIGESEGA, 2009).

ZONAS EPIDEMIOLÓGICAS DE GARRAPATA

Boophilus microplus



Fuente: DSA/Departamento de Programas Sanitarios

Figura 1: Zonas epidemiológicas de la garrapata *Rhipicephalus microplus* en el Uruguay.
Fuente: MGAP-DIGESEGA, 2009.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En América, existen varios géneros de garrapatas parasitando a los bovinos. La especie más importante es *R. microplus* debido a las pérdidas causadas por su acción expoliatriz y por la transmisión de agentes de enfermedades. Aunque Uruguay se encuentra ubicado en una zona marginal para el desarrollo de *R. microplus*, el 70% de los establecimientos ubicados al Norte del Río Negro y el 45% de los del Sur se encuentran infestados con garrapata (Servicios técnicos MGAP). Este ectoparásito provoca pérdidas anuales estimadas en 32,8 millones de dólares (Ávila,1998).

De los cinco géneros de garrapatas presentes en nuestro país, la especie *R. microplus* es el vector responsable de transmitir a los bovinos dos protozoarios y una rickettsia: *Babesia bovis* y *B. bigemina*, agentes de la enfermedad denominada babesiosis, *Anaplasma marginale*, que causa la anaplasmosis. La anaplasmosis, a su vez, puede ser transmitida mecánicamente por dípteros hematófagos y fómites o de forma iatrogénica (Castro y Trenchi, 1955; Guglielmone,1995).Estos agentes son responsables del síndrome conocido como “tristeza parasitaria” y los perjuicios generados por éste pueden ser muy graves, ya sea por las pérdidas directas (muerte de animales y disminución de la producción de carne o leche) e indirectas (gastos en tratamientos, asistencia técnica y dificultad en la comercialización) que provocan (Sutherst y Kerr, 1986). En Uruguay, sólo por muertes y tratamientos, se han estimado pérdidas de 7,3 dólares por animal/año en establecimientos donde la garrapata está presente (Solari, 2006).

En el Departamento de Parasitología (MGAP) existe una historia epidemiológica que data de la década de 1980. De 308 casos clínicos, el 49,3% fueron causados por *B. bovis*, mientras que por *B. bigemina* fueron un 12,9% y *A. marginale* 37,8%. La dispersión fue similar en todo el país excepto en el área libre de garrapata (suroeste) donde no se registraron casos. Si bien estos datos son sesgados, se habla de una tendencia de presentación dado que el comportamiento se repite a través de los años por lo que se pueden tomar como indicadores de proyección (Solari, 2006). En 2003 en un estudio realizado para CODESA se obtuvo un diagnóstico parecido al histórico, con una coincidencia de 49% para *Babesia* spp y 51% para *Anaplasmosis* (informe a CODESA 2003, citado en Solari 2006).

Según registros de los laboratorios de diagnóstico de la División de Laboratorios Veterinarios Miguel C. Rubino (DILAVE), los cuales fueron recopilados durante 21 años (1993-2013) en Uruguay, se diagnosticaron 274 focos de hematozoarios, de los cuales 189 correspondían a *Babesia* spp (69%), 74 a *A. marginale* (27%) y 11 a ambos agentes (4%) (Buroni, 2014). La mortalidad global promedio de ambas enfermedades (babesiosis y anaplasmosis) fue estimada en 4,3% (Solari, 2006).

Rhipicephalus microplus es una garrapata de un sólo hospedero; pasa todos sus estadios de vida parasitaria (larva, ninfa y adulto) sobre un mismo animal. Esta fase parasitaria en la mayoría de los casos dura 23 días, con un rango de 20,5 a 42 días en casos extremos (Nuñez y col., 1982).

Las larvas son las que inician el ciclo parasitario. Luego de la eclosión de los huevos, éstas suben por las pasturas (geotropismo negativo) formando conglomerados a la espera de un hospedero. Las larvas poseen reservas que le permiten una importante supervivencia en el ambiente, la muerte de estas se debe al agotamiento de estas reservas, al frío y a la desecación (FAO, 2004). En Uruguay, se observó la mayor supervivencia de larvas nacidas entre abril y mayo, provenientes de las teleóginas

expuestas en febrero y marzo (109 a 188 días), sobreviviendo los meses fríos de invierno hasta noviembre (Cardozo y col., 1984).

La tasa de encuentro entre la larva y su hospedero está determinada en gran parte por la densidad de larvas disponibles en las pasturas, la dotación de hospederos susceptibles, la topografía del terreno y la época del año (Floyd, 1987). Del total de larvas que suben a un bovino muchas de ellas no logran fijarse y dentro de las primeras 24 horas el 90% de ellas pueden llegar a morir (Jonsson y Piper, 2007). En Uruguay se observó una mayor oferta de larvas en los meses de otoño, mientras que, en invierno la actividad larval disminuye y los bovinos susceptibles son parasitados en pequeñas cantidades (Cardozo y Franchi, 1994; Cuore y col., 2013).

Una vez en el bovino, la larva se alimenta y evoluciona a ninfa previa muda del exoesqueleto (metalarva). Es muy difícil visualizarla, dado que es muy pequeña (0,5-0,4mm). La larva es la encargada de transmitir a los bovinos *B. bovis*, la cual se encuentra en la glándula salival de la garrapata y cuando ésta succiona la sangre, reactiva e inyecta el agente (Riek, 1966).

La metalarva es la primera etapa de muda y aparece entre 3 a 4 días del ciclo. Su observación es más fácil dado que mide 1mm y es de color blanquecino. Una vez que transcurre la primera muda, a los 9 días del ciclo eclosiona la ninfa, la misma mide 1mm y se fija, se alimenta y luego se inmoviliza para dar comienzo a la segunda etapa de muda. La metaninfa, de mayor tamaño (2,5-4mm) aparece a los 13 días del ciclo. Posteriormente comienza la etapa de adulto, donde comienza la diferenciación sexual (Cardozo y Franchi, 1994). La ninfa y el adulto serán los encargados de inocular *B. bigemina* al bovino la cual se va acumulando en las glándulas salivales de la garrapata (Riek, 1964).

Los machos de *R. microplus* son los primeros en emerger. Miden 2,5 x 1,3mm y son muy móviles, se prenden y desprenden varias veces para alimentarse en búsqueda de hembras para fecundar. Es la única etapa que puede pasar de un bovino a otro (Cuore y col., 2013). La relevancia de este estadio está relacionada con la transmisión de *A. marginale* de manera intraestadial que puede ser llevada a cabo por los machos adultos de las garrapatas (Kocan y col., 2000).

A partir de los 14,5 días del ciclo se observan las primeras neóginas, luego la partenógina la cual crece e incrementa su peso un 80%. Estas últimas comienzan a estar semi-ingurgitadas entre los días 17 y 18 esperando la cópula. Si no son fecundadas mueren en este estadio, de lo contrario continúan hasta completar el ciclo y pasar a teleógina que es cuando se ingurgita completamente de sangre, y se desprende del bovino, cayendo al suelo e iniciándose el ciclo no parasitario. En las últimas 24 horas de su fase parasitaria, las hembras adultas realizan la mayor ingesta de sangre y es aquí cuando se infestan con eritrocitos parasitados. Aunque existan parásitos circulantes sólo se infectarán las garrapatas en esta fase y no en estadios anteriores como larvas, ninfas o adultas (Callow, 1968). Cuanto mayor porcentaje de eritrocitos parasitados mayores serán las posibilidades de infectarse, aunque en distintas circunstancias se ha demostrado que el portador crónico de hemoparásitos es capaz de infectar a la garrapata (Solari, 1987; Solari y Quintana, 1994).

La teleógina, mide de 8 a 13mm y pesa aproximadamente 0,24 gramos. Las posturas máximas por teleógina varían entre los 1000 a 4500 huevos, considerándose que normalmente ponen alrededor de 2300 huevos (Bennet, 1974).

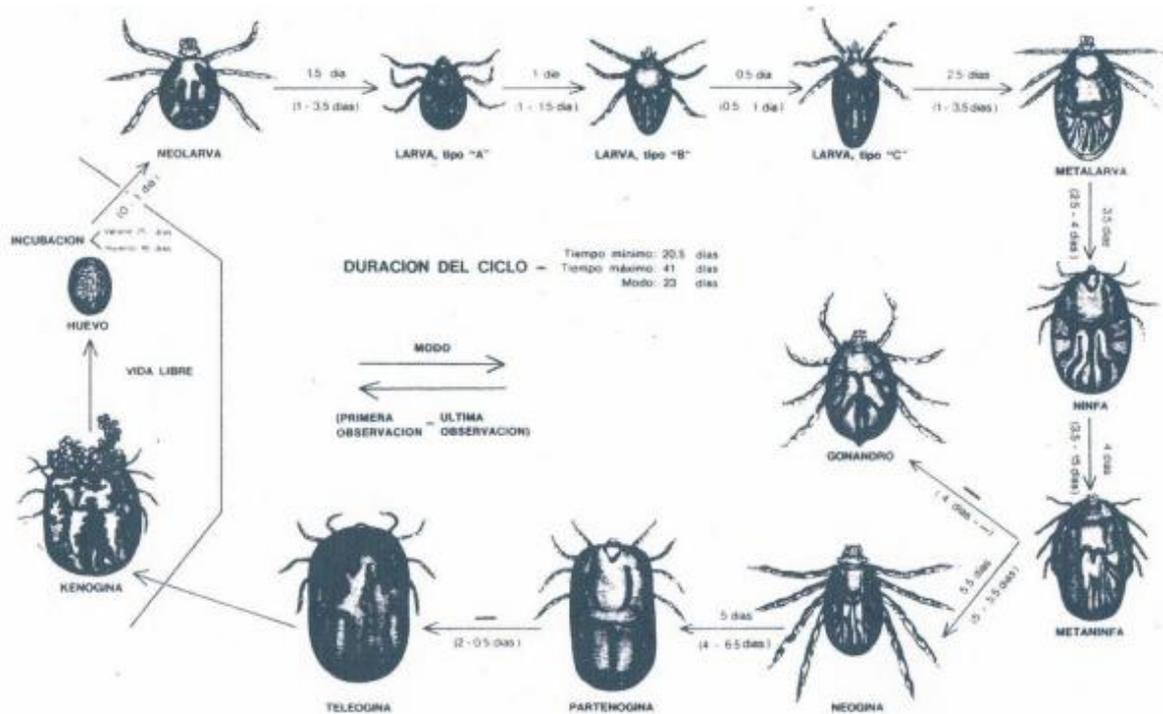


Figura 2: Ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus*. Fuente: Nuñez y col., 1982.

Una vez que la garrapata cae busca reparo (lugares sombríos y protegidos) y comienza la oviposición denominándose protoquia (Cardozo y Franchi, 1994). Cuando la teleógina comienza a ovipositar, se le denomina kenógina, y ambos estadios, conjuntamente con los huevos y las larvas son parte del ciclo no parasitario que, en condiciones naturales dura entre 2,5 a 10 meses como máximo. La duración de este período está influenciada por las condiciones de temperatura y humedad (Cuore y col., 2013).

El período entre el inicio y la finalización de la oviposición (ootoquia) dura en promedio 14 días, dependiendo de las condiciones climáticas. En condiciones ideales el porcentaje de eclosión llega al 85%, mientras que en condiciones adversas (verano o invierno) puede eclosionar sólo una parte de la masa de huevo o emerger pocas larvas viables. En invierno (mayo-julio) hay una interrupción del ciclo no parasitario, a menos que ocurra bajo la protección del monte (Sanchís y col., 2008). En la Figura 2 se esquematiza el ciclo biológico de *R. microplus*.

Desde 1975 en el Departamento de Parasitología de la DILAVE, se han llevado a cabo estudios sobre la ecología de *R. microplus* en diferentes zonas del país. Dichos estudios comprobaron que, dependiendo la zona y el año, se presentan de 1,5 a 3,5 generaciones/año y con una viabilidad máxima de 8 a 10 meses fuera del hospedero (Nari y col., 1979; Cardozo y col., 1984; Sanchis y col., 2008). La primera generación se presenta a la salida del invierno entre los meses de julio y noviembre con 0,2 a 3,4 garrapatas promedio por animal; la segunda generación transcurre en los meses de noviembre a febrero, fines de primavera y comienzo de verano y se encontraron 3,4 a 24,5 garrapatas por animal; el pico de la tercera generación (febrero a junio) se presenta en los meses de otoño, pudiéndose encontrar 24,4 a 417 garrapatas por animal (Petraccia y col., 1988; Cardozo y Franchi, 1994).

La supervivencia del parásito de la tercera generación a la primera generación del siguiente año estaría dada por las larvas provenientes de las teleóginas caídas en enero, febrero y marzo, así como por los huevos depositados por las garrapatas caídas en abril (Cuore y col., 2013).

Desde el punto de vista epidemiológico, la tercera generación es la más importante debido a que estas garrapatas aportarán una oferta importante de huevos y larvas que serán las encargadas de formar la primera generación del año próximo. Difícilmente el invierno interrumpa en forma total el desarrollo del ciclo no parasitario, esto puede suceder en aquellas teleóginas que caen en invierno que no ponen huevos (Cuore y col., 2013).

Junto con los estudios de dinámica poblacional (Petraccia y col., 1988), Nari y Solari (1990) diseñaron un modelo epidemiológico conceptual que se observa en la Figura 3.

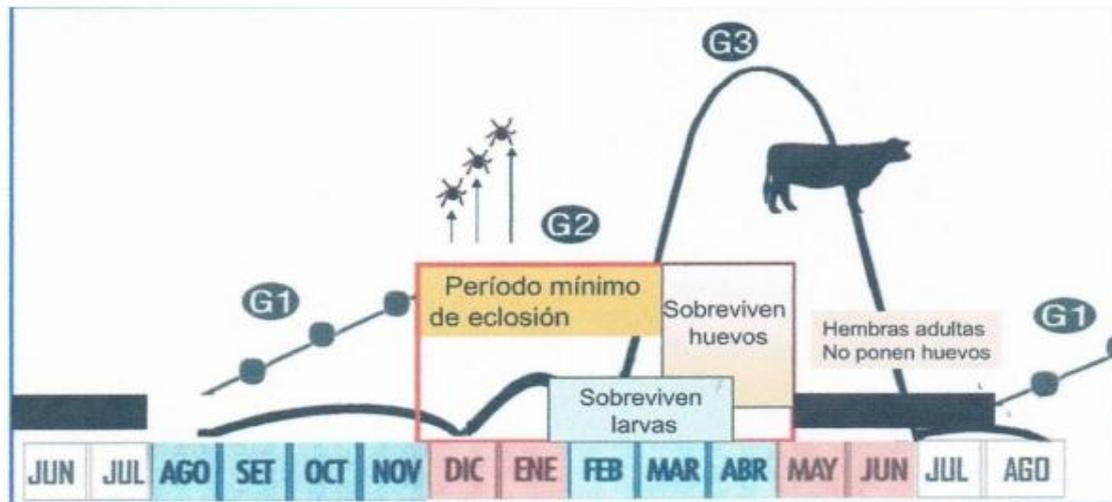


Figura 3. Modelo epidemiológico conceptual de *Rhipicephalus microplus* en Uruguay. Fuente: Nari, 1990.

Considerando las características del modelo la hipótesis del principal mecanismo epidemiológico de transmisión de *Babesia* spp. estaría basada en que la garrapata se re infecta en cada temporada (otoño) al coincidir con una alta población de bovinos parasitados con *R. microplus* y hemoparásitos (Solari, 2006).

2.1 *Babesia* spp.

Babés en 1888 en Rumania fue el primero en describir al parásito *Babesia* en la sangre de animales. A su vez, Smith y Kilborne (1893) demostraron que este protozooario intraeritrocitario era responsable de la Fiebre de Texas, un cuadro febril agudo que afectaba a los bovinos del Sur de Estados Unidos y que era transmitida por garrapatas. Ya en 1930 *Babesia* spp. había sido descrita en todas las especies de animales domésticos, su distribución geográfica era mundial y las garrapatas eran consideradas sus únicos hospederos invertebrados.

2.1.1 Clasificación

Levine (1971) describió la clasificación taxonómica de la clase piroplasmasida e incluyó 71 especies (Tabla 1). Todos sus hospederos definitivos identificados hasta el momento son garrapatas duras de la familia Ixodidae (Kuttler, 1988). La transmisión entre hospederos vertebrados siempre es interrumpida por una fase de reproducción sexuada en la garrapata.

TABLA 1: Clasificación taxonómica de *Babesia* spp.

Rama	Protozoa
Subrama	Apicomplexa
Clase	Piroplasmasida
Orden	Piroplasmorida
Familia	Babesiidae
Género	<i>Babesia</i>

Fuente: Levine (1971)

2.1.2 Morfología

Babesia. bigemina es grande, pleomórfica, se observa y se identifica por un par de corpúsculos en forma de pera, unidos en ángulo agudo dentro del eritrocito maduro. Miden entre 4 y 5µm de longitud, por 2 a 3µm de diámetro. Según la fase de desarrollo pueden aparecer formas redondeadas, ovaladas o irregulares (Soulsby, 1987). Mientras que *B. bovis*, es un parásito pequeño, piriforme, redondo o ameboide, algunos aparecen con una vacuola, dando el aspecto de anillos. Miden 2,4µm por 1,5µm (Quiroz, 2000). En la Figura 4 se observa la morfología característica de *B. bigemina* y *B. bovis*.

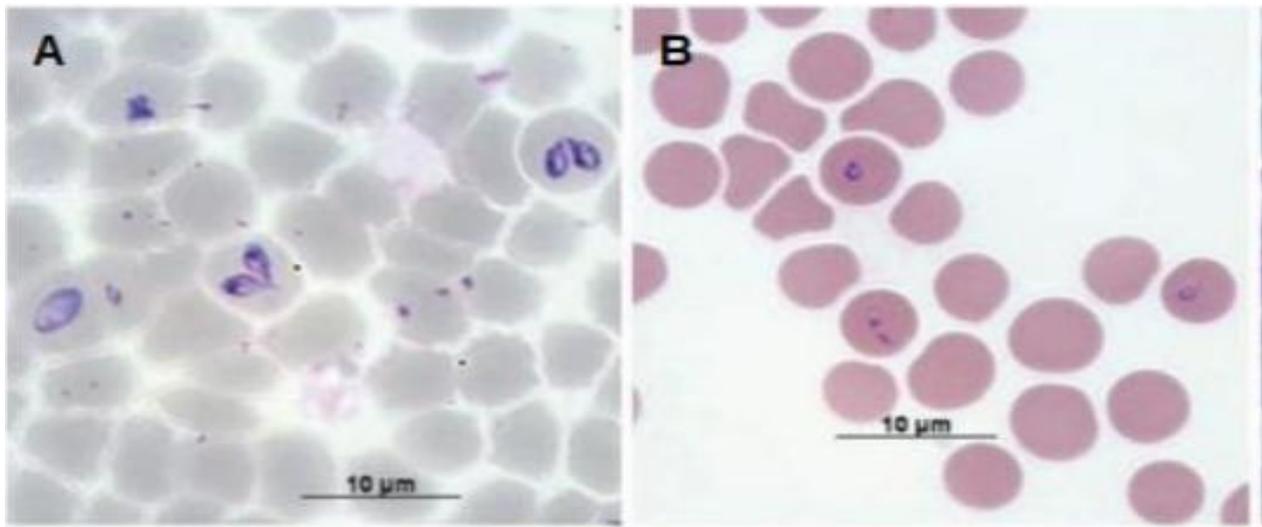


Figura 4: A) *Babesia bigemina* en eritrocitos bovinos. Frotis teñido con Giemsa. B) *Babesia bovis* en eritrocitos bovinos. Frotis teñido con Giemsa. Fuente: Mosqueda y col., 2012.

Se reconoce como hospedero de *B. bovis* y *B. bigemina* a la garrapata *R. microplus* en la mayoría de las zonas ganaderas del mundo. Sin embargo, en México esta función es compartida con la garrapata *Boophilus annulatus* (Alonso y col., 1992).

2.1.3 Ciclo biológico de *B. bovis* y *B. bigemina*

Consiste en una fase de multiplicación asexual en el bovino y otra de reproducción sexual en *R. microplus* (Riek, 1968). En el bovino se encuentran en los eritrocitos, a los cuáles ingresan a través de su complejo apical y luego por fisión binaria se transforman en trofozoíto y merozoíto. Los merozoítos no evolucionan hasta no ser ingeridos por una garrapata. Luego en el intestino de la garrapata se transforman en gametos (masculinos y femeninos) fusionándose y formando el cigoto. Posteriormente por multiplicación derivan en vermículos (células poliploides) que pasan de la hemolinfa a los órganos de la reproducción en diferentes ciclos (Bock y col., 2004).

Babesia spp. queda libre en el intestino de la garrapata y en 3-4 días pasan por la hemolinfa a varios organelos, incluidos los ovarios donde ocurre la transmisión transovárica, resultando infectados los futuros huevos. La larva infectada parasita al bovino y en 24-72 horas se reactiva las *B. bovis* que están en las glándulas salivales y son inoculadas al bovino (Riek, 1966). La transmisión de *B. bigemina* puede ocurrir entre 8-10 días después de que la larva se prende; cuando alcanza el estadio de ninfa (Riek, 1964) o en estadios posteriores (Guglielmone y col, 1981).

El período de incubación en el bovino es de 7 días, en este tiempo los merozoítos se multiplican invadiendo y destruyendo sucesivamente los eritrocitos; primero con formas anaplasmoides, que es el primer estadio evolutivo, luego con formas en división (bipartición transversal) y finalmente formas adultas; redondas y pequeñas correspondientes a *B. bovis* o elementos piriformes unidos en ángulos correspondientes a *B. bigemina* (Weber y Friedhoff, 1977). En la figura 5 se esquematiza el ciclo biológico de *B. bovis*.

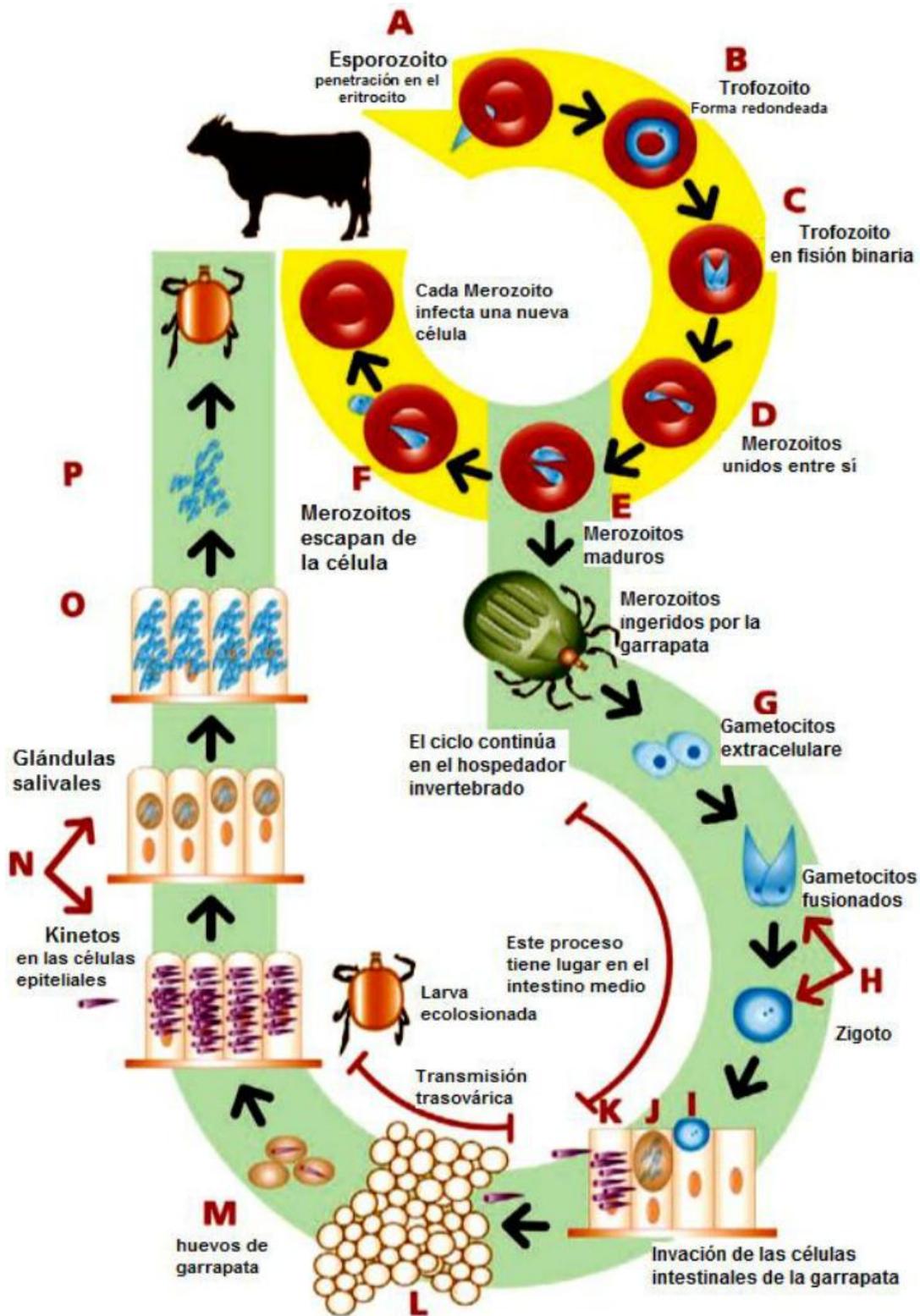


Figura 5: Ciclo biológico de *B. bovis* Fuente: Mosqueda y col., 2012.

2.2 *Anaplasma marginale*

Respecto a la anaplasmosis, son amplias y muy variadas las formas en que puede transmitirse el parásito y dependen de la presencia de vectores (biológicos y mecánicos), la existencia de animales susceptibles y de condiciones ecológicas favorables (Palmer y McElwain, 1995). También se produce una transmisión directa de la vaca al ternero por vía transplacentaria (Paine y Miller, 1977; Norton y col., 1983; Zaugg, 1985). A diferencia de lo que sucede con *Babesia* spp. en el caso de *Anaplasma* spp. la garrapata actúa exclusivamente como vector, resultando en una situación epidemiológica bastante diferente (Solari y col., 2013).

En Uruguay la garrapata común del ganado es el principal vector de la anaplasmosis debido a que: 1) en general la enfermedad se presenta en bovinos parasitados con *R. microplus*, 2) las prevalencias serológicas de *Babesia* spp., *A. marginale* y el vector (*R. microplus*) coinciden, 3) ocurren brotes mixtos que sugiere un origen común (Solari y Quintana, 1994). Esto no descarta la posibilidad de otras vías de transmisión tales como otras garrapatas, dípteros hematófagos (tábanos, moscas y mosquitos) (Guglielmone, 1991) que también están presentes en el país.

En el año 2017, en un predio lechero de Lavalleja, se realizó el diagnóstico de un caso de tristeza parasitaria sin presencia de *R. microplus*. Se trató de una epidemia de origen puntual dado que todos los casos ocurrieron dentro del máximo período de incubación de la enfermedad (120 días para anaplasmosis). El diagnóstico etiológico se realizó por improntas de órganos, frotis sanguíneo y PCR. En la necropsia se encontró la carcasa anémica, ictericia moderada, marcada esplenomegalia con hiperplasia de la pulpa blanca y el hígado aumentado de tamaño, de color amarillo/naranja y con patrón lobulillar muy marcado en la superficie de corte, que a la histopatología correspondía a una degeneración y necrosis hepatocítica paracentral de origen anémico. En los frotis de sangre se identificó *A. marginale* y las muestras de bazo que se estudiaron por PCR, fueron positivas para *A. marginale* y negativas para *Babesia* spp. (Dutra, 2017).

Theiler (1910) utilizó el término “Anaplasma” para describir un pequeño microorganismo (corpúsculo) presente en los eritrocitos de bovinos africanos que sufrían de una anemia infecciosa aguda. El autor fue el primero en considerar estos corpúsculos como representantes de un nuevo género de parásito y, debido a la carencia de pared citoplasmática y a su localización marginal dentro del glóbulo rojo propuso el nombre de *Anaplasma marginale*, a la enfermedad que este agente produce la denominó Anaplasmosis. Kreir y Ristic (1973), basándose en las características morfológicas del *Anaplasma*, como la ausencia de núcleo y organelos, la clasificaron dentro de la familia *Anaplasmataceae* del orden Rickettsiales. También se encuentra en esta familia *A. centrale* apatógeno con una ubicación más central.

2.2.1 Morfología

A. marginale se localiza en los bordes de los hematíes en forma de corpúsculos puntiformes, redondos u ovals de 0,3 a 0,8µm de diámetro, aislados, rara vez en parejas y compuestos únicamente de sustancias cromatínicas (Hutyra y col., 1973). La morfología de *A. marginale* se observa en la Figura 6.

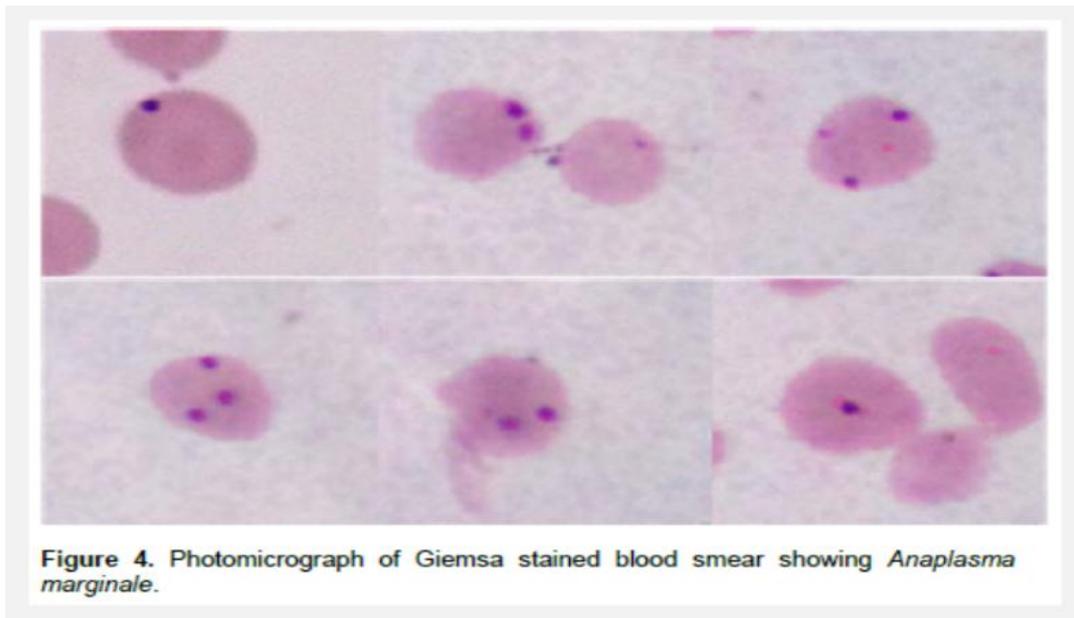


Figure 4. Photomicrograph of Giemsa stained blood smear showing *Anaplasma marginale*.

Figura 6: *Anaplasma marginale* en eritrocitos bovinos. Frotis teñido con Giemsa. Fuente: Salih y col., 2015.

2.2.2 Ciclo biológico de *A. marginale*

En los hospederos vertebrados, *Anaplasma* spp. infecta a los eritrocitos con la formación de una vacuola derivada de dichos eritrocitos, alrededor del organismo (Francis y col., 1979). Cada organismo contiene los cuerpos iniciales que consisten en agregados granulares densos rodeados por una doble membrana. El microorganismo se replica dentro del eritrocito por fisión binaria para formar hasta ocho organismos individuales dentro de una vacuola simple (Ristic y Watrach, 1963). Posteriormente los microorganismos salen del eritrocito, utilizando mecanismos aparentemente no líticos e infectan otros eritrocitos (Erp y Fahrney, 1975).

El ciclo de desarrollo de *A. marginale* en garrapatas es complejo y coordinado con el ciclo de alimentación (Kocan, 1986; Kocan y col., 1992; Kocan y col., 1996). El mismo se encuentra ilustrado en la Figura 7. Comienza en las células del intestino medio, siguiendo con las células musculares del mismo, después muchos otros tejidos de la garrapata llegan a ser infectados, incluyendo las glándulas salivales, de donde la rickettsia se transmite al hospedero vertebrado durante la alimentación. En cada sitio de desarrollo en la garrapata, *A. marginale* se multiplica dentro de inclusiones unidas a las membranas, llamadas vacuolas o colonias. Cada ciclo involucra dos estadios: la primera forma de *A. marginale* vista dentro de la colonia es la forma reticular (vegetativa), que divide por fisión binaria, formando colonias grandes que pueden contener cientos de organismos. La forma reticular cambia a la forma densa, que es la forma infecciosa y que puede sobrevivir fuera de las células del hospedero. El bovino es infectado con *A. marginale* cuando la forma densa es transmitida durante la alimentación de la garrapata a través de las glándulas salivales (Kocan y col., 2003).

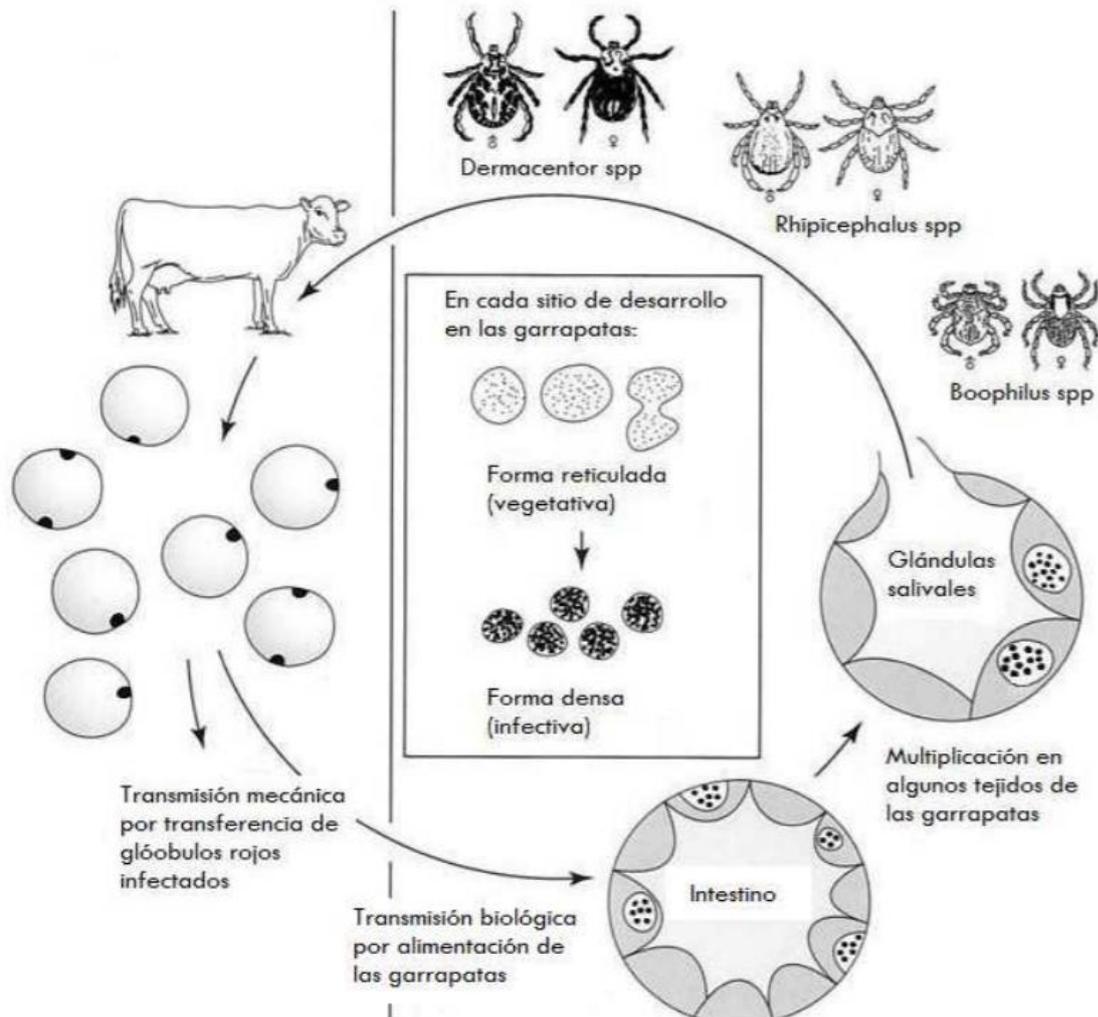


Figura 7: Ciclo de desarrollo de *Anaplasma marginale* en bovinos y garrapatas (Kocan y col., 2003).

2.3 Tristeza parasitaria

Popularmente estas enfermedades son enmarcadas dentro del complejo “tristeza parasitaria bovina” (Suarez y Noh, 2011). Son enfermedades de alta letalidad en bovinos mayores de dos años, moderadamente severa en sobreaño y leve o subclínica en terneros menores de un año (Solari y col., 2013).

Esto se debe a que los terneros hasta los dos meses adquieren resistencia en forma pasiva por la ingesta de anticuerpos calostrales. Luego hay una inmunidad innata entre los 3 a 9 meses de edad, por lo que los animales que se enferman en este período no manifiestan síntomas clínicos y desarrollan inmunidad sólida por largo tiempo (Mahoney y col., 1973). Esta situación provoca la producción constante de anticuerpos y por medio de la serología se podría conocer qué animales fueron afectados y los vulnerables a enfermar en el futuro (Solari, 2006).

En referencia a la babesiosis, los animales infectados desarrollan una inmunidad de por vida frente a la reinfección con las mismas especies. También existe un grado de protección cruzada en los animales inmunes a *B. bigemina* frente a las infecciones posteriores por *B. bovis*. Los terneros raramente muestran síntomas de la enfermedad

después de la infección, independientemente de la especie de *Babesia* implicada o el estado inmune de las madres (Christensson, 1987).

La presentación de los brotes de piroplasmosis es generalmente aguda, ocurre en un período aproximado de 10 días con un 2,5 % de morbilidad y un 1,6% de mortalidad. La anaplasmosis generalmente tiene una presentación individual con muertes en goteo por su largo período de prepatencia (20-60 días). La distribución estacional coincide en el caso de la babesiosis con la evolución de la garrapata apareciendo entre marzo y mayo cuando hay un mayor número de garrapatas parasitando al bovino y la posibilidad de transmisión de estos agentes es mayor. Sin embargo, la anaplasmosis está más dispersa en el tiempo debido a que su tiempo de incubación es notoriamente superior (Solari y col., 2007).

2.3.1 Signos clínicos

Los principales signos clínicos en un foco de tristeza parasitaria son anemia, fiebre, depresión, ictericia, muerte súbita, debilidad, ataxia, aborto, hemoglobinuria y temblores. A la revisión clínica las mucosas se presentan pálidas y en un examen más profundo se puede observar ictericia (icteroanemia). La hemoglobinuria sólo se observa en la babesiosis por *B. bigemina* (Solari y col., 2013).

El período de incubación oscila entre 6 a 15 días luego de la infección para *B. bovis* y 15 días para *B. bigemina* (Guglielmone y col., 1981). Para la anaplasmosis, este período varía de acuerdo con el inóculo entre 20 a más de 60 días. La babesiosis se presenta en brotes generalmente de forma aguda mientras que la anaplasmosis se caracteriza porque los enfermos se presentan individualmente y la muerte se da en forma de goteo (Solari, 2006). *B. bovis* es mucho más patógena que *B. bigemina* al inducir un fenómeno de coagulación intravascular diseminada, lo que origina un cuadro de tipo hemorrágico en diversos órganos y posibles alteraciones en el sistema nervioso, al bloquearse el riego sanguíneo al cerebro (Carrique y Ribera., 2000).

Los hallazgos macro y microscópicos de la tristeza no son patognomónicos, pero si altamente específicos por lo que siempre se recomienda proceder al examen postmortem (necropsia) de animales muertos (Fry y McGavin, 2007).

2.3.2 Datos de necropsia

La patología de la babesiosis es típica de una anemia hemolítica intravascular complicada con lesiones indicativas de falla circulatoria (Patarroyo y col., 1982). A la necropsia la carcasa se encuentra pálida y con ictericia de severidad variable, la sangre se presenta como diluída en agua y el plasma de color rosado debido a la hemoglobinemia. El hígado está aumentado de tamaño, congestivo y de color amarillo-naranja, y es frecuente que la vesícula biliar se encuentre llena. Los riñones están edematosos y con irregularidades, su corteza de color negro y la orina es de color "vino oporto" debido a la hemoglobinuria. El bazo presenta esplenomegalia congestiva marcada y al corte exuda sangre y el tejido esplénico se encuentra oscuro. En casos de babesiosis nerviosa, las lesiones encefálicas son distintivas de la *B. bovis* por la característica de este hemoparásito de acumularse en grandes cantidades en los capilares cerebrales de los animales afectados (Buening, 1991). Dichas lesiones no se observan en la *B. bigemina* (Callow y McGavin, 1963; Rodríguez y col., 2005; Barros y col., 2006).

En la anaplasmosis las lesiones se deben a la hemólisis extravascular por eritrofagocitosis de los eritrocitos infestados que expresan antígenos que inducen a los macrófagos a la autofagocitosis. Los eritrocitos infestados se eliminan del torrente circulatorio mediante fagocitosis por las células del retículo endotelial del bazo, hígado y nódulos linfáticos; induciéndose el desarrollo de una fase de inflamación aguda (Richey y Palmer, 1990). La destrucción intracelular de los eritrocitos explica la hemosiderosis marcada que se observa en hígado y bazo (Fry y McGavin, 2007). A la necropsia la anemia suele ser más marcada mientras que la ictericia es más discreta. El corazón aparece flácido y anémico. El hígado se presenta de color naranja oscuro (colestasis) y generalmente muestra un patrón lobulillar debido a la degeneración y necrosis hepatocítica periacinar de origen anémico. El bazo presenta esplenomegalia congestiva, pero es firme y carnoso. En la anaplasmosis nunca hay hemoglobinuria ni nefrosis hemoglobinúrica (Aubry y Geale, 2011; Fry y McGavin, 2007).

En nuestro país son relativamente pocas las enfermedades similares a la tristeza parasitaria. Dentro de las posibles causas a considerar la más importante es la hemoglobinuria bacilar por *Clostridium haemolyticum*, seguida por la hematuria enzoótica causada por el helecho (*Pteridium aquilinum*), leptospirosis aguda, plantas tóxicas que cursan con ictericia y colestasis y fotosensibilización hepatógena (Aleman y Carlsson, 2009).

2.3.3 Diagnóstico

Existen varias técnicas diagnósticas para hemoparásitos. Las técnicas directas son: tinción de frotis de sangre con Giemsa o Wright, improntas de órganos y reacción en cadena de polimerasa (PCR); mientras que las indirectas son: inoculación en bovinos susceptibles y técnicas serológicas: ELISA (enzimoinmunoanálisis), inmunofluorescencia indirecta (IFI) aglutinación en tarjeta (IICA-Red Hemoparásitos, 1985; Azambuja y col., 1994; Azamabuja y Gayo, 1995; Cardozo y col., 1992).

Para babesiosis el método tradicional de identificación del agente en los animales infectados es el examen microscópico de frotis teñidos finos y gruesos de sangre. En los extendidos finos las características morfológicas de los parásitos sanguíneos se observan mejor, sin embargo, los frotis gruesos permiten examinar una mayor cantidad de sangre, lo cual aumenta la probabilidad de detectar infecciones leves. Se puede recurrir a las tinciones de tipo Romanowsky y sus modificaciones (Giemsa, Leishman, Wright) (Domínguez, 1992). Normalmente, esta técnica es adecuada para la detección de las infecciones agudas, pero no para la detección de los portadores donde las parasitemias son en su mayoría muy bajas (OIE, 2008). En estos casos se utilizan pruebas serológicas para detectar la presencia de anticuerpos.

La prueba de IFI es utilizada para detectar anticuerpos frente a *Babesia* spp., aunque el ensayo tiene una especificidad baja en *B. bigemina*. En la prueba de IFI para *B. bigemina* las reacciones cruzadas con anticuerpos frente a *B. bovis* son un problema especial en las áreas donde coexisten los dos parásitos (OIE, 2008).

Se ha evaluado ampliamente el empleo de ELISA para el diagnóstico de la infección por *B. bovis* utilizando un antígeno del merozoito (Molloy y col., 1998). Se han desarrollado, aunque no se han validado, pruebas de ELISA competitivo en las que se utilizan antígenos recombinantes de *B. bovis* asociados a la superficie y al organelo secretor de los merozoitos (Boonchit y col., 2004). A pesar de los esfuerzos de varios investigadores, aún no se dispone de un ELISA validado para *B. bigemina*. Lo normal es que los ELISA para anticuerpos contra *B. bigemina* tengan una escasa especificidad (OIE, 2008).

Para la detección de la respuesta inmunitaria en anaplasmosis son varias las técnicas descritas: prueba de aglutinación en placa (CAT); fijación del complemento (CF); ELISA; IFI. Por lo general, a no ser que los animales hayan sido tratados o se encuentren en una fase muy inicial de la infección (<14 días), en la mayoría de los laboratorios los métodos de elección para identificar los animales infectados son enzimo-inmunoanálisis de competición (C-ELISA), ELISA indirecto (I-ELISA) o CAT (OIE, 2015).

Las ventajas de la CAT son que es una técnica que puede realizarse tanto en el laboratorio como en el campo, y que proporciona el resultado en unos pocos minutos. Sin embargo, las reacciones inespecíficas pueden ser un problema, y la subjetividad de la interpretación de las reacciones en las pruebas puede tener como consecuencia resultados contradictorios (OIE, 2015).

Por su parte la serología tiene varias utilidades a saber (Solari, 2006):

- ✓ Luego de un brote es posible evaluar la situación del rodeo y determinar el riesgo futuro
- ✓ Aproxima a determinar la causa del problema.
- ✓ Permite analizar el estado de situación inmunológica del establecimiento.

Se define equilibrio enzoótico cuando menos del 20% o más del 79% de los animales sean seropositivos a la presencia del agente. Cuando el porcentaje de animales seropositivos se encuentre entre 20% y 79%, se considerará que está en desequilibrio enzoótico para dicho agente (Solari y col., 2013).

La presencia de anticuerpos indica si hubo o no contacto con hemoparásitos. Si realizamos una evaluación por categorías observamos que el resultado en los terneros señala el índice de transmisión específico de la última temporada de garrapatas y con estos resultados se puede advertir la situación de riesgo del rodeo (Solari y col., 2013). Para poder determinar el riesgo de ocurrencia de brotes, se debe sangrar las categorías de adulto y terneros (10 % del rodeo, máximo 20 muestras) (Cuore y col., 2016).

2.3.4 Tratamiento, medidas de control y prevención

Existen en plaza dos principios activos que son de utilidad para tratar o prevenir las afecciones causadas por *Babesia* spp. Uno de ellos es aceturato de diaminazene (3.5 mg/kg de peso vivo) que interfiere en la glucólisis aeróbica y en la síntesis de ADN actuando más en la multiplicación. El otro principio activo es el dipirionato de imidocarbo (1-2 mg/kg de peso vivo), que actúa directamente sobre el parásito causando una alteración en el número y tamaño de los núcleos y en la morfología del citoplasma. El tratamiento de anaplasmosis se realiza con compuestos a base de tetraciclinas con dosis de 5, 10, 20 mg/kg de peso vivo. Vanzini y Ramírez (1994) comprobaron que dos a tres dosis de oxitetraciclina de acción prolongada, con 7 días de intervalo pueden lograr esterilizar la infestación (Solari y col., 2013).

Erradicar la garrapata de los establecimientos es una forma de prevenir la tristeza, y en el caso de la anaplasmosis, es necesario a su vez evitar la transmisión iatrogénica (Suárez y Noh, 2011). La erradicación del vector muchas veces es inviable y los tratamientos quimioterápicos para la tristeza parasitaria por sí solos no evitan las pérdidas productivas causadas por esta enfermedad (Guglielmone, 1995).

Es posible inferir que, por las condiciones ecológicas del Uruguay, los terneros en general no reciben un desafío suficiente de garrapatas infestadas como para inmunizarse naturalmente. Esto se debe a que la mayoría de las vacas paren durante las dos primeras generaciones de garrapatas y los terneros no reciben un desafío suficiente y que luego en el invierno el desafío larvario es menor o está reducido. En consecuencia, al siguiente año cuando estos terneros son susceptibles a enfermar (sobreaño) por no estar protegidos por inmunidad natural es cuando pueden producirse los brotes (Solari y col., 2013). En aquellos establecimientos cuyas condiciones ecológicas permitan un mayor reservorio y por ende mayor desafío con larvas infestadas permitirán una estabilidad enzoótica natural (Solari y col., 1991).

Para prevenir brotes de la enfermedad en establecimientos con inestabilidad enzoótica, se debe utilizar la vacuna con organismos vivos atenuados de *Babesia* spp. y con *A. centrale* (heterólogo de *A. marginale*), que proveen inmunidad durante toda la vida productiva de los bovinos (Solari y Quintana, 1994; Bock y de Vos, 2001).

La DILAVE ha producido esta vacuna desde 1941 (Rubino, 1946) y en 1996, un laboratorio privado inició la producción de una vacuna congelada (Biosur, 2017). Actualmente ambas están disponibles en el mercado y son producidas en terneros esplenectomizados.

Las cepas utilizadas en las hemovacunas no afectan la ganancia de los animales vacunados, así como tampoco presentan disminución en la producción de carne aquellos animales que fueron inmunizados y posteriormente desafiados con cepas patógenas de *Babesia* spp. (Solari y col., 1992).

2.4 Caracterización del problema

Como fue mencionado anteriormente, *R. microplus* es causante de importantes pérdidas económicas estimadas en 32.7 millones de dólares anuales en Uruguay. Dentro de esas pérdidas, 12,8% son debidas a la transmisión de los agentes causales de la tristeza parasitaria: *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* (Solari, 2006). En general, no se realizan diagnósticos serológicos rutinarios para conocer el estado inmunitario de los rodeos y así establecer medidas de control eficientes para la tristeza parasitaria. Esto conduce a que en muchas oportunidades se intente “controlar” la tristeza sólo mediante el control de la garrapata manteniendo el riesgo de ocurrencia de brotes. La utilización de técnicas serológicas validadas contribuye a la determinación de la situación de estabilidad o inestabilidad enzoótica del rodeo permitiendo la instauración de medidas de control personalizadas para cada establecimiento como la utilización de la hemovacuna en la reposición. Ha sido demostrado que existen diferencias significativas en la ganancia de peso entre animales naturalmente infectados y libres de hemoparásitos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Realizar el diagnóstico de situación de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* en establecimientos agropecuarios de Tacuarembó que tienen por objetivo controlar la garrapata.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar la situación de estabilidad e inestabilidad enzoótica mediante el estudio de seroprevalencia de anticuerpos contra *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* en animales de sobreaño y adultos.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reseña de los establecimientos

Los sueros de bovinos utilizados para la tesis provenían de 9 establecimientos ubicados en el departamento de Tacuarembó. Su distribución geográfica se detalla en la Figura 8.

Todos los establecimientos se dedican a la cría de bovinos y el tipo de explotación es extensiva sobre campo natural. Dos establecimientos tienen menos de 100 hectáreas, cuatro entre 350 y 450 hectáreas y los otros tres entre 1250 y 2200 hectáreas aproximadamente. La dotación animal es en promedio de 0,8 Unidades Ganaderas.

Todos los productores manifestaron que hay presencia de garrapatas en sus campos, en diferentes grados de infestación y que los tratamientos que realizan son con el objetivo de control dado que por diferentes motivos (malos alambrados, vecinos problemáticos, topografía complicada, etc.) la erradicación no es una opción.

El grado de infestación de garrapatas según el criterio del productor se clasificó como alto, medio y bajo según los siguientes criterios: Alto + de 100 garrapatas por animal, medio entre 50 y 100 y bajo menos de 50 garrapatas (ninfas y/o adultos) durante la tercera generación del año 2016

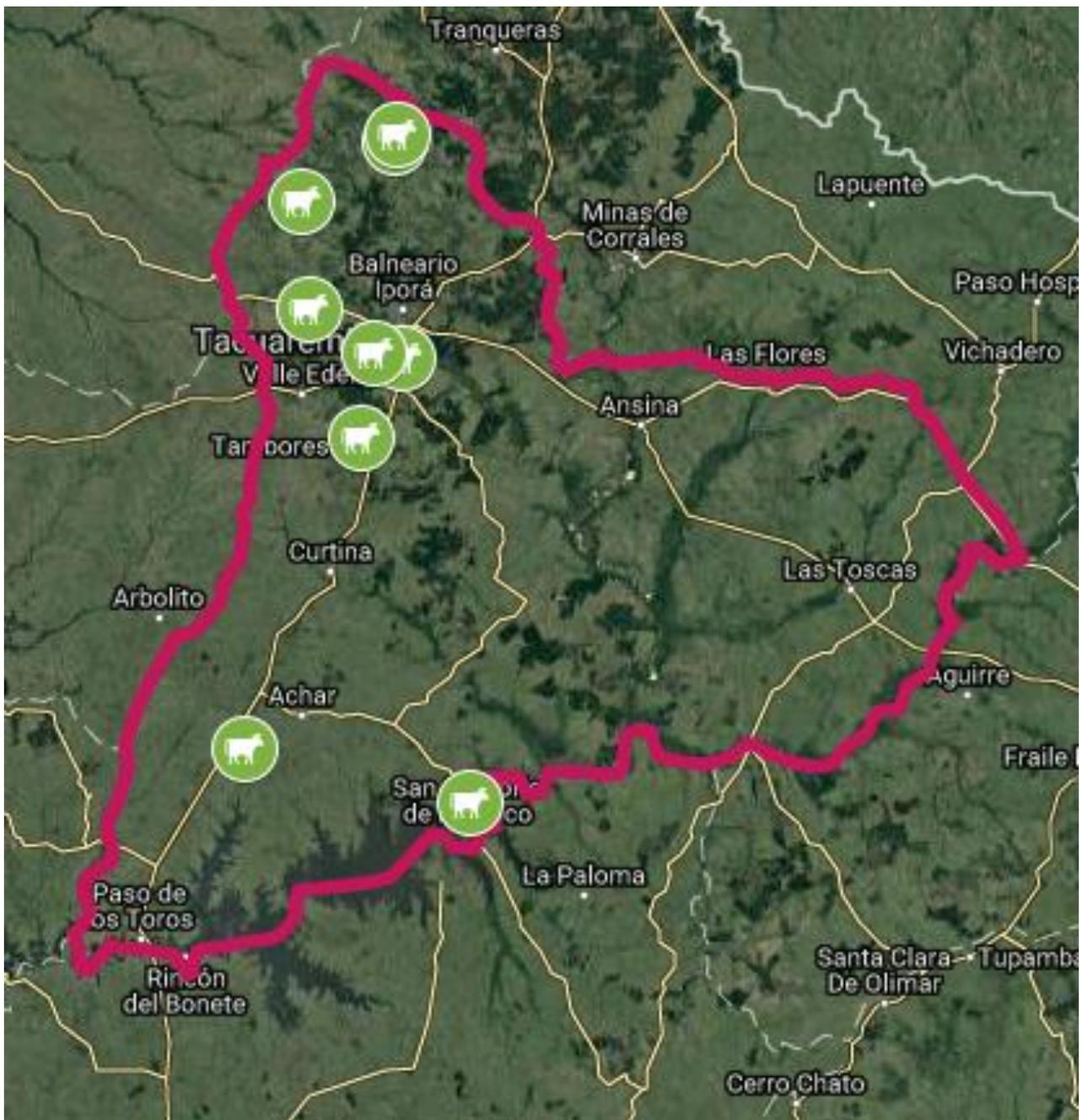


Figura 8: Distribución geográfica de los establecimientos con los que se trabajó.

4.2 Animales

De cada establecimiento, se extrajo el suero de 24- 40 bovinos seleccionados al azar, la mitad de la categoría adulto y la otra de la categoría sobreaño, los cuales fueron obtenidos en el marco del proyecto doctoral de la MsC. Cecilia Miraballes titulado: “Determinación de la situación actual de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y tristeza parasitaria y control integrado de ambas enfermedades” (INIA, 2016).

Los sueros fueron identificados y conservados a -20°C hasta su procesamiento. Se realizó el análisis de los sueros utilizando la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para

Babesia bovis y *B. bigemina*; y Card Test (CT) para *Anaplasma marginale*. Ambas técnicas fueron padronizadas por el Centro de Referencia de Garrapata de la DILAVE.

1- **IFI** para *Babesia* spp. Se usó el protocolo de IICA (1987). Los criterios de positividad fueron: presencia de fluorescencia evidente sobre los glóbulos rojos parasitados en el título de 1/25 para *B. bigemina*, y 1/50 para *B. bovis*. Los sueros problema fueron confrontados con un control positivo y un control negativo para cada hemoparásito en el mismo título de positividad (Ríos-Osorio y col., 2010).

2- **Card Test** para *Anaplasma marginale*. Se usó el protocolo del Departamento de Parasitología de la DILAVE (Solari, 2006). Se consideró un suero como positivo cuando se observaron conglomerados macromoleculares visibles directamente, confrontados con un control positivo y un control negativo.

3- Se usaron los controles positivos y negativos, para cada uno de los agentes, ya preparados por la DILAVE.

La sensibilidad y la especificidad de ambas técnicas son las siguientes (Solari comunicación personal, 2018)

- IFI para *Babesia bovis* y *B. bigemina*: 95 % sensibilidad, 90% especificidad.
- Card Test para *Anaplasma marginale*: 80 % de sensibilidad, 80% especificidad.

4.3 Técnica de inmunofluorescencia indirecta

B. bovis* y *B. bigemina

Reactivos y recomendaciones:

- Sueros problema: Ordenarlos por número correlativo.
- Suero control positivo *B. bovis* y *B. bigemina*: Se almacenan en freezer.
- Suero control negativo: Suero normal bovino.
- Preparación de conjugado (Fluoresceína). Se almacenan en freezer, debe evitarse su exposición a la luz. Luego de retirado del freezer se puede utilizar por 24 horas.
- Dilución PBS 10 %.
- Antígeno adherido en los portaobjetos con 24 cuadrantes.



Figura 9: Portaobjetos con cuadrantes para IFI. Cuadrantes: Controles positivos (CP); Inespecífico (C Inesp); Control negativo (CN). Resto de los cuadrantes para sueros problemas.

Procedimiento:

1. Colocar en eppendorf diferentes los siguientes controles:
 - Preparación A: Control positivo para *B. bigemina* e inespecífico para *B. bovis*: 240 µl de PBS y 10 µl de Suero positivo *B. bigemina*.
 - Preparación B. Control positivo para *B. bovis* e inespecífico para *B. bigemina*: 240 µl de PBS y 10 µl Suero positivo de *B. bovis*.
 - Preparación C. Controles negativos: 240 µl de PBS y 10 µl Suero normal bovino.Muestras: 240 µl de PBS y 10 µl de Sueros problema.
En la Figura 9 se muestra un portaobjeto utilizado para realizar esta técnica.
2. En el portaobjeto correspondiente a la IFI para *B. bigemina* agregar:
 - 10 µl de la preparación A en los cuadrantes control positivo
 - 10 µl de la preparación B en el cuadrante inespecífico
 - 10 µl de la preparación C en el cuadrante control negativo
 - 10 µl de la preparación de sueros problema en el resto de los cuadrantes.
3. Agregar 250 µl de PBS a cada uno de los eppendorf.
4. En el portaobjeto correspondiente a la IFI para *B. bovis* agregar:
 - 10 µl de la preparación B en los cuadrantes control positivo
 - 10 µl de la preparación A en el cuadrante inespecífico
 - 10 µl de la preparación C en el cuadrante control negativo
 - 10 µl de la preparación de sueros problema en el resto de los cuadrantes.
5. Incubar a 37° C y 70 % de humedad por 45 minutos.
6. Realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS diluido al 10%.
7. Secar en mechero la superficie inferior de los portaobjetos.
8. Agregar 800 µl de PBS al Conjugado que se encuentra fraccionado de 20 µl en el freezer.
9. Colocar en cada uno de los cuadrantes 10 µl del Conjugado diluido.
10. Incubar a 37 °C y 70% de humedad por 45 minutos.
11. Realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS diluido al 10%.
12. Lectura en microscopio de epifluorescencia cuya luz estimula al isotiocianato de fluoresceína haciendo que emita una luz fluorescente de color verde

4.4 Técnica de Card Test

A. marginale

Reactivos y recomendaciones:

- Sueros problema: Ordenarlos por número correlativo.
- Suero control positivo
- Suero normal bovino (Control negativo): Se almacena en Freezer -80°C. Luego de retirado del freezer se puede utilizar por 24 horas si se mantiene en heladera.
- Antígeno de *Anaplasma marginale*: Mantener refrigerado la mayor parte del tiempo de trabajo.

En la Figura 10 se muestra una placa de aglutinación con las correspondientes cuadrículas.

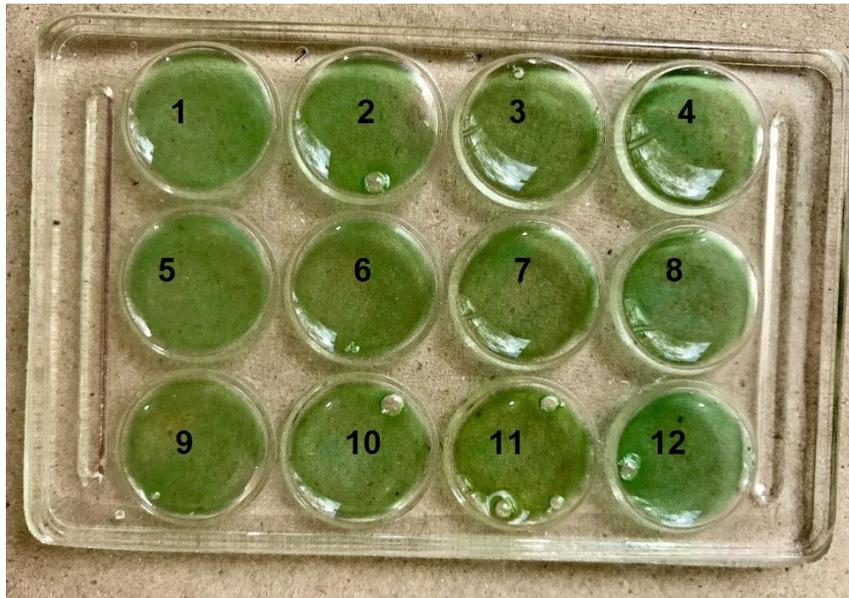


Figura 10: Placa de aglutinación para diagnóstico de *Anaplasma marginale*. Cuadrículas N°1 a N°10 suero problema. Cuadrícula N° 11 Control negativo. Cuadrícula N°12 Control positivo.

Procedimiento:

1. Colocar:

- 38 μ l Suero normal bovino en cada una de las cuadrículas de la placa.
- 38 μ l Suero problema en las cuadrículas N° 1 a la N° 10.
- 38 μ l Suero normal bovino en la cuadrícula N°11.
- 38 μ l Suero control positivo en la cuadrícula N°12.

2. Homogeneizar y agregar 15 μ l Antígeno de *A. marginale* cerca de cada suero.

3. Mezclar suero con antígeno comenzando por el suero control negativo.

4. Rotar suavemente la placa de vidrio.

5. Incubar en estufa a 37°C y 70% humedad por 4 minutos.

6. A partir de que el Suero control positivo precipita realizar la lectura haciendo incidir una luz indirecta en la placa de vidrio.

7. Interpretar los resultados:

Positivo: Presencia de grumos de aglutinación.

Negativo: Ausencia de grumos de aglutinación.

8. Una vez que el control negativo precipita finalizar con la prueba.

4.5 Criterio de análisis de los resultados

Para cada uno de los hemoparásitos, se consideró que un establecimiento está en equilibrio enzoótico cuando menos del 20% o más del 79% de los animales de ambas categorías son seropositivos a la presencia del agente. Cuando el porcentaje de animales seropositivos se encuentra entre 20% y 79%, se considera que se encuentra en desequilibrio enzoótico para dicho agente (Solari y col., 2013).

5 RESULTADOS

En la Tabla 2 se resume información básica de los 9 establecimientos y se presentan los resultados de la serología realizada para los 3 agentes.

✓ *Babesia bovis:*

Del total de los establecimientos evaluados, sólo dos se encontraban en equilibrio enzoótico; uno con un alto porcentaje (100% adultos y 93% sobreaño) de animales que presentaron anticuerpos contra *B. bovis* (Establecimiento 5) y el otro con resultados de seropositividad de 7% y 10% para adultos y sobreaño respectivamente (Establecimiento 6). El resto de los establecimientos (1, 2, 3, 4, 7, 8, 9) se encontraba en desequilibrio enzoótico.

✓ *Babesia bigemina:*

De los 9 establecimientos a los que se les realizó serología, dos se encontraban en equilibrio (Establecimientos 3 y 4); ambos poseían más del 79% de los animales con anticuerpos. El resto de los establecimientos se encontraba en desequilibrio enzoótico (1, 2, 5, 6, 7, 8, 9).

✓ *Anaplasma marginale:*

Para este agente hay cuatro establecimientos que se encontraban en equilibrio enzoótico (3, 4, 6, 9) y cinco en desequilibrio enzoótico (1, 2, 5, 7, 8). De los establecimientos que estaban en equilibrio, dos tenían menos del 20% de los animales seropositivos (4, 6), mientras que en otro no se detectaron anticuerpos contra *A. marginale* por lo que no estaba circulando este agente en su rodeo (3) y en el restante (9) hubo más del 79% de los animales con anticuerpos.

TABLA 2: Porcentaje de seropositividad de los tres agentes causantes de tristeza parasitaria en bovinos adultos y de sobreaño.

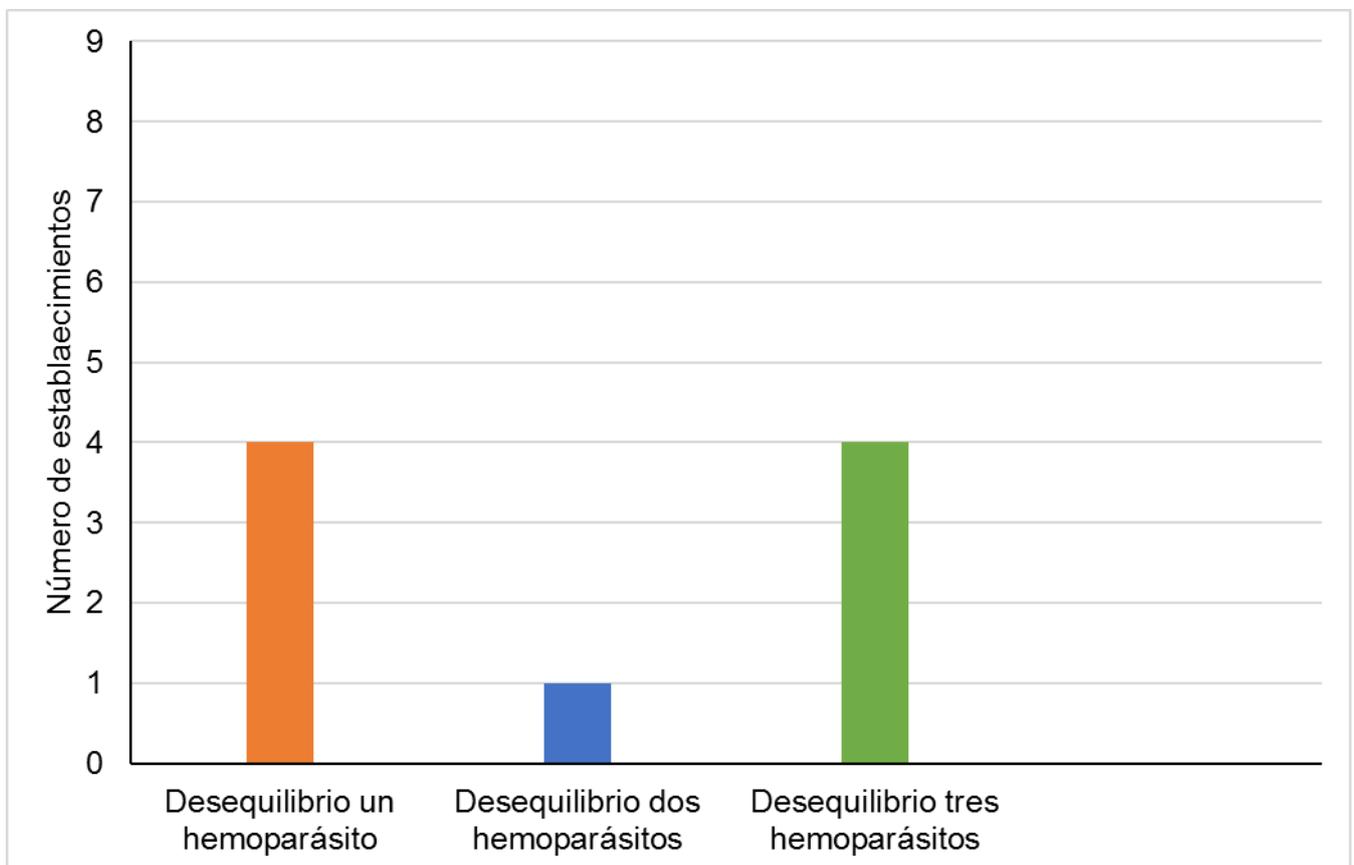
Registro	Total bovinos	Grado infestación garrapatas	Categoría	N	Seropositividad			
					<i>A. marginale</i>		<i>B. bovis</i>	
					N	%*	N	%*
1	225	Alto	Adultos	16	8	50	8	50
			Sobreaño	15	9	60	7	47
2	120	Bajo	Adultos	15	10	67	9	60
			Sobreaño	15	3	20	6	40
3	750	Bajo	Adultos	15	0	0	2	13
			Sobreaño	16	0	0	5	31
4	520	Bajo	Adultos	14	1	7	4	29
			Sobreaño	15	0	0	2	13
5	64	Alto	Adultos	15	12	80	15	100
			Sobreaño	14	11	79	13	93
6	349	Medio	Adultos	15	2	13	1	7
			Sobreaño	20	0	0	2	10
7	1100	Bajo	Adultos	14	7	50	11	79
			Sobreaño	15	10	67	15	100
8	77	Medio	Adultos	12	6	50	6	50
			Sobreaño	15	8	53	9	60
9	1800	Alto	Adultos	15	12	80	13	87
			Sobreaño	16	16	100	9	56

* Porcentaje de animales positivos a cada agente
N= n° total de sueros

En la figura 11 se ilustra el número de establecimientos en desequilibrio enzoótico para los agentes:

- ✓ Los establecimientos 3, 4, 5 y 6 presentan desequilibrio para un hemoparásito.
- ✓ El establecimiento 9 presenta desequilibrio para dos hemoparásitos.
- ✓ Los establecimientos 1, 2, 7 y 8 presentan desequilibrio para los tres hemoparásitos.

Figura 11: Diagnóstico de situación de desequilibrio enzoótico de hemoparásitos en 9 establecimientos del Departamento de Tacuarembó.



6 DISCUSIÓN

Todos los establecimientos se encontraron en desequilibrio enzoótico para al menos un agente de la tristeza parasitaria. Estos resultados se explican por el hecho de que Uruguay está ubicado en un área marginal para el desarrollo de *R. microplus*, sumado a que todos los establecimientos se encuentran en una zona de control de este parásito en la cual la tasa de infestaciones es irregular (Solari y col., 2013). A medida que disminuye la cantidad de garrapatas parasitando al bovino, desciende la velocidad de transmisión de los hemoparásitos, aumentando la proporción de animales que se infectarán después de los nueve meses de edad y por ende podrán manifestar enfermedad clínica aguda cuando sean adultos susceptibles (Benavides, 2016). La relación entre el grado de infestación y la situación de inestabilidad o estabilidad enzoótica que se presenta en cada rodeo fue explicada por Mahoney (1975). Para poder alcanzar un equilibrio enzoótico y evitar brotes de la enfermedad es necesario un promedio de 50 garrapatas por animal por día. Teniendo en cuenta que todos los establecimientos en los cuales se trabajó realizan tratamientos para controlar *R. microplus* es esperable que los animales no se encuentren con cargas tan altas de este ectoparásito y por ende no alcancen el equilibrio enzoótico.

Se detectaron tres establecimientos con alta infestación de garrapatas, y en dos de ellos se diagnosticó estabilidad enzoótica en la categoría adultos para los tres agentes. Este hecho concuerda con lo observado en el departamento de Artigas en un establecimiento (con problemas de resistencia) con infestaciones promedio de 100 garrapatas por animal, donde el rodeo se encontraba en estabilidad enzoótica con más del 80% de los animales seropositivos (Cuore y col., 2012). En estos dos establecimientos los animales de sobreaño también presentaban un alto porcentaje de animales positivos, aunque no alcanzó para establecer un equilibrio enzoótico. Esto puede deberse a que los propietarios comenzaron a controlar la garrapata en forma más eficiente. Sin embargo, el otro establecimiento presentó inestabilidad, tal vez porque había pocas garrapatas infestadas y la tasa de inoculación (probabilidad diaria de infección) no fue suficiente. La tasa de inoculación depende de la interacción compleja entre los componentes del sistema (agentes causales- bovino-vector), el medio ambiente y la acción del hombre (Guglielmone, 1995).

En algunos casos se presentó el equilibrio enzoótico con más del 79% de los animales seropositivos para un agente, pero en ningún caso fue para los tres agentes lo cual implica que podría presentarse un brote de la enfermedad en el futuro.

Es importante enfatizar que es un error considerar que un rodeo presentará altos niveles de inmunidad contra babesiosis por estar ubicados en la zona infestada con garrapata. Los resultados obtenidos refuerzan esta premisa, ya que muy pocos establecimientos estaban en equilibrio enzoótico para *Babesia* spp. y sin embargo en todos estaba presente *R. microplus* (Magnold y Mastropaolo, 2013).

En el establecimiento en el cual *A. marginale* no se encontraba presente, las medidas de bioseguridad tienen un rol fundamental, para evitar el ingreso del agente. En los que ya estaba circulando *A. marginale* son importantes las buenas prácticas de manejo con el fin de evitar la transmisión iatrogénica en actividades como: aplicación de inyectables, descorne y castraciones. No obstante, este tipo de manejo no se realiza con frecuencia porque los productores manifiestan que enlentece el trabajo de campo. Por este motivo, se debería investigar sobre alternativas que permitan mitigar este inconveniente.

Para poder evitar los brotes de tristeza parasitaria son varias las alternativas que el productor puede considerar, por ejemplo: 1) erradicar a la garrapata y mantener estrictas medidas de bioseguridad para evitar la reintroducción (Magnold y Mastropaolo, 2013); 2)

mantener las poblaciones de garrapata en un nivel marginal para que la tasa de inoculación sea baja y el equilibrio enzoótico esté dado por tener menos del 20% de los animales con anticuerpos (Nari, 1995); 3) utilizar la hemovacuna en la categoría de terneros entre 3 y 9 meses; 4) realizar un manejo racional de los potreros donde se asignen aquellos potreros más complicados para las categorías de terneros y los potreros “limpios” para los animales adultos.

Cuando más del 79% de los animales tengan anticuerpos y estén en equilibrio enzoótico, se deberá tener presente que cuando se empieza a controlar la garrapata será conveniente inmunizar a los terneros ya que al bajar las cargas parasitarias los animales que nazcan posteriormente estarán desprotegidos (Callow y col., 1997). En el caso de que menos del 20 % de los animales presenten anticuerpos no es necesario inmunizar, pero sí realizar un seguimiento para evaluar cambios en la situación. Estos resultados de la serología también deberán ser tenidos en cuenta a la hora de ingresar nuevos animales a los establecimientos porque si ingresan animales libres de garrapata en un establecimiento serán susceptibles a enfermar. Es recomendable contar con un potrero de cuarentena para el ingreso de animales y realizar serología a los mismos para evaluar si no son enfermos crónicos (Solari y col., 2013).

En el presente trabajo, si bien hubo establecimientos que no manifestaron existencia de brotes por hemoparásitos, ninguno de ellos presentó equilibrio enzoótico debido a la baja tasa de inoculación, lo que hace pensar que, frente a las bajas probabilidades de erradicación, la única opción recomendable sea el uso de hemovacuna. Las mismas deben ser empleadas en invierno cuando son bajas las poblaciones de garrapatas, o utilizando potreros seguros, para evitar una sobreinfección por cepas de campo antes del día 60 postvacunación (Solari y Quintana, 1994).

En concreto, todos los establecimientos estudiados se encontraban en una zona “sucias” de garrapata y a pesar de ellos presentaron inestabilidad enzoótica para alguno de los agentes de la tristeza parasitaria. Esto constituye una situación de alto riesgo que, si no se interviene con medidas definitivas como hemovacunas, la aparición de brotes será un hecho indefectible.

Las vacunas para tristeza parasitaria disponibles en Uruguay son eficaces e inocuas en terneros, pueden vacunarse otras categorías de ser necesario, pero es un esquema de vacunación que una vez establecido sólo deberá vacunarse a los terneros y siendo la inmunidad para el resto de la vida. A pesar de la importancia de la vacunación, la comercialización de la vacuna sigue siendo muy baja, posiblemente por la falta de información. Entre 2008 y 2016 se vendieron 22.000 dosis de la hemovacuna por año aproximadamente, a pesar de que hay dos millones de terneros en el área de control de garrapata (DICOSE-SNIG, 2017; Miraballes y col., 2018).

Cada productor de acuerdo con los resultados obtenidos podrá decidir qué vacuna utilizar, ya que pueden ser incluidos sólo los agentes para los cuales se requiera inmunidad (Bock y de Vos, 2001; Miraballes y col., 2018). Por ejemplo, si *B. bovis* no está presente, podrá premunizar sólo contra *B. bigemina* y *A. marginale*.

Es responsabilidad de los profesionales veterinarios que el manejo y la conservación de la vacuna se haga de forma correcta para evitar fallas. Las vacunas refrigeradas pueden ser aplicadas hasta 72 horas después del envío, manteniéndolas en todo momento refrigeradas (Solari y Quintana, 1994). En el caso de la vacuna congelada se debe conservar en nitrógeno líquido y descongelar a baño María (entre 37 °C y 38 °C), una vez descongelada, la validez de uso es por 6 horas, debiendo mantenerse refrigerada durante la inoculación y no se pueden volver a congelar (BioSur, 2017).

7 CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

- ✓ El equilibrio enzoótico simultáneo para los tres agentes de la tristeza parasitaria es infrecuente en el departamento de Tacuarembó.
- ✓ Encontrarse en una zona infectada por la garrapata *R. microplus* no asegura que los animales se inmunicen contra hemoparásitos antes de los 9 meses.
- ✓ La serología y la vacunación de los rodeos son herramientas que deben utilizarse para prevenir muertes por brotes de hemoparásitos y cuando se establecen medidas de control de la garrapata.
- ✓ La vacunación para tristeza parasitaria en la zona de control de garrapata debe aumentar.

8 **BIBLIOGRAFÍA**

1. Alonso, M., Arellano-Sota, C., Cereser, V. H., Cordoves, C. O., Guglielmone, A. A., Kessler, R., Vega, C. A. (1992). Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 11: 713-733.
2. Aleman, M., Carlsson, G.P (2009). Diseases of the hemolymphatic systems. En: Smith, B.P. *Large animal medicine*. 4a ed. St. Louis, Mosby Elsevier. p. 1155-1159.
3. Aubry, P., Geale, D. W. (2011). A review of Bovine Anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(1): 1-30.
4. Ávila, D. (1998). Análisis cuantitativo de los costos a nivel del país y del productor por la presencia de la garrapata en Uruguay, Informe IAEA.DILAVE-MGAP. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Dilave.htm>. Fecha de consulta: 10/10/2017.
5. Azambuja, C., Gayo, V. (1995) Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of *Babesia bovis* in cattle and in tick (*Boophilus microplus*). VII Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias, Buenos Aires, Argentina.
6. Azambuja, C., Gayo, V., Solari, M.A., Suárez, M., Stoll, M. (1994) Biotechnology Applied to the Detection of Infectious Agents in Cattle. *Rev. Bras. Parasitol. Vet* 3 (1): 01-04.
7. Babes, V. (1888). Sur l'hémogloburie bacterienne du boeuf. *CR Hebd Acad. Sci*, 107: 692-695.
8. Barros, C. S. L., Driemeier, D., Dutra, I. S., Lemos, R. A. A. (2006). Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil. *Agnes*, São Paulo, 166-171.
9. Benavides, E., Romero Prada, J., Villamil Jiménez, L. C. (2016). Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enfermedad que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático: guía para el manejo de garrapatas y adaptación al cambio climático (No. IICA L72). IICA, Bogotá (Colombia) Universidad de La Salle, Bogotá (Colombia). Disponible en: <http://repiica.iica.int/docs/B4212e/B4212e.pdf>. Fecha de consulta: 11/9/2017.
10. Bennet, G. (1974)a. Oviposition of *Boophilus microplus* Canestrini (Acarida: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. *Acarología*, 16(1):52-61.
11. BioSur (2017). Manejo de la vacuna HemoVac C en ganado adulto. Disponible en: <https://www.biosur.com.uy/material-informativo>. Fecha de consulta: 10/10/2018.
12. Bock R, Jackson L, De Vos A, Jorgensen W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*. 129 :S247-S269.
13. Bock RE, de Vos AJ. (2001). Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust Vet J* 79: 832-839.
14. Boonchit, S., Xuan, X., Yokoyama, N., Goff, W. L., Waghela, S. D., Wagner, G., Igarashi, I. (2004). Improved enzyme-linked immune sorbent assay using C-terminal truncated recombinant antigens of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein-1 for detection of specific antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4):1601-1604.
15. Buening GM. (1991) Diagnosis of Babesiosis: Past, present and future. En: *Memorias del II seminario internacional de parasitología animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten*. Morelos, México, p:180-189.

16. 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 Facultad de Veterinaria, Udelar, 64 p.
17. Callow, L. L. (1968). The infection of *Boophilus microplus* with *Babesia bigemina*. Parasitology, 58(3): 663-670.
18. Callow, L. L., McGavin, M. D. (1963). Cerebral babesiosis due to *Babesia argentina*. Australian Veterinary Journal, 39(1):15-21.
19. Callow LL, Dalglesht RJ, De Vos AJ. (1997). Development of effective living vaccines against bovine babesiosis - The longest field trial? Int J Parasitol 27(7):747-767.
20. Carrique, J., Ribera, H. 2000. Manual Práctico sobre Garrapatas y Enfermedades transmitidas por Garrapatas. Santa Cruz, LIDIVET. 36 p.
21. Cardozo, H., Solari, M.A., Etchebarne, J. (1992) Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of *Babesia bovis* and its use in a Sanitary Campaign against *Boophilus microplus* in Uruguay. Proceeding of a Final Reserch Coordination Meeting of an FAO/IAEA/SIDA. Heredia. Costa Rica. p 185-191.
22. [Cardozo](#), H., Nari, A., Franchi, M., López, A., Donatti, N. (1984). Estudio sobre la ecología de *Boophilus microplus* en tres áreas enzoóticas del Uruguay. Veterinaria (Montevideo) 20:4-10.
23. Cardozo, H., Franchi, M (1994) Garrapata, Epidemiología y control de *Boophilus microplus*. En Nari: A., Fiel, C. Enfermedades de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control. Montevideo, Hemisferio Sur. p.369-407.
24. Castro, E. R., Trenchi, H. (1955). Fauna parasitológica comprobada en el Uruguay, y bibliografía parasitológica nacional. Pando, MGA, 84 p.
25. Christensson (1987) Clinical and serological response after experimental inoculation with *Babesia divergens* of newborn calves with and without maternal antibodies. Acta Vet. Scand., 28: 381–392.
26. Cuore U., Cardozo, H., Solari M.A., Cicero, L. (2013). Epidemiología y control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay. En: Fiel C., Nari A. (2013) Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Uruguay. Ed. Hemisferio Sur. pp. 457-484.
27. Cuore U, Gayo V, Solari M A. (2016) Monitoreo de las parasitosis a través de animales centinela. Opción Veterinaria. 1(4):24-29.
28. Cuore U, Altuna M, Cicero L, Fernández F, Luengo L, Mendoza R, Nari A, Pérez Rama R, Solari M, 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) 48:5-13.
29. MGAP: DICOSE-SNIG (2017). Datos abiertos basados en la Declaración jurada anual de existencias. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/institucional/datos-abiertos/xml/2017>. Fecha de consulta 15/10/2017.
30. Dominguez, A. (1992). Inmunofluorescencia. Primer Taller Internacional sobre Diagnóstico y Control de Anaplasmosis y Babesiosis en rumiantes. Yucatán México. pp. 70 - 71.

31. Dutra, F. (2017) Anaplasmosis en vacas Holando. Publicación del Laboratorio Regional Este de DILAVE "Miguel C. Rubino" MGAP. Treina y Tres, Uruguay. pp 12-14
32. Erp, E., Fahrney, D. (1975). Exit of *Anaplasma marginale* from bovine red blood cells. American Journal of Veterinary Research, 36(5):707-709.
33. Errico, F., Nari, A., Cuore, U., Mendoza, R., Suárez, H., Mesa, P., Fernández, S., Sosa, E., Salada, D., Saporiti, D. (2009). Una nueva Ley de lucha contra la garrapata *Boophilus microplus* en el Uruguay. Revista Instituto Plan Agropecuario 131: 42-47.
34. FAO (2004). Guideline resistance management and integrated parasite control in ruminants. Agriculture Department. Module 1. Ticks: Acaricide resistance, diagnosis, management and prevention. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Animal Production and Health Division, Roma. pp 1- 32. Disponible en: http://www.fao.org/documents/pub_dett.asp?lang=en&pub_id=191821. Fecha de consulta: 17/08/2017.
35. Francis, D.H.; Kinden, D. A. y Buening, G. M. (1979). Characterization of the inclusion limiting membrane of *Anaplasma marginale* by immunoferriting labeling. Am. J. Vet. Res. 40: 777-782.
36. Fry, M. M., McGavin, M. D. (2007). Bone marrow, blood cells, and lymphatic system. En: McGavin, M.D., Zachary, J.F. Pathologic basis of veterinary diseases. 4a ed. St. Louis, Mosby Elsevier, p.743-832.
37. Floyd, R.B (1987) Modelling tick populations. Host-finding phase. ACIAR Proceedings Australian Centre for International Agricultural Research 17:48-51.
38. Guglielmone, A. (1991). Epizootiología de las enfermedades hemoparasitarias de los vacunos (No. SF 967. P3. G83 1991). FAO, Red de Cooperación técnica entre Laboratorios de Investigación y Diagnóstico Veterinario, Programa Hemoparásitos. Santiago de Chile, 54 p.
39. Guglielmone, A. A. (1995). Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. Veterinary Parasitology, 57(1-3): 109-119.
40. Guglielmone, A. A., Bermúdez, A., Hadani, A., Mangold, A. J., Vanzini, V. R., Luciani, C. A., Galletto, C. (1981). Aislamiento de una cepa de *Babesia bigemina* por la parasitación de un ternero con *Boophilus microplus* adultos. Gac. Vet., 43: 341-347.
41. Hutyra, F., Manninger, R., Marek, H., Mócsy, M. (1973). Patología y terapéutica especiales de los animales domésticos. Barcelona. Editorial Labor pp: 319-360
42. IICA (1985). Técnica para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovinas. Comité de expertos sobre hematozoarios del área. San José, IICA, 79 p. Disponible en: <http://repiica.iica.int/docs/B1335e/B1335e.pdf> Fecha de consulta: 20 de octubre de 2017.
43. IICA (1987). Técnicas para el diagnóstico de Babesiosis y Anaplasmosis bovinas; primer informe. Comité de expertos sobre hematozoarios del área Sur del IICA. San José, Costa Rica. 79 p. Disponible en: <http://repiica.iica.int/docs/B1335e/B1335e.pdf>. Fecha de consulta: 09/10/2017
44. Jonsson, N. N.; Piper, E. K. (2007) Integrated control programs for ticks on cattle. Queensland, The University of Queensland, 163 p
45. Kocan, K. (1986). Development of *Anaplasma marginale* in ixodid ticks: coordinated development of a rickettsial organism and its tick host, p. 472–505. In J. R. Sauer and J. A. Hair, Morphology, physiology and behavioral ecology of ticks. Ellis Horwood., Chichester.

46. Kocan, K. M., W. L. Goff, D. Stiller, P. L. Claypool, W. Edwards, S. A. Ewing, J. A. Hair, and S. J. Barron. (1992). Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible cattle. *J. Med. Entomol.* 29:657–668.
47. Kocan, K., Stiller, D., Goff, W., Claypool, P., Edwards, W., Ewing, S., McGuire, T., Hair, J., Barron, S. (1996). Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from infected to susceptible cattle. *Am. J. Vet. Res.* 53:499–507.
48. Kocan, K.M.; Blouin, E. F. y Barbet, A. F. (2000). Anaplasmosis control. Past, present and future. *Ann. NY. Acad. Sci.* 966: 501- 509.
49. Kocan, K., De la Fuente, J., Guglielmone, A., Meléndez, R. (2003). Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *Journal of Clinical Microbiology.* 16(4):698–712.
50. Kreier, J. P., Ristic, M. (1973). Organisms of the family Anaplasmataceae in the forthcoming 8th edition of Bergey's Manual. Proceedings of the 6th National Anaplasmosis Conference. Las Vegas, Estados Unidos. p. 24-28.
51. Kuttler, K., (1988). World-wide impact of babesiosis. En: Ristic, M., Babesiosis of Domestic Animals and Man. CRC Press, Boca Ratón, pp 1– 22.
52. Levine, N. D. (1971). Taxonomy of the piroplasms. *Transactions of the American Microscopical Society,* 2-33.
53. Mangold, A. J., Mastropaolo, M. (2013). Epidemiología y control de hemoparásitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en Argentina. En: Fiel, C., A. Nari Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Fundamentos epidemiológicos para su prevención y control. Buenos Aires, Hemisferio Sur, p 639-655.
54. Mahoney, L.L. (1977) The diagnosis of babesiosis in Australia. En: Wells, E. A. Workshop on Hemoparasites. Anaplasma and Babesiosis. Cali, CIAT. p. 49-64.
55. MGAP-DIGESEGA (2009) Una nueva ley de lucha contra la garrapata *Boophilus microplus* en el Uruguay. *Revista del Plan Agropecuario* 131:42-47.
56. Miraballes C, Lara S, Lorenzelli E, Lemos E, Riet-Correa F (2018) Eficacia de dos vacunas, congelada y refrigerada, contra la tristeza parasitaria. *Veterinaria (Montevideo)* 55(209):9-13.
57. Molloy, J. B., Bowles, P. M., Bock, R. E., Turton, J. A., Katsande, T. C., Katende, J. M., Dalgliesh, R. J. (1998). Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bovis* in cattle in Australia and Zimbabwe. *Preventive Veterinary Medicine,* 33(1-4):59-67.
58. Mosqueda J., Olvera A., Aguilar G., Cantó G. (2012). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry,* 19:1504- 1518.
59. Nari, A., Solari, M. A. (1991). Epidemiología y control del *Boophilus microplus* en Uruguay. Su relación con *Babesia* spp. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias (Cuba)* 22:149-159.
60. Nari, A., Bawden, R., Berdié, J., Canábez, F., Cardozo, H. (1978). Estudio preliminar sobre la ecología de *Boophilus microplus* (Can) en Uruguay: ciclo no parasitario en un área considerada poco apta para su desarrollo. *Jornadas de Buiatria.* Paysandu, Uruguay, p. 1-8.

61. Nari A. (1995). Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Vet Parasitol* 57: 153-165.
62. Norton J.H., Parker,R.J., Forbes-Faulkner, J.C. (1983) Neonatal anaplasmosis in a calf. *Australian Veterinary Journal* 60:348. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-0813.1983.tb02844.x> Fecha de consulta: 23 de octubre de 2017.
63. Nuñez, J.; Muñoz, M.; Moltedo, H. (1982). *Boophilus microplus*. La garrapata común del ganado vacuno, Buenos Aires, Hemisferio Sur, 184p.
64. OIE (2015) Anaplasmosis Bovina. En OIE. Manual Terrestre de la OIE. Disponible en:http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.01_Anaplasmosis_bovina.pdf Fecha de consulta: 24 de octubre de 2017.
65. OIE (2008) Babesiosis bovina. En: OIE. Manual de la OIE sobre animales terrestres.Disponible en:http://wahis2devt.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.02.%20Babesiosis%20bovina.pdf Fecha de consulta: 24 de octubre de 2017.
66. Paine, G.D., Miller, A.S., (1977). Anaplasmosis in a newborn calf. *Vet. Rec*, 100: 58.
67. Palmer, G. H., McElwain, T. F. (1995). Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 57(1-3):233-253.
68. Pasturino, C.L., Quiñones, C. (1963). Técnicas aplicadas en el Servicio de Premunición. MGAP, CIVET <Miguel C. Rubino>, 1 (1): 1-16.
69. Patarroyo, J. H., Vargas, M. I., Bicudo, P. L. (1982). Description of lesions in cattle in a natural outbreak of *Babesia bovis* infection in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 11(4), 301-308.
70. Petraccia, C., Nari, A.,Cardozo, H. (1988). Trials on the strategic control of *Boophilus microplus* with flumethrin 1% pour-on in Uruguay. *Veterinary Medical Review*. 59:18-22.
71. Quiroz, R. H. (2000). Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos. 10a ed. Limusa. México D.F. pp. 187 - 797.
72. Richey, E. J., Palmer, G. H. (1990). Bovine anaplasmosis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 12(11):1661-1668.
73. Riek, R. F. (1964). The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Australian Journal of Agricultural Research*, 15(5): 802-821.
74. Riek, R. F. (1966). Life cycle of *Babesia argentina* (Lignières,1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Australian Journal of Agricultural Research*, 17(2): 247-254.
75. Riek, R. F. (1968). Babesiosis. En: Weinman, D., Ristic, M. *Infectious Blood Diseases of Man and Animals*. New York, Academic Press, 492p.
76. Ríos-Osorio LA, Zapata-Salas R, Reyes J, Mejía J, Baena, A. (2010). Estabilidad enzoótica de babesiosis bovina en la región de Puerto Berrío, Colombia. *Revista Científica (Maracaibo)* 20:485-492.

77. 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: 267.
78. Rodríguez-Vivas, R. I., Quiñones, A. F., Ramírez, C. G. (2005). Epidemiología, prevención y control de la babesiosis bovina. En: Rodríguez-Vivas, R. I. *Enfermedades de importancia económica en producción animal*. México DF: McGraw-Hill, p. 205-225.
79. Romano, A. (1994). GARRAPATA. Epidemiología y control de *Boophilus microplus* en Argentina. *Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos*. Ed. A. Nari y C. Fiel. Hemisferio Sur. p, 301-317.
80. 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.
81. Salih DA, El Hussein AM, Singla LD (2015) Diagnostic approaches for tick-borne haemoparasitic diseases in livestock. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* 7:45-56.
82. Sanchis, 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.
83. Smith T y Kilborne FL. (1893) Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. Washington, Government printing office, 301 p.
84. Solari, M. A. (1989). Aspectos epidemiológicos de babesiosis en Uruguay. En: FAO. *La erradicación de las garrapatas*. Roma, FAO. p. 297-309.
85. Solari, M. A. (2006). Epidemiología y perspectivas en el control de hemoparásitos. XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, p.36-40.
86. Solari, M. A., Nari, A., Petraccia, C. (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.
87. Solari, M. A., Quintana, S. (1994). Epidemiología y prevención de los hemoparásitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en el Uruguay. En: Nari, A.; Fiel, C. *Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos*. Montevideo, Hemisferio Sur, p.481-507.
88. Solari, M.; Nari, A.; Cardozo, H. (1992). Impact of *Babesia Bovis* and *Babesia Bigemina* on the production of beef cattle in Uruguay. Disponible en: [http://www.scielo.br/pdf/mioc/v87s3/vol87\(fsup3\)_147-153.pdf](http://www.scielo.br/pdf/mioc/v87s3/vol87(fsup3)_147-153.pdf). Fecha de consulta: 20/06/2018.
89. Solari, M.A., Dutra, F., Quintana, S., (2013). Epidemiología y prevención de los hemoparásitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en el Uruguay. En Fiel, C., Nari, A. *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes*. Fundamentos para su prevención y control. Buenos Aires. Editorial Hemisferio Sur. pp 657-608.
90. Soulsby, E. (1987). *Parasitología y Enfermedades parasitarias en los Animales Domésticos*. 7a ed. México Interamericana, p.719 - 767.
91. Stiles, G. (1936). Mechanical transmission of anaplasmosis by unclean instruments. *North Am. Vet*, 17: 39-41.

92. Suarez, C. E., Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 180(1-2): 109-125.
93. Sutherst, R.W., Kerr, J.K. (1986) Losses in Livestock Productivity caused by ticks and tick-borne diseases. Proceedings of an international workshop on the ecology of ticks and epidemiology of tick-borne diseases. Nyanga, Zimbabwe, p. 108-112.
94. Theiler, A. (1910). *Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov.): The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. Pretoria: Government Printing and Stationary Office.
95. Uruguay. Ley N° 18268 de 25 de Abril de 2008. Lucha contra la Garrapata *Boophilus microplus* (garrapata común del bovino). Disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/leyes/18268-2008/20>. Fecha de consulta: 10/06/2018.
96. Uruguay. Ley N° 3606 de 26 de Abril de 1910. Ley de Policía Sanitaria Animal. Disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/leyes/3606-1910>. Fecha de consulta: 10/06/2018.
97. Vanzini, V. R., Ramírez, L. M. (1994). Babesiosis y Anaplasmosis Bovina: Diagnóstico, epidemiología y control. INTA-Argentina RIA, 25(3):137-190.
98. 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.
99. Zaugg, J.L., (1985). Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *Am. J. Vet. Res.* 46:570–572.