



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**IDENTIFICACIÓN, DINÁMICA DE ELIMINACIÓN DE
OOQUISTES DE *EIMERIA* SPP. Y SU ASOCIACIÓN CON LA
EDAD DE LOS TERNEROS**

Anderson Saravia

TESIS DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL

URUGUAY
2020



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**IDENTIFICACIÓN, DINÁMICA DE ELIMINACIÓN DE
OOQUISTES DE *EIMERIA* SPP. Y SU ASOCIACIÓN CON LA
EDAD DE LOS TERNEROS**

Anderson Saravia

Eleonor Castro-Janer
Directora de Tesis

2020

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Dr. Andrés Gil
Asistente Académico
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República – Uruguay

Dr. Franklin Riet-Correa
Director de la Plataforma de Investigación en Salud
Animal (PSA)
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
(INIA) – Uruguay

Dr. José Manuel Venzal
Profesor Agregado- Laboratorio de Vectores y
Enfermedades Transmitidas.
CENUR Litoral Norte-SALTO.
Universidad de la República - Uruguay

ACTA DE DEFENSA DE TESIS



FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL

IDENTIFICACIÓN, DINÁMICA DE ELIMINACIÓN DE OOQUISTES
DE *EIMERIA SPP.* Y SU ASOCIACIÓN CON LA EDAD DE LOS
TERNEROS

Por: Lic. Anderson SARAVIA DE MELO

Directora de Tesis: Dra. Eleonor Castro Janer

Tribunal

Presidente: Dr. Andrés Gil

Segundo Miembro: Dr. Franklin Riet-Correa

Tercer Miembro: Dr. José Manuel Venzal

Fallo del Tribunal: APROBADO CON MENCIÓN

MIÉRCOLES 3 DE JUNIO DE 2020, 16 HORAS.

SALA VIRTUAL 20 DE PLATAFORMA ZOOM.

El Fallo de aprobación de la Tesis puede ser: Aprobada (corresponde a la nota BBB- en el Acta), o Aprobada con Mención (corresponde a la nota SSS- 12 en el Acta)

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Elinor Castro por su guía y apoyo para llevar a cabo este proyecto.

A mis compañeros de la Plataforma de Investigación en Salud Animal de INIA La Estanzuela.

Al equipo de Lechería de INIA La Estanzuela, principalmente a Bruno López por su ayuda en el muestreo y recolección de datos.

A la Dra. Cecilia Miraballes, al Dr. Luis Gustavo Corbellini y al Dr. Henrik Stryhn por su colaboración con el análisis estadístico de los datos.

A mi familia y amigos por estar siempre cuando se los necesitó.

A Ana Laura y Leandro por darme fuerza, inspiración, motivación y apoyo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE	ii
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
SUMMARY	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Especies que afectan a los bovinos.....	2
1.2. Distribución y prevalencia.....	2
1.3. Ciclo de vida	3
1.4. Clínica	4
1.5. Diagnóstico.....	5
1.6. Control y Tratamiento.....	6
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	9
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	10
3.1. Hipótesis.....	11
3.2. Objetivos	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1. Identificación de especies de <i>Eimeria</i>	12
4.1.1. Ubicación de los establecimientos.....	12
4.1.2. Recuento de ooquistes	12
4.1.3. Cultivo e identificación de especies	13
4.2. Dinámica de eliminación de ooquistes y su asociación con la edad de los terneros	14
4.2.1. Recuento de ooquistes	14
4.2.2. Cultivo e identificación de especie	15
4.3. Análisis estadísticos:	15
5. RESULTADOS	16
5.1. Identificación de especies.....	16
5.2. Dinámica de eliminación de ooquistes y su asociación con la edad de los terneros	17
6. DISCUSIÓN	23
7. CONCLUSIONES.....	27
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro I. Drogas anticoccidiales, indicación y sitio de acción.

Cuadro II. Prevalencia de *Eimeria* spp. identificadas en 12 establecimientos de cría de terneros en Uruguay.

Cuadro III. Morfometría y regresión lineal de ooquistes identificados.

Cuadro IV. Variación de los valores de ooquistes por gramo de materia fecal (OPG) en el tambo experimental de acuerdo con el grupo de edad y la fecha de muestreo.

Figura 1. Ubicación geográfica de los establecimientos que enviaron muestras de materia fecal al el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) (2016 – 2018).

Figura 2. Promedio de precipitación acumulada, temperatura media y humedad relativa durante los meses de crianza en el tambo de INIA en el año 2016.

Figura 3. Especies de *Eimeria* identificadas en materia fecal de terneros.

Figura 4. Comparación de la regresión lineal de las mediciones de los ooquistes esporulados de *Eimeria* spp. recuperados en materia fecal de terneros provenientes de establecimientos rurales de Uruguay.

Figura 5. Número total de terneros en la “guachera” y terneros que tuvieron diarrea durante los meses de la crianza (2016).

Figura 6. Probabilidad de la presencia de ooquistes según el grupo de edad predicho por el modelo de probabilidades proporcionales.

Figura 7. Porcentaje *Eimeria* spp. durante los meses de la crianza (2016).

RESUMEN

La eimeriosis bovina es una enfermedad de gran impacto mundial que afecta principalmente animales jóvenes, produciendo grandes pérdidas económicas. Si bien se describe la presencia de esta parasitosis en Uruguay, poco se sabe sobre las especies que afectan a los bovinos. El objetivo de este trabajo fue identificar *Eimeria* spp. en materia fecal de terneros en 12 establecimientos y describir la dinámica de la eliminación de ooquistes y su asociación con la edad de los terneros en uno de estos establecimientos. Después de cultivarse durante 10 días, las especies se identificaron considerando las características morfométricas de los ooquistes esporulados. Se identificaron nueve especies; *Eimeria. zuernii*, *E. bovis*, *E. ellipsoidalis*, *E. auburnensis*, *E. canadensis*, *E. alabamensis*, *E. illinoisensis*, *E. wyomingensis* y *E. cylindrica*. Dos de las especies consideradas como altamente patógenas para el ganado (*E. bovis* y *E. zuernii*) estaban presentes en altas prevalencias en los cultivos. Para evaluar la dinámica de la eliminación de ooquistes y su asociación con la edad de los terneros se realizó un muestreo semanal de materia fecal de 97 terneros durante siete meses. De las 716 muestras fecales, 67,88% fueron negativas, 25,84% tenían entre 40 y 4000 ooquistes por gramos de materia fecal (OPG), y 6,28% tenían más de 4000 OPG. El pico de eliminación de ooquistes ocurrió entre los días 21 y 40. Este grupo de edad, además de haber tenido más probabilidades de tener valores medios y altos de OPG (OR: 54,14), tuvo una alta eliminación de ooquistes de *E. bovis* y *E. zuernii*, lo que sugiere que este es un período crítico para la aparición de la eimeriosis. Debido a esto, los terneros que tienen entre 21 y 40 días de edad son los más propensos a ser afectados por la eimeriosis y las medidas de control y prevención deben centrarse en el manejo y monitoreo de los animales en esta edad.

SUMMARY

Bovine eimeriosis is a disease of great global impact that mainly affects young animals, producing large economic losses. Although the presence of this parasitosis in Uruguay is described, little is known about the species that affect cattle. This work aimed to identify the *Eimeria* spp. in feces of calves from 10 dairy farms and describe the dynamics of oocyst elimination and its association with the ages of calves in one of those farms. After being cultivated for 10 days the species were identified considering the morphometric characteristics of the sporulated oocysts. Nine species were identified; *E. zuernii*, *E. bovis*, *E. ellipsoidalis*, *E. auburnensis*, *E. canadensis*, *E. alabamensis*, *E. illinoisensis*, *E. wyomingensis* and *E. cylindrica*. Two of the species considered highly pathogenic for livestock (*E. bovis* and *E. zuernii*) were present in high prevalence in cultures. To evaluate the dynamics of oocyst elimination and its association with the age of the calves, a weekly fecal sample were extracted of 97 calves was carried out over seven months. Of the 716 fecal samples, 67.88% were negative, 25.84% had between 40 and 4,000 oocysts per gram of feces (OPG), and 6.28% had more than 4,000 OPG. The peak of oocyst elimination occurred between days 21 and 40. This age group, in addition to have been more odds to have medium and high OPG values (OR: 54.14), had a high elimination of oocysts of *E. bovis* and *E. zuernii*, suggesting that this is the critical period for the occurrence of eimeriosis. Because of this, calves between 21 and 40 days old are the most likely to be affected by eimeriosis and control and prevention measures should focus on the management and monitoring of animals at this age.

1. INTRODUCCIÓN

La eimeriosis es una de las coccidiosis más comunes en el ganado bovino y es producida por protozoarios del género *Eimeria* afectando principalmente a animales menores de un año y muy rara vez a animales adultos (Sudhakara Reddy et al., 2013). Produce sintomatologías clínicas como diarrea, anorexia, deshidratación y en muchos casos la muerte (Sánchez et al., 2013). Los terneros entran en contacto con los ooquistes durante los primeros días de vida y desarrollan su inmunidad frente a las diferentes especies de *Eimeria*. La intensidad de la infección va a depender de la carga ambiental de ooquistes a la que son expuestos y a su capacidad inmunológica de responder frente a la infección (Sánchez, 2007). Algunos animales pueden pasar asintomáticos en los casos leves, con alguna diarrea y decaimiento, pero al ser autolimitante se recuperan rápidamente una vez que termina el ciclo en el intestino del animal (Daugochies y Najdrowski, 2005). En casos más graves, los animales sufren inanición, pérdida de peso, acidosis, deshidratación y pueden llegar a la muerte. Las heces son líquidas con mucho olor, conteniendo desde trozos de mucosa, fibrina y sangre. La aparición de los signos clínicos va a depender de la cantidad de ooquistes ingeridos, la especie involucrada y la respuesta inmunitaria del animal (Sánchez et al., 2013).

Se estiman en más de 700 millones de dólares por año a nivel mundial las pérdidas económicas generadas por la coccidiosis en bovinos y en búfalos, además de una reducción del 2 al 11% en la producción, donde el factor más importante es el tiempo que demoran las terneras a llegar a su primera inseminación (Sánchez et al., 2013). Lassen y Østergaard (2012) estimaron las pérdidas productivas en Estonia, donde con el escenario más favorable, las pérdidas llegaron a los USD 9,13 por ternero/año con una variación en la producción de 8 - 9%, siendo la necesidad de reemplazos y el menor rendimiento de las novillas los principales factores asociados. No existe ningún estudio del impacto económico a nivel de Latinoamérica, pero en Argentina se considera una de las principales enfermedades parasitarias que causan mortalidad de terneros (Sánchez et al., 2013). En Brasil, un estudio sobre pérdidas económicas producidas por muertes por parasitosis en bovino presenta valores de R\$16.968.000/año, aproximadamente USD 4,46 millones, con una incidencia de coccidiosis del 1,84% de los casos en la población estudiada (Oliveira et al., 2017).

1.1. Especies que afectan a los bovinos

El género *Eimeria* forma parte del Filo Apicomplexa, Clase Sporozoa, Subclase Coccidea, Suborden Eimeriina y Familia Eimeriidae (Cordero del Campillo et al., 2000) y la descripción casi simultánea de algunas de ellas por distintos autores ha generado complicaciones en su taxonomía y clasificación (Radostits y Done, 2007; Sánchez, 2007). Actualmente se reconocen 14 especies que afectan al bovino: *Eimeria alabamensis* Christensen, 1941; *E. auburnensis* Christensen & Porter, 1939; *E. bovis* (Zublin, 1908) Fiebiger, 1912; *E. brasiliensis* Torres & Ramos, 1939; *E. bukidnonensis* Tubangui, 1931; *E. canadensis* Bruce, 1921; *E. cylindrica* Wilson, 1931; *E. ellipsoidalis* Becker & Frye, 1929; *E. illinoisensis* Levine & Ivens, 1967; *E. pellita* Supperer, 1952; *E. subspherica* Christensen, 1941; *E. wyomingensis* Huizinga & Winger, 1942; *E. zuernii* (Rivolta, 1878) Martin, 1909; (Levine & Ivens, 1967) y *E. idelfonsoi* la cual fue descrita en un estudio reciente realizado en Brasil (Florião et al., 2016) contradiciendo a Levine & Ivens (1967) que la consideraban como un sinónimo de *E. auburnensis*.

La identificación de las diferentes especies es realizada mediante la observación de características morfológicas específicas de los ooquistes esporulados, tal como el ancho, largo y presencia o no de micrópilo, entre otras (Berto et al., 2014). Debido a que es una técnica muy dependiente del observador, muchas veces surgen diferencias entre los autores. El polimorfismo de las especies es otro aspecto para tener en cuenta, debido a que puede aparecer variabilidad en las mediciones. Estas diferencias aparecen cuando el animal es sometido a diferentes condiciones de estrés, nutrición, dosis infectiva de ooquistes, inmunidad del hospedero (Berto et al., 2014) y por la presión de los tratamientos (Florião et al., 2016).

1.2. Distribución y prevalencia

La coccidiosis bovina tiene una distribución mundial y su prevalencia está afectada principalmente por la edad de los animales y por su condición de manejo (Sánchez et al., 2013). En Norte América existe una alta prevalencia de la infección en terneros

post desleche, en el momento que son confinados en espacios pequeños en condiciones sucias y húmedas, generando brotes con la contaminación del agua y los alimentos (Radostits y Done, 2007). En Alemania las tasas de prevalencia variaron entre 2% y 48% de los rebaños de vacas y terneros y en Holanda de 10 a 100% de los establecimientos en rebaños de terneros (Dauguschies y Najdrowski, 2005). En Argentina, doce especies fueron identificadas, siendo *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. auburnensis* y *E. ellipsoidalis* las más prevalentes (Sánchez et al., 2008). En terneros menores de un año se ha encontrado 64,3% de prevalencia siendo muy común la infección simultánea de diferentes especies de *Eimeria*. Dicha prevalencia depende de las condiciones de manejo, edad de los animales y factores climáticos de cada establecimiento (Sánchez et al., 2013).

1.3. Ciclo de vida

Los bovinos se infectan cuando ingieren alimentos contaminados con ooquistes esporulados (forma infectante), pero la aparición de ooquistes en la materia fecal depende del período prepatente de cada especie, para *E. bovis*, *E. zuernii* y *E. auburnensis* ese período es de 16 a 21 días y para *E. alabamensis* y *E. ellipsoidalis* de 6 a 12 días (Levine & Levine, 1985). La esporogonia es la fase asexual donde el ooquiste se divide en cuatro esporoblastos, que van a dividirse generando dos esporozoítos cada uno. Una vez ingeridos por el animal, la pared del ooquiste se rompe y son liberados en el intestino. Luego, estos esporozoítos invaden las células epiteliales y comienzan la reproducción por fisión múltiple; esta etapa es conocida como esquizogonia. Esta reproducción acelerada da lugar a la primera generación de esquizontes que contiene numerosos merozoítos. Cuando los esquizontes son maduros, rompen la pared de las células liberando los merozoítos, los cuales van a infectar otras células dando lugar a la segunda generación de esquizontes. La gametogonia es la etapa sexuada de las eimerias donde se forman los macrogametocitos y microgametocitos a partir de la segunda generación de merozoítos. La fertilización de los macrogametocitos mediante los microgametos biflagelados y la posterior liberación de los ooquistes causan daños funcionales y estructurales al intestino grueso formando lesiones importantes a nivel de intestino (Radostits y Done, 2007). La ubicación de las diferentes fases del ciclo a nivel del

intestino depende de cada especie. *E. bovis* y *E. zuernii* en su primera esquizogonía producen más de 120000 merozoítos a nivel del íleon, esto hace que gran cantidad de células del intestino grueso se vean afectadas en las siguientes fases del ciclo. La segunda generación de esquizontes se desarrolla en las células de las criptas del ciego y colon y en los casos de infecciones por *E. zuernii* pueden llegar hasta el recto produciendo entre 30 a 36 merozoítos por célula infectada. Éstas invaden nuevas células generando microgametocitos y macrogametocitos los cuales serán responsables de la etapa sexuada. Las lesiones causadas por esta etapa final son consideradas la de más alta patogenicidad (Sánchez et al., 2013).

1.4. Clínica

En casos leves, algunos animales pueden pasar de forma asintomática con diarrea transitoria y decaimiento, pero como es una enfermedad autolimitante se recuperan rápidamente (Dauguschies y Najdrowski, 2005). En casos más graves, los animales sufren inanición, pérdida de peso, acidosis, deshidratación y pueden llegar a la muerte. Las heces son líquidas con mucho olor, conteniendo desde trozos de mucosa, fibrina y sangre. También se encuentra reportado la presencia de fuertes tenesmos y prolapso rectal debido a las violentas contracciones (Gopalakrishnan et al., 2017).

La aparición de los signos clínicos va a depender de la cantidad de ooquistes ingeridos, la especie involucrada y la respuesta inmunitaria del animal. Las lesiones producidas por *E. zuernii* y *E. bovis* son principalmente en intestino grueso ya que la primera esquizogonía ocurre en el intestino delgado y no reviste gran importancia, debido a que no afectan células funcionales. Por otro lado, especies como *E. alabamensis* y *E. ellipsoidalis* cumplen todo su ciclo en el intestino delgado y la afectación de las células del epitelio está directamente relacionado con la patogénesis de la enfermedad (Sánchez et al., 2013).

La presentación de casos con signos nerviosos puede alcanzar entre un 20 al 30% del total de animales afectados entéricamente (Radostits y Done, 2007). En Argentina 12% de los casos de coccidiosis entérica presentaron signos nerviosos (Sánchez et al., 2013). Existen varias hipótesis que intentan explicar la coccidiosis nerviosa, pero

el cuadro clínico nunca pudo ser reproducido experimentalmente. Se detectó una neurotoxina en suero de terneros con coccidiosis entérica y signos neurológicos, la cual parece ser altamente lábil, pero no se pudo demostrar cuál es su rol en la patogénesis de los signos neurológicos asociados con la enfermedad (Isler et al., 1987).

1.5. Diagnóstico

En el momento de realizar el diagnóstico hay que tener en cuenta que la etiología de las diarreas puede deberse a diferentes factores. Existen varios agentes patógenos involucrados en las diarreas de terneros y muchas veces están coinfectando al mismo animal. Muchas de las diarreas son por causa viral, bacteriana u otras causas y que a menudo contiene cantidades moderadas de ooquistes de especies no patógenas que generalmente no son responsables de la sintomatología. *Cryptosporidium* spp. y *Eimerias* spp. son los protozoarios más importantes presentes en las diarreas y muchas veces son considerados como una misma enfermedad, aunque su diagnóstico, patogenia y especificidad de hospedador difieren significativamente (Jolley y Bardsley, 2006).

Para hacer un correcto diagnóstico de eimeriosis debemos realizar una buena anamnesis del rodeo, detectar la presencia de signos clínicos característicos como diarrea (generalmente sanguinolenta), disentería, anemia, deshidratación, debilidad, anorexia y emaciación, además de altos recuentos de ooquistes en materia fecal con presencia de *E. bovis* y/o *E. zuernii* (Sánchez et al., 2013). Se recomienda el estudio coprológico de varios animales (principalmente los afectados) ni bien se sospeche de la enfermedad, para así poder obtener una estimación real de la presencia de la eimeriosis en los animales (Daugschies y Najdrowski, 2005; Keeton y Navarre, 2017; Sánchez et al., 2013). En el caso de brotes de eimeriosis con mortalidad de animales, la histopatología es una herramienta muy útil para realizar el diagnóstico definitivo, mediante la determinación de lesiones macro y microscópicas en el íleon, ciego y colon (Dutra, 2015; Keeton y Navarre, 2017).

Los animales jóvenes normalmente son portadores de ooquistes y eliminan al medio valores menores a 4000 OPG (Rossanigo, 1997). Sin embargo, el número de ooquistes eliminados no está estrictamente relacionado con el grado de la enfermedad clínica, muchas veces los recuentos de ooquistes son bajos debido a que la parasitosis se encuentra en las primeras etapas, produciendo así falsos negativos (Daugšchies y Najdrowski, 2005; Dutra, 2015). En la mayoría de los casos clínicos los recuentos superan los 10000 OPG con la presencia de especies patógenas (Sánchez et al., 2013). Si bien es verdad que en esos casos los OPG alcanzan valores muy altos, éstos se mantienen por muy pocos días y muchas veces no los detectamos en los exámenes coprológicos. Debido a esto, la presencia de uno o más animales eliminando ooquistes en materia fecal sugiere un mayor riesgo de contraer la enfermedad (Daugšchies y Najdrowski, 2005).

Métodos serológicos como ELISA y Western blot han sido desarrollados para la detección de la infección en terneros, pero debido a varios motivos, estas técnicas no tuvieron éxitos. Entre los motivos principales están la presencia de los anticuerpos maternos provistos mediante al calostro, además de la posibilidad de una reacción cruzada entre especies. Aunque no es adecuado para el diagnóstico de rutina, los métodos serológicos son útiles para estudios epidemiológicos y experimentales. La detección de coproantígenos y métodos moleculares aún no están disponibles para diagnósticos de rutina (Daugšchies y Najdrowski, 2005).

1.6. Control y Tratamiento

Los signos clínicos de la eimeriosis son muy similares a los provocados por otros patógenos, pero los tratamientos terapéuticos son diferentes para cada uno de ellos. Para realizar un correcto tratamiento debemos tener un diagnóstico exacto y una precisa descripción de la situación epidemiológica del establecimiento. La implementación de medidas de prevención es considerada más eficaz que los tratamientos, debido a que muchas de las pérdidas en la producción son subclínicas, además de tener un gran impacto sobre el bienestar del animal (Keeton y Navarre, 2017). Se deben centrar los esfuerzos principalmente en mejorar el manejo de los

animales e instalaciones, así como la utilización de drogas en esquemas profilácticos y/o metafilácticos (Sánchez et al., 2013).

Cuadro I. Drogas anticoccidiales, indicación y sitio de acción.

Droga	Indicación	Dosis y forma de administración	Sitio de acción de las drogas		
			Esporozoítos Primera esquizogonia	Merozoítos* Segunda esquizogonia	Merozoítos** Gametogonia
Monensina	Preventivo	10 a 30 ppm en el alimento	X	X	
Lasalocid	Preventivo	10 a 30 ppm en el alimento	X	X	
Decoquinato	Preventivo	0,5 a 1 mg/kg pv durante 28 días en el alimento	X	X	
Amprolium	Preventivo	5 mg/kg pv durante 21 días en el alimento	X	X	
	Curativo	10 a 20 mg/kg pv durante 5 días oral	X	X	
Sulfametazina	Curativo	60 a 140 mg/kg pv durante 1 a 3 días oral o inyectable		X	
Sulfas combinadas	Preventivo/Curativo	Dosis y esquemas de dosificación variables		X	
	Curativo	15 mg/kg pv oral 1 dosis	X	X	X
Toltrazuril	Metafiláctico	15 mg/kg pv oral 1 dosis, una semana antes de esperar los cuadros de coccidiosis	X	X	X
	Curativo	1 mg/kg pv oral 1 dosis	X	X	X
Diclazuril	Metafiláctico	1 mg/kg pv oral 1 dosis, una semana antes de esperar los cuadros de coccidiosis	X	X	X
	Preventivo	0,2 mg/kg en el alimento	X	X	X

* Primera generación, ** segunda generación (Sánchez et al., 2013)

Generalmente el problema es ocasionado debido al hacinamiento de animales en corrales pequeños, pero puede ser un problema en potreros grandes cuando los

animales se acumulan en arroyos y/o refugios en los períodos de calor o frío extremos (Jolley y Bardsley, 2006). El brote generalmente dura pocas semanas, donde podemos observar animales con sintomatología clínica. Si bien lo recomendable para frenar un brote es tratar a todos los animales del grupo con drogas que aseguren una actividad frente a todos los estados parasitarios (Keeton y Navarre, 2017; Sánchez et al., 2013), esto puede resultar muy costoso y debe ser evaluado por cada establecimiento. Los animales afectados deberían ser separados de los demás para proporcionarles el tratamiento adecuado. La aplicación paliativa de electrolitos, glucosa y antidiarreicos puede ayudar a mantener la hemostasia, además del uso de antibióticos cuando se sospechan infecciones bacterianas secundarias (Daugschies y Najdrowski, 2005). Es recomendable vigilar el resto de los animales para detectar rápidamente aquellos animales que presenten signos clínicos y aplicarles lo antes posible el tratamiento. Otras acciones que pueden ayudar a frenar el brote es el cambio de ubicación de la “guachera” y el uso de desinfectantes a base de Cresol (Bangoura et al., 2012).

Lamentablemente los signos clínicos aparecen en la etapa final del ciclo de vida del parásito, donde la mayor parte del daño intestinal ya está establecido, por lo que el tratamiento con drogas anticoccidiales tiene poco efecto en la evolución de la enfermedad (Daugschies y Najdrowski, 2005). Como no todas las drogas actúan en la misma etapa del ciclo, es importante diferenciar entre drogas preventivas y curativas. En el **Cuadro I** se presentan las principales características de las diferentes drogas utilizadas (Sánchez et al., 2013). Las sulfas son comúnmente usadas para tratar las eimeriosis, pero poco se sabe sobre su mecanismo de acción. Se cree que su efectividad clínica puede estar más relacionada con el control de la enteritis bacteriana secundaria más que con un efecto directo sobre el parásito. Generalmente, la aplicación de una sola dosis de sulfa es suficiente para revertir los síntomas y mejorar de forma casi inmediata el estado de los animales (Rossanigo, 1997).

Si bien todas las drogas mencionadas en el **Cuadro I** tienen cierta efectividad sobre las coccidias, si queremos prevenir pérdidas por eimeriosis debemos tratar profilácticamente y/o metafilácticamente en vez de terapéuticamente (Daugschies y Najdrowski, 2005). Existen varios estudios que demuestran que la utilización de drogas anticoccidiales de forma preventiva genera una mejor ganancia de peso con respecto a los animales no tratados (Cruvinel et al., 2017; Philippe et al., 2014), pero

para esto se debe evaluar cuidadosamente la condición epidemiológica y el manejo del establecimiento, además de un monitoreo continuo de los animales. La utilización metafilácticas de una única dosis de los medicamentos de benceno acetónitrilo (diclazuril/ Toltrazuril) son efectivas para controlar las infecciones por *E. bovis* y *E. zuernii* (Dauguschies y Najdrowski, 2005; Philippe et al., 2014).

Aunque el uso de drogas anticoccidiales en los sistemas de producción de rumiantes generalmente no son de forma continua, como pasa en la producción avícola, el desarrollo de resistencia es algo para tener en cuenta (Jolley y Bardsley, 2006). Hasta el momento no se sabe si el tratamiento en el ganado también inducirá a la resistencia, pero no se puede ignorar el riesgo potencial si los compuestos se usan de forma continua durante períodos prolongados (Dauguschies y Najdrowski, 2005). Actualmente la resistencia anticoccidial en el ganado no se investiga ni se reporta, sin embargo, este problema tendrá que ser considerado en el futuro (Joachim et al., 2018). Algunos productores han reportado la falla del tratamiento, pero no se pudo determinar si se debía a errores en la administración, manejo de los animales, otras infecciones o de una resistencia real (Odden et al., 2017).

Las vacunas para el control de la eimeriosis bovina aún no están disponibles comercialmente. Si bien existen vacunas disponibles para aves de corral, no se ha podido desarrollar una vacuna eficaz para rumiantes, seguramente debido a que estos procedimientos son muy costosos y muchas veces sin éxito. Los principales problemas encontrados son la producción y recolección de ooquistes de animales, alteración de la infectividad o patogenicidad de los esporozoítos, entre otros (Jolley y Bardsley, 2006; Keeton y Navarre, 2017). El uso de plantas para el control de las eimeriosis es poco reportado, sin embargo, las especies *Sericea lespedeza* y *Curcuma longa* lograron controlar eficazmente la infección por *Eimeria* spp. y podrían ser consideradas para el uso en el tratamiento de la eimeriosis en rumiantes (Cervantes-valencia et al., 2016; Keeton y Navarre, 2017).

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

En el año 1938 el Dr. Miguel Rubino en un Boletín de la Dirección de Ganadería (XXII, N° 3) describe que desde el año 1918 existen coccidias que provocan diarrea sanguinolenta en los terneros en Uruguay (Rubino, 1946). Luego de presenciar varios casos de “Diarrea roja” y sospechando de que existían diferentes especies involucradas, deciden realizar un trabajo de identificación de eimerias. Para ese entonces muchos investigadores en todo el mundo habían realizado descripciones de diferentes especies de *Eimeria* que provocaban una sintomatología parecida, pero aún no había un consenso general ni un estudio taxonómico. A pesar de un minucioso trabajo en la descripción de las diferentes formas durante todas las fases parasitarias no lograron determinar con certeza cuál era la especie encontrada (Rubino, 1946). Unos años más tarde en el libro “Fauna Parasitológica Comprobada en el Uruguay, y Bibliografía Parasitológica Nacional” se presenta como única especie que afecta a los bovinos identificada en Uruguay a *E. zuernii* (Castro y Trenchi, 1955). Desde ese entonces hasta hoy poco se sabe sobre las diferentes especies involucradas en las coccidiosis bovinas en Uruguay. En 2015, en un boletín de la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) de Treinta y Tres describen la ocurrencia de cinco focos de coccidiosis en terneros de carne con sintomatología nerviosa. La identificación de especie se realizó mediante un frotis de aposición de la mucosa donde se observaron grandes cantidades de ooquistes de *E. bovis*. De acuerdo a los registros del laboratorio existieron 72 focos desde el año 1991 donde el motivo de consulta de 34% de éstos, fueron por signos nerviosos (Dutra, 2015).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La intensificación de la producción láctea en Uruguay ha generado una gran demanda de terneras de reposición, sin embargo, debido a la alta mortalidad que existe durante la crianza no se pueden cubrir las necesidades. Existe una alta incidencia de cuadros diarreicos en las “guacheras” de los tambos, donde muchas veces son tratados de manera similar sin importar el agente etiológico, esto puede llevar a la falla del tratamiento si lo administrado no es eficaz sobre el agente causante. Por tal motivo, es muy importante llegar a un correcto diagnóstico para poder indicar medidas eficaces de tratamiento y control de la enfermedad, ya que en

esa etapa de sus vidas los terneros están desarrollando su competencia inmunitaria y capacidad de producción.

Los sistemas de confinamientos realizados en la crianza de terneros, donde reciben alimentación y agua, hacen que las diferentes especies de *Eimeria* puedan propagarse rápidamente y si no son tratados, en pocos días el ambiente estará altamente contaminado, facilitando la infección del resto de los animales y manteniendo la enfermedad dentro del establecimiento. Si bien la mayoría de las especies no son patógenas, algunas pueden generar cuadros severos de diarreas y en muchos casos la muerte. Actualmente, además de muchos reportes de diarreas sanguinolentas en los tambos, existen también muchos casos de terneros de carne con sintomatología compatible con eimeriosis.

3.1. Hipótesis

- Existen en el Uruguay varias *Eimeria* spp. afectando a los terneros.
- El patrón de eliminación de ooquistes tiene una relación directa con la edad del ternero.

3.2. Objetivos

Objetivo general

- Actualizar el conocimiento sobre del parasitismo por *Eimeria* spp. en terneros.

Objetivos específicos

- Identificar y describir las especies de *Eimeria* presentes en materia fecal de terneros.
- Describir la dinámica de eliminación de ooquistes y su asociación con la edad de los terneros.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Identificación de especies de *Eimeria*

4.1.1. *Ubicación de los establecimientos*

En el período de enero del 2016 a octubre de 2018 fueron recibidas en el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) en La Estanzuela (LE) 44 muestras de materia fecal de terneros menores de 12 meses de edad provenientes de 12 diferentes establecimientos (Fig. 1). Siete de los establecimientos fueron del departamento de Colonia: Establecimiento 1 (34°04'06.6"S 57°51'08.7"W), Establecimiento 2 (34°21'12.5"S 57°41'40.3"W), Establecimiento 5 (34°19'15.2"S 57°47'04.5"W), Establecimiento 6 (34°10'07.3"S 57°14'20.1"W), Establecimiento 7 (34°12'23.2"S 57°43'23.4"W), Establecimiento 8 (34°12'40.9"S 57°36'29.0"W) y Establecimiento 11 (34°01'25.0"S 57°54'38.5"W), uno del departamento de Durazno: Establecimiento 3 (33°26'18.7"S 56°29'01.1"W), dos del departamento de Río Negro: Establecimiento 9 (32°40'56.2"S 57°58'09.0"W) y Establecimiento 10 (32°51'44.3"S 57°25'49.2"W), uno del departamento de Rocha: Establecimiento 12 (34°29'39.8"S 54°19'40.1"W) y uno del departamento de Soriano: Establecimiento 4 (33°46'00.6"S 57°25'32.9"W). Nueve muestras provenían de terneros de seis tambos con problemas de diarrea, 25 muestras de terneros sanos provenientes de cuatro tambos y 10 de terneros con diarrea sanguinolenta provenientes de dos establecimientos de cría de terneros de raza carnicera.

4.1.2. *Recuento de ooquistes*

Todas las muestras fueron recolectadas directamente del recto y enviadas refrigeradas al laboratorio. Se realizó individualmente el recuento de ooquistes por gramo de materia fecal (OPG) utilizando la técnica de McMaster modificada (Roberts y O' Sullivan 1950) mediante el uso de "cámaras INTA" (Fiel et al., 2011) con un límite de detección de 40 ooquistes por gramo.

4.1.3. Cultivo e identificación de especies

Las muestras fueron mantenidas refrigeradas por no más de una semana y el cultivo fue realizado en forma individual para los casos de diarrea y en pool para la materia fecal de los animales sanos. Se utilizó una proporción de 5:1 de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) al 2,5% y materia fecal, respectivamente. Luego fueron colocados en una placa de Petri y llevados a estufa a $27^\circ C$ por 10 días. Se realizó una concentración por flotación con solución de azúcar (Sheather D:1300) para su futura identificación (Duszynski y Wilber, 1997). La identificación de especie fue realizada teniendo en cuenta características morfométricas presentadas por diferentes investigadores (Levine & Ivens, 1967; Eckert et al., 1995; Rind et al., 2000; Florião et al., 2016). Las mediciones se realizaron con un objetivo micrométrico de 1000X con aceite de inmersión en un Microscopio binocular Zeiss® Primo Star.

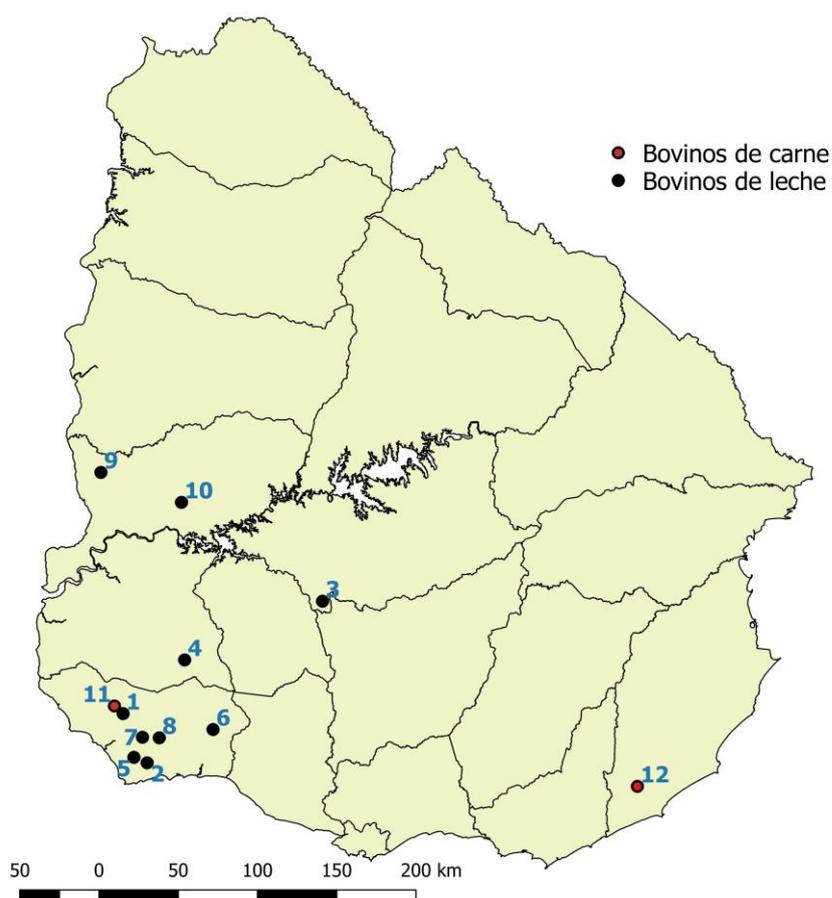


Figura 1. Ubicación geográfica de los establecimientos que enviaron muestras de materia fecal al el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) (2016 - 2018).

4.2. Dinámica de eliminación de ooquistes y su asociación con la edad de los terneros

Este estudio se realizó durante el período de abril hasta octubre de 2016 en el tambo de INIA, Colonia, Uruguay (34°21'12.6" S 57°41'43.0" W) con aproximadamente 200 vacas Holando en ordeño. En ningún momento se interfirió con el manejo rutinario del tambo, el cual se caracteriza por sincronizar las pariciones entre los meses febrero y octubre, excepto julio debido a que es el mes de más frío en la región. Los datos de precipitación acumulada, temperatura media y humedad relativa durante este periodo de crianza se muestran en la **Figura 2** (INIA GRAS, 2019). Este tambo implementó buenas prácticas de manejo en la crianza de los terneros. Luego del nacimiento, los terneros eran llevados a jaulas individuales para su calostro artificial y posteriormente colocados en un corral colectivo, donde permanecían hasta el desleche (65 días). Durante todo ese período tenían acceso a agua y a ración concentrada (Nutritenera-ERRO) a voluntad, además de una amamantadora automática que les proporcionaba 4 litros diarios de leche pasteurizada. El cuidado de los animales fue realizado por dos personas que se dedicaron especialmente a la alimentación, higiene y desinfección de los materiales y la “guachera”. Como manejo sanitario, los terneros que presentaban diarrea eran separados de los demás para su tratamiento con sales rehidratantes, calmantes estomacales y en caso de hacer fiebre, eran tratados con antibióticos. En ningún caso se realizaron pruebas de laboratorio para diagnosticar las otras causas específicas de diarrea.

4.2.1. Recuento de ooquistes

Semanalmente, se extrajo materia fecal directamente del recto de 97 terneras criadas en la “guachera” con un total de 716 muestras que fueron enviadas refrigeradas al laboratorio. La determinación del OPG se realizó en forma individual, mediante la técnica de McMaster modificada (Roberts y O’ Sullivan, 1950) utilizando las “cámaras INTA” (Fiel et al., 2011) con un límite de detección de 40 ooquistes por gramo.

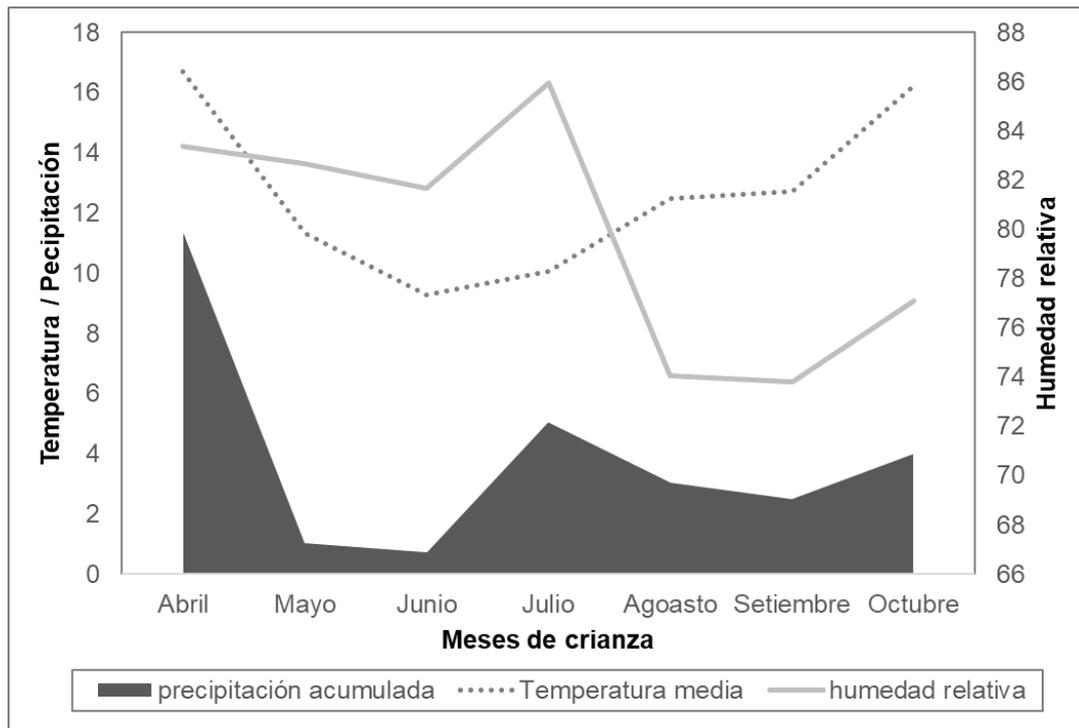


Figura 2. Promedio de precipitación acumulada, temperatura media y humedad relativa durante los meses de crianza en el tambo de INIA en el año 2016.

4.2.2. Cultivo e identificación de especie

Los cultivos de materia fecal se realizaron en pools. Estos pools se conformaron con muestras de materia fecal agrupadas por edades (menor o igual a 20 días, de 21-40 días y de 41-65 días). También se registró la consistencia en todas las muestras recolectadas (presencia o no de diarrea, considerando diarrea a toda aquella muestra con consistencia líquida).

Para la identificación de las especies se realizó la esporulación según el método descrito por Duszynski y Wilber (1997). Las especies fueron identificadas teniendo en cuenta las características morfométricas presentadas por diferentes investigadores (Eckert et al., 1995; Florião et al., 2016; Levine & Ivens, 1967; Rind et al., 2000). Las mediciones se realizaron con un objetivo micrométrico de 1000X con aceite de inmersión en un Microscopio binocular Zeiss® Primo Star.

4.3. Análisis estadísticos:

Para la identificación de especies se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y un test de Student para comparar medias del largo y ancho de los ooquistes. Además, se realizó una regresión lineal para evaluar el polimorfismo de las especies identificadas considerando positiva cuando el R^2 era menor a 0,5 (Berto et al., 2014). Se realizó estadística descriptiva para cada una de las especies encontradas.

Para el estudio de la dinámica de eliminación de ooquistes, los terneros fueron agrupados según las edades en días (1-20, 21-40, 41-65). Los datos fueron creados en una hoja de Microsoft Excel 2016® y analizados en Stata-14 (Statacorp, 2015). Se evaluaron las siguientes variables: número de OPG; especies de *Eimeria*; número de terneros en “guachera”; presencia o ausencia de diarrea; fecha de muestreo y grupo de edad. El análisis descriptivo se realizó utilizando la mediana, el rango intercuartil y el número mínimo y máximo de OPG, que se calcularon en cada día de observación para cada grupo. Para la evaluación de la relación de la OPG con el grupo de edad se construyó un modelo de probabilidades proporcionales (Dohoo et al., 2009). Se seleccionaron dos muestras de 60 bovinos que estaban presentes a la edad de 21 a 40 días y nuevamente a los 41 a 65 días. La variable dependiente fue la OPG y se clasificó en: 0 como "Negativa"; de 1 a 4000 como "Moderado" y mayor a 4000 como "Alto". La variable independiente fue el grupo de edad. Para evaluar la relación entre categorías y el supuesto de líneas paralelas, se realizó una serie de pruebas de Wald para Modelos Logísticos Ordenados Generalizados para Variables Dependientes Ordinales utilizando la función de autoajuste gologit2 en STATA (Williams, 2006). También se evaluó la prevalencia de las especies identificadas.

5. RESULTADOS

5.1. Identificación de especies

Todas las muestras analizadas presentaron ooquistes de *Eimeria* spp. Se identificaron nueve especies; *E. zuernii*, *E. bovis*, *E. ellipsoidalis*, *E. auburnensis*, *E. canadensis*, *E. alabamensis*, *E. illinoisensis*, *E. wyomingensis* y *E. cylindrica* (**Figura3**). *E. alabamensis*, *E. illinoisensis* y *E. cylindrica* sólo se observaron en un cultivo de materia fecal de bovinos de leche y *E. wyomingensis* en un cultivo de bovinos de carne. Al menos una de las dos especies consideradas como altamente patógenas para

el ganado (*E. bovis* o *E. zuernii*) estaban presentes en los cultivos y el número de especies presentes varió entre los establecimientos de 2 a 6. *E. zuernii* y *E. bovis* fueron las especies más frecuentes en casi todos los establecimientos, sin embargo, en terneros sanos de dos establecimientos la especie más frecuente fue *E. ellipsoidalis* (**Cuadro II**). Las características morfométricas y de regresión lineal se muestran en el **Cuadro III** y **Figura 4**. A las especies *E. wyomingensis* y *E. cylindrica* no se realizó regresión lineal debido a que sólo se midieron dos ooquistes. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en las comparaciones de media de longitud y ancho de las especies, a excepción de *E. bovis* y *E. canadensis*, que no se diferenciaron por largo y ancho, sino que por sus diferencias en micrópilo y forma.

5.2. Dinámica de eliminación de ooquistes y su asociación con la edad de los terneros

Durante el monitoreo, el 94% de los animales presentaron ooquistes en materia fecal. La concentración de los terneros a lo largo del año se muestra en la **Figura 5**. De las 716 muestras fecales, 486 (67,88%) fueron negativas, 185 (25,84%) tenían entre 40 y 4000 OPG, y 45 (6,28%) tenían más de 4000 OPG. El número de ooquistes en las muestras positivas osciló entre 40 (límite de detección) y 428800 OPG (**Cuadro IV**). La eliminación de los ooquistes comenzó al sexto día de edad y en el grupo de edad de 1 a 20 días, 194 (95,10%) de las muestras fueron negativas y ninguna presentó valores de OPG superiores a 4000. Los valores más altos de OPG se presentaron entre los 21 y 40 días de edad, cuando de 236 muestras, 127 (53,81%) tenían OPG moderado y 41 (17,37%) tenían una OPG alto. En el grupo de estudio de 40 a 65 días, 224 (81,16%) muestras tuvieron OPG negativa.

Durante el período de estudio, siete muestras, que pertenecían a siete terneros diferentes, presentaron diarrea con más de 4000 OPG, lo que sugiere coccidiosis clínica. Uno de estos casos ocurrió en mayo, dos en junio, tres en julio y uno en agosto. El OPG de estas muestras varió entre 4000 y 287300. En contraste, de las 64 muestras con diarrea, 43 (67,19%) tenían OPG negativa y 14 (21,88%) tenían OPG moderada. De las 652 muestras sin diarrea, 443 (67,94%) tenían OPG negativa, 171 (26,23%) tenían OPG moderada y 38 (5,83%) OPG alta. Los terneros de 21 a 40 días tuvieron 54,14 más probabilidades de estar en la categoría media de OPG que de

estar en la categoría negativa, en comparación con los terneros de 41 a 65 días. Además, los terneros de 21 a 40 días tenían 54,14 más probabilidades de estar en la categoría de OPG alta que en la categoría media en comparación con los animales de 41 a 65 días (**Figura 6**). La prueba de Wald para probar la suposición de línea paralela no fue significativa ($p = 0,3665$) y por eso no se violó la suposición. Además, se probó la relación entre categorías y fue la misma (OR: 54,14).

En los cultivos, las especies más frecuentes fueron *E. bovis* (46%), seguida de *E. ellipsoidalis* (25%) y *E. zuernii* (22%). *E. alabamensis* y *E. auburnensis* representaron el 3% cada una y *E. canadensis* sólo el 1%. Entre los 21 y 40 días de edad, donde hubo el pico más alto de eliminación de ooquistes, las especies más prevalentes fueron *E. bovis* (70%) y *E. zuernii* (18%). El patrón de eliminación de cada especie cambia a lo largo del año y se muestra en la **Figura 7**.

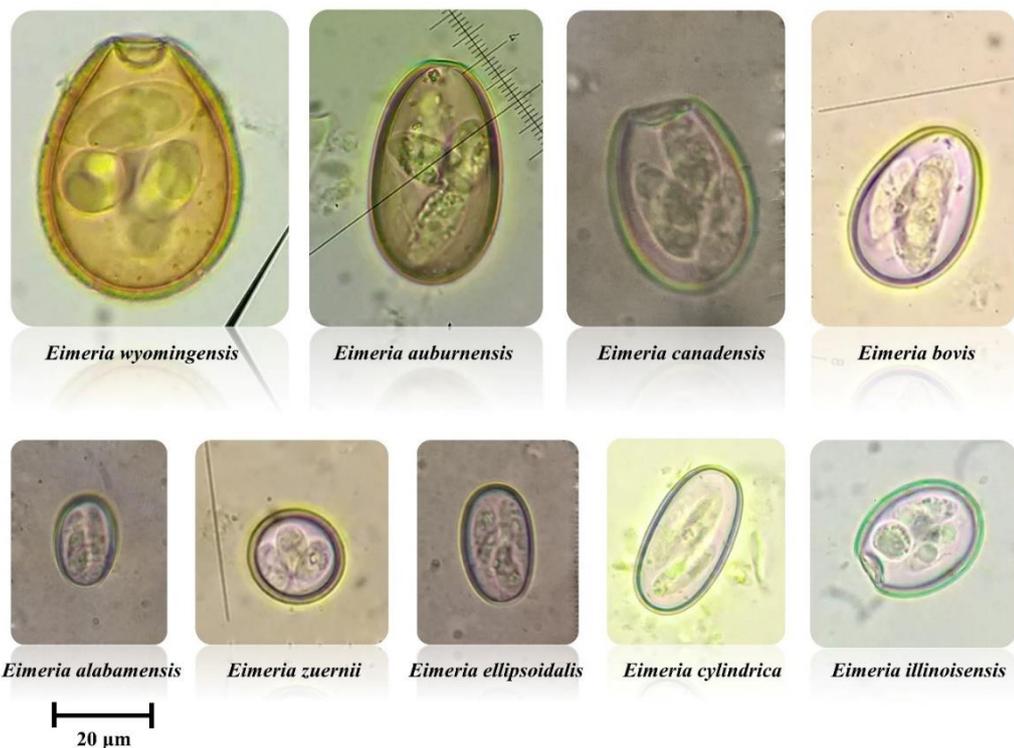


Figura 3. Especies de *Eimeria* identificadas en materia fecal de terneros.

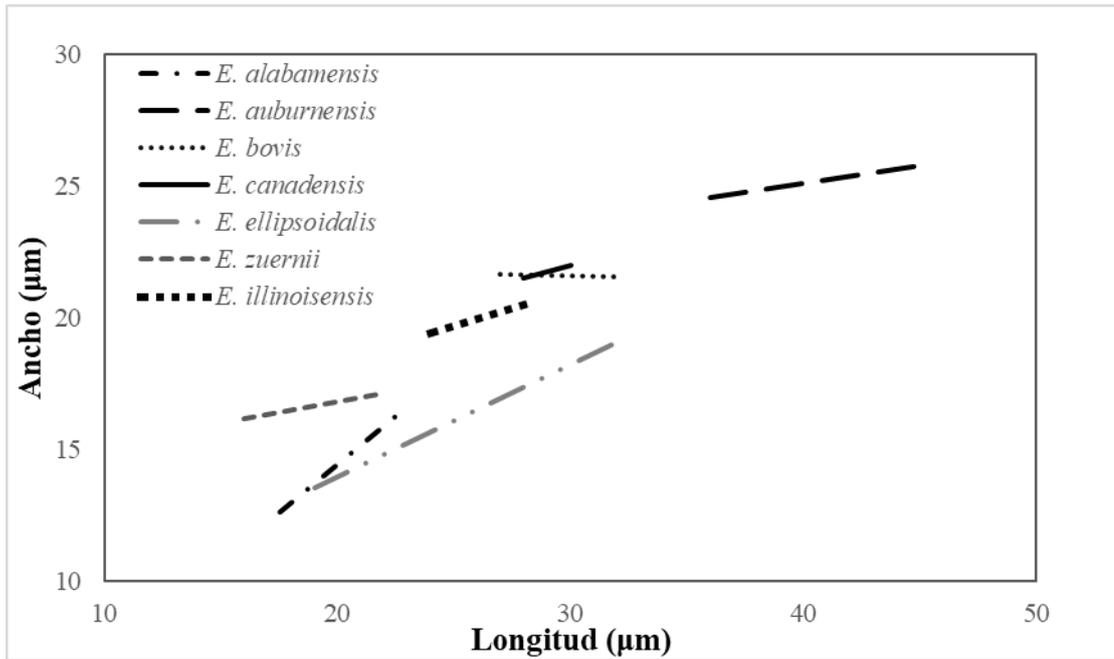


Figura 4. Comparación de la regresión lineal de las mediciones de los ooquistes esporulados de *Eimeria* spp. recuperados en materia fecal de terneros provenientes de establecimientos rurales de Uruguay.

Cuadro II. Distribución de *Eimeria* spp. identificadas en 12 establecimientos de cría de terneros en Uruguay

Establecimiento	Departamento	Raza	Procedencia	n muestras	Edad	OPG	Cultivo	<i>E. bovis</i>	<i>E. zuernii</i>	<i>E. ellipsoidalis</i>	<i>E. auburnensis</i>	<i>E. canadensis</i>	<i>E. wyomingensis</i>	<i>E. illinoisensis</i>	<i>E. cylindrica</i>	<i>E. alabamensis</i>
EST 1	Colonia	Holando	Terneros con diarrea	2	>20 días	9480	2	71%	29%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
					>20 días	54400		94%	6%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
EST 2	Colonia	Holando	Terneros con diarrea	1	30 días	25760	1	23%	75%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%
EST 3	Durazno	Holando	Terneros con diarrea	2	4-5 meses	20160	2	1%	98%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
					4-5 meses	8680		12%	59%	0%	28%	1%	0%	0%	0%	0%
EST 4	Soriano	Holando	Terneros con diarrea	1	-	34280	1	6%	90%	4%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
EST 5	Colonia	Jersey	Terneros con diarrea	1	> 20 días	53760	2	38%	15%	18%	0%	0%	0%	0%	0%	29%
					3-7 meses	720		12%	42%	10%	20%	0%	0%	14%	2%	0%
EST 6	Colonia	Holando	Terneros con diarrea	1	26 días	4040	1	35%	40%	24%	1%	0%	0%	0%	0%	0%
EST 7	Colonia	Holando	Terneros sanos	5	> 20 días	MR*	1	87%	13%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
EST 8	Colonia	Holando	Terneros sanos	10	< 20 días	MR	2	0%	5%	95%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
EST 9	Rio Negro	Holando	Terneros sanos	5	> 20 días	MR	1	58%	14%	0%	8%	20%	0%	0%	0%	0%
EST 10	Rio Negro	Holando	Terneros sanos	5	> 20 días	MR	1	0%	40%	60%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
EST 11	Colonia	A. Angus	Terneros con diarrea	1	12 meses	2280	1	44%	16%	2%	22%	16%	0%	0%	0%	0%
EST 12	Rocha	A. Angus	Terneros con diarrea	1	< 12 meses	54000	2	5%	95%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
					8	MR		32%	48%	0%	12%	0%	8%	0%	0%	0%
Total				44	-	-	17	32,4%	42,8%	13,4%	5,8%	2,3%	0,5%	0,9%	0,1%	1,8%

*Más de un resultado de OPG. En caso de terneros sin signos clínicos se realizaron cultivos en pools de muestras de materia fecal

EST: establecimiento

Cuadro III. Morfometría y regresión lineal de ooquistes identificados

Especies	N ^a	Oocquiste		Esporozoito		Regresión lineal ^b	
		longitud (µm)	ancho (µm)	longitud (µm)	ancho (µm)	R ²	Ecuación
<i>E. alabamensis</i>	9	20,2(17,5-22,5)	14,6(12,5-18,0)	12,5(11,0-15,0)	4,7(4,0-5,0)	0,689	y = 0,7188x + 0,0745
<i>E. auburnensis</i>	10	40,7(36,0-45,0)	25,2(24,0-26,0)	20,1(17,0-22,0)	7,9(6,0-10,0)	0,301	y = 0,1339x + 19,75
<i>E. bovis</i>	42	29,2(27,0-32,0)	21,6(20,0-23,0)	15,0(10,0-18,0)	6,8(5,0-8,0)	0,001	y = -0,0202x + 22,186
<i>E. canadensis</i>	3	28,7(28,0-30,0)	21,7(21,0-22,0)	15,3(14,0-16,0)	6,7(6,0-7,0)	0,250	y = 0,25x + 14,5
<i>E. cylindrica</i>	2	26,5(26,0-27,0)	14,5(14,0-15,0)	14,0(1,0-15,0)	5,0 (5,0-5,0)	-	-
<i>E. ellipsoidalis</i>	17	24,6(19,0-27,0)	16,2(15,0-20,0)	13,2(10,0-16,0)	5,4(4,0-7,0)	0,732	y = 0,4253x + 5,4943
<i>E. illinoisensis</i>	7	25,6(14,0-28,0)	19,9(18,0-21,0)	12,9(11,0-15,0)	6,1(6,0-7,0)	0,099	y = 0,2647x + 13,088
<i>E. wyomingensis</i>	2	47,0(46,0-48,0)	31,5(29,0-34,0)	19,0(18,0-20,0)	10,0(9,0-11,0)	-	-
<i>E. zuernii</i>	41	19,4(16,0-22,0)	16,7(14,0-19,0)	9,7(7,0-12,0)	5,1(4,0-6,0)	0,034	y = 0,1571x + 13,682

^aNúmero de ooquistes observados

^bRegresión lineal del ancho y largo de los ooquistes

() Valores de máxima y mínima

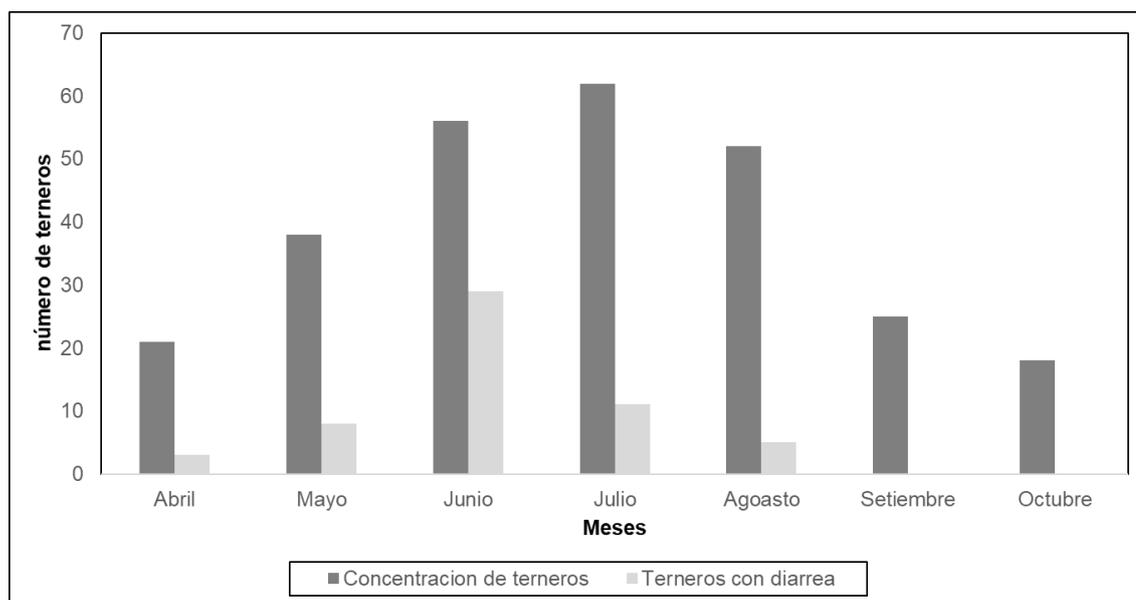


Figura 5. Número total de terneros en la “guachera” y terneros que tuvieron diarrea durante los meses de la crianza (2016).

Cuadro IV. Variación de los valores de ooquistes por gramo de materia fecal (OPG) en el tambo experimental de acuerdo con el grupo de edad y la fecha de muestreo.

Grupo de edades*		Días de muestreo																							
		22/4/2016 (17)	28/4/2016 (21)	6/5/2016 (26)	13/5/2016 (30)	20/5/2016 (35)	26/5/2016 (32)	3/6/2016 (29)	10/6/2016 (40)	17/6/2016 (45)	24/6/2016 (45)	1/7/2016 (52)	8/7/2016 (51)	15/7/2016 (44)	22/7/2016 (40)	29/7/2016 (41)	5/8/2016 (37)	12/8/2016 (26)	18/8/2016 (28)	26/8/2016 (20)	8/9/2016 (14)	15/9/2016 (14)	22/9/2016 (11)	5/10/2016 (14)	13/10/2016 (4)
1-20	Min	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-	0	-	-	-
	p25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-	0	-	-	-
	p50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-	0	-	-	-
	p75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-	0	-	-	-
	Max	0	0	0	280	80	200	1080	0	560	1680	0	0	1320	0	-	0	0	0	0	-	0	-	-	-
21-40	Min	40	0	0	40	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	-	-
	p25	160	40	40	40	0	240	280	0	0	40	200	0	0	0	0	0	0	200	680	1480	1260	-	-	
	p50	600	180	540	160	620	600	1360	20	0	580	1480	80	80	40	20	40	80	0	1200	3720	6280	8240	-	-
	p75	4560	2240	840	880	2340	1400	1600	1080	80	5780	5520	220	620	680	280	680	200	0	10935	32280	11200	38520	-	-
	Max	12560	5080	3320	7200	6120	9520	7080	5660	1840	120680	38000	6080	4480	14440	283300	2400	200	0	19870	428800	26480	63040	-	-
41-65	Min	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	p25	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	p50	-	220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	200	40	0	0	0	
	p75	-	9720	40	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3160	7320	120	120	80	80	
	Max	-	9720	1120	3360	160	40	320	40	40	760	40	40	0	0	40	40	280	680	16000	7320	1640	120	560	160

() número de animales muestreados

*grupo de terneros según los días de vidas

6. DISCUSIÓN

En este estudio fueron identificadas nueve de las 14 especies que afectan al bovino. En las muestras de los 12 establecimientos, las especies más prevalentes en la materia fecal de terneros con diarrea y alto OPG fueron *E. zuernii* y *E. bovis*, lo que sugiere que estos terneros se vieron afectados por la coccidiosis clínica. Estas especies son consideradas altamente patógena y están involucradas en la mayoría de los casos con cuadros clínicos (Bruhn et al., 2011; Sánchez et al., 2013). Las otras especies identificadas son consideradas de baja o moderada patogenicidad y generalmente no causan la muerte. En las muestras provenientes de terneros sanos, *E. bovis* y *E. zuernii* fueron las más frecuentes en dos establecimientos, sin embargo, en otros dos establecimientos, la especie más frecuente fue *E. ellipsoidalis*. *E. ellipsoidalis* también fue la segunda especie más frecuente en el establecimiento donde se estudió la dinámica de eliminación de ooquistes. *E. auburnensis* y *E. ellipsoidalis* han sido asociadas a casos de diarrea no sanguinolenta (Sánchez et al., 2013) y *E. alabamensis* fue reportada como causa de brotes de eimeriosis y pérdidas de peso de los animales en Alemania, Suecia, Holanda y Reino Unido (Daugochies y Najdrowski, 2005; Svensson et al., 1994). *E. cylindrica* fue encontrada en un sólo cultivo, esto puede ser debido a su baja prevalencia en terneros (Sánchez et al., 2008) o a que la diferenciación entre *E. ellipsoidalis* y *E. cylindrica* no es muy confiable ya que muchas veces son confundidas (Lucas et al., 2014).

Las mediciones encontradas en este estudio no coinciden con la presentada por todos los autores utilizados para la identificación. Florião et al. (2016) encontró ooquistes de *E. auburnensis* más pequeños en ancho y longitud y Rind et al. (2000) ooquistes de *E. ellipsoidalis* menores en ancho y longitud, sin embargo, nuestras mediciones para esas especies concuerdan con lo encontrado por Eckert et al. (1995) y Levine & Ivens (1967). Hay que tener en cuenta que los ooquistes identificados provienen de diferentes partes del país y sufrieron la presión de los tratamientos efectuados en cada establecimiento, lo cual puede explicar algunas de las variabilidades en las mediciones presentadas en el **Cuadro II** (Florião et al., 2016).

Este polimorfismo puede estar dado también por diferentes factores tales como, estrés, mal nutrición, dosis infectiva de ooquistes, inmunidad del hospedero, entre otros (Berto et al., 2014). La regresión lineal reveló que casi todas las especies identificadas presentan un alto polimorfismo ($R^2 < 0,5$) igualmente encontrado por otros autores (Florião et al., 2016), sin embargo, *E. alabamensis* y *E. ellipsoidalis* presentaron una buena correlación con valores de R^2 de 0,689 y 0,732, respectivamente. Al graficar las diferentes regresiones lineales vemos la interposición de *E. bovis* y *E. canadensis* (**Figura 4**) lo que implicaría el no poder identificarlas sólo por sus dimensiones si no fueran debido sus características morfológicas y forma de micrópilo.

Durante el estudio de la dinámica de la eliminación de ooquistes, siete animales con diarrea mostraron un alto número de ooquistes de *E. bovis* y *E. zuernii*, lo que sugiere eimeriosis clínica (Joachim et al., 2018). Sin embargo, muchos animales con diarrea tenían un número bajo de ooquistes. En Uruguay, se han reportado infecciones únicas o mixtas por varios agentes, incluidos rotavirus, coronavirus, *Cryptosporidium* spp, *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* como causa de diarrea en terneros de diferentes edades. Algunos de estos agentes (*Cryptosporidium parvum* y rotavirus) han sido identificados previamente en el establecimiento estudiado (RD. Caffarena, comunicación personal). La diarrea en terneros es una enfermedad multifactorial relacionada con factores del huésped y diferentes patógenos. En general, la coinfección de dos o más patógenos aumenta el número de casos de diarrea y reduce las posibilidades de supervivencia (Glombowsky et al., 2017). En consecuencia, la eimeriosis debe considerarse como una de las causas del síndrome de diarrea multifactorial en terneros.

A pesar de las buenas prácticas de manejo implementadas en el manejo de la “guachera”, algunos animales tuvieron eimeriosis clínica y otros pudieron verse afectados subclínicamente con pérdidas de producción que podrían pasar desapercibidas para el productor. El manejo de los establecimientos debe ser evaluado críticamente para prevenir la enfermedad, principalmente la higiene, los alimentos y la densidad de animales, así como el uso de drogas profilácticas y metafilácticas (Dauguschies y Najdrowski, 2005; Philippe et al., 2014) y el uso correcto del calostro. Además, con estas herramientas implementadas podemos

prevenir otros patógenos que afectan la salud de los terneros durante la crianza, como es el caso de *Cryptosporidium* spp. ya que se ha reportado como causa importante de brotes de diarrea en Uruguay (Caffarena, 2017).

La eliminación de ooquistes en materia fecal fue observada desde los primeros días de vida (6 días) alcanzando su pico máximo entre los días 21 y 40 días, al igual que lo reportado por otros autores (Díaz De Ramirez et al., 2001; Sánchez et al., 2008). Este grupo de edad, además de haber tenido más probabilidades de tener valores OPG medios y altos (OR: 54.14), tuvo una alta eliminación de ooquistes de *E. bovis* y de *E. zuernii*, lo cual sugiere que es un período crítico para la ocurrencia de coccidiosis. Se determinó un alto porcentaje (94%) de animales infectados, resultados que coinciden con los obtenidos por Díaz De Ramírez et al. (2001) y Lucas et al. (2014), quienes determinaron 100% de infección de los terneros estudiados en Venezuela y Estados Unidos. Sin embargo, aunque casi todos los animales tuvieron la infección, pocos cursaron clínicamente la enfermedad. Muchas veces estos animales presentan una diarrea transitoria, no sanguinolenta que a menudo es atribuida a otros patógenos o totalmente ignorada (Dauguschies y Najdrowski, 2005).

La eliminación de altas cargas de ooquistes sin diarrea observada en este estudio puede estar relacionada con la baja patogenicidad de algunas de las especies infectantes o con la buena respuesta inmune de los terneros debido a infecciones previas (Dauguschies y Najdrowski, 2005). Cabe señalar que, a pesar de la ausencia de diarrea, pueden ocurrir efectos subclínicos asociados con un impacto negativo en la salud y la producción de terneros (Lassen et al., 2009).

Como se mencionó anteriormente, la diarrea puede estar causada por diferentes patógenos y atribuirla a la coccidiosis resulta muchas veces imposible. La asociación positiva entre la presencia de diarrea y la eliminación de ooquistes en materia fecal fue descrita previamente por otros autores (Bangoura et al., 2012; Enemark et al., 2013). Sin embargo, Lassen et al. (2009) a pesar de encontrar una asociación significativa en animales menores a 3 meses, concluye que en general existe una correlación negativa entre la eliminación de ooquistes y la presencia de diarrea. En estos trabajos, la incidencia de diarrea varió entre 15,9% y 35,9% lo cual les permitió

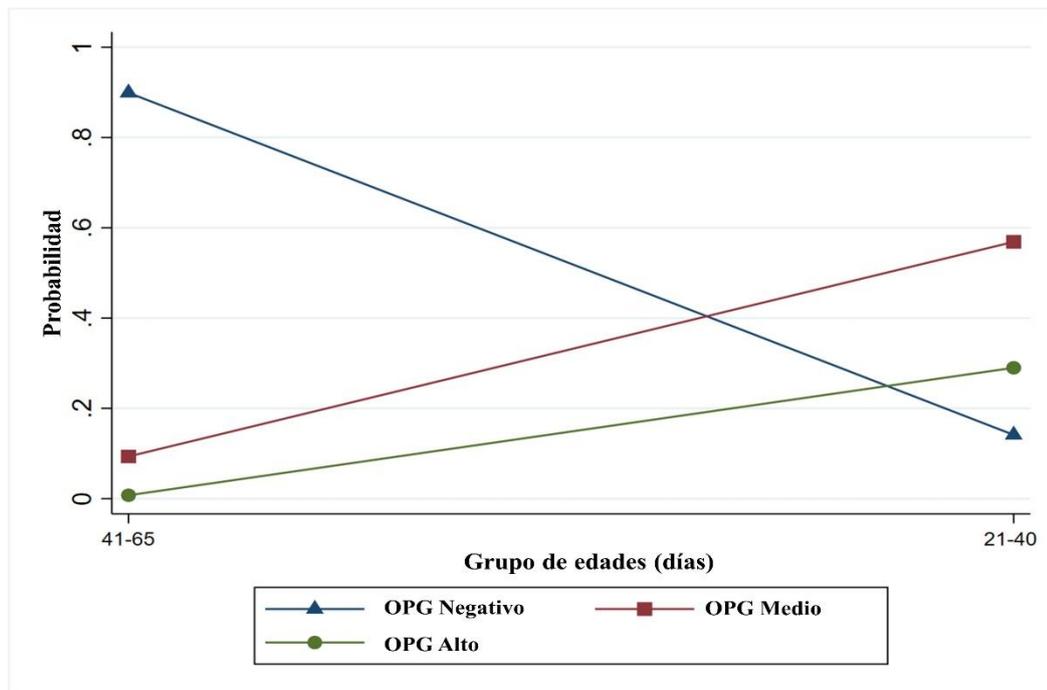


Figura 6. Probabilidad de la presencia de ooquistes según el grupo de edad predicho por el modelo de probabilidades proporcionales.

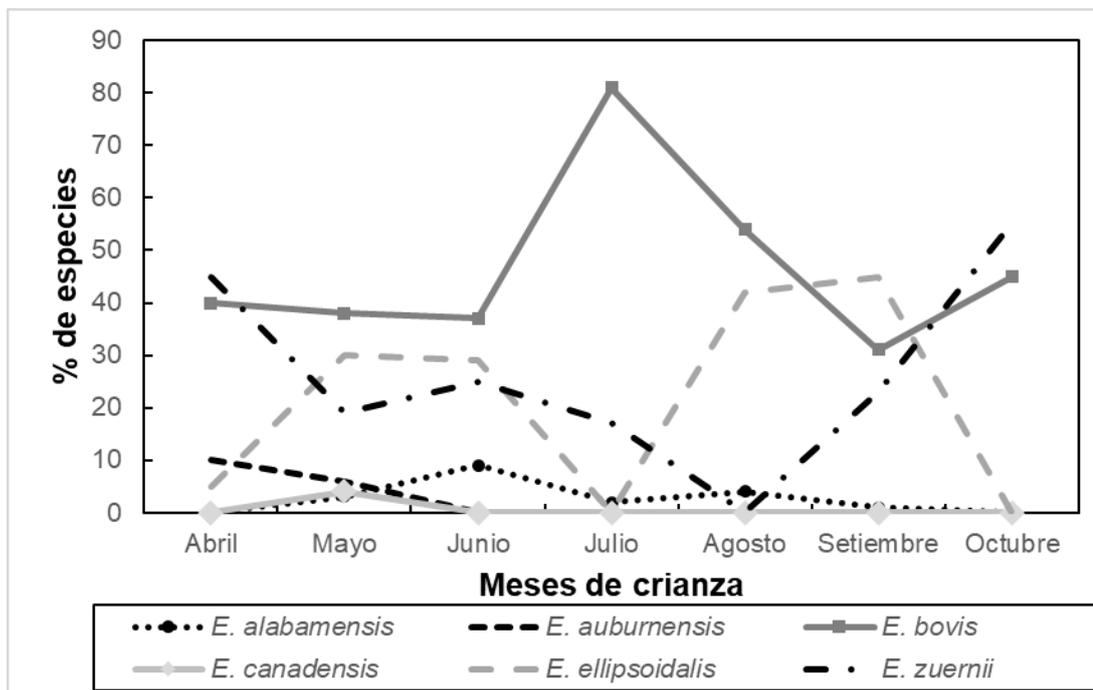


Figura 7. Porcentaje *Eimeria* spp. durante los meses de la crianza (2016).

calcular dichas asociaciones. En este estudio, la incidencia de la diarrea fue muy baja (64/716) y sólo 7 terneros tuvieron OPG altos. Esto, juntamente con que fueron muestreos realizados sobre los mismos animales a lo largo del año y que no se

diagnosticaron los otros agentes causantes de diarrea no permitió calcular una asociación entre OPG y la diarrea. La mayor frecuencia de diarrea fue en los meses donde hubo mayor concentración de animales y la alta prevalencia de *E. bovis* denota que muchos de los terneros estaban eliminando en el ambiente ooquistes de esta especie patógena lo cual explicaría la ocurrencia en ese período de cinco de los siete casos de coccidiosis encontrados durante el monitoreo.

7. CONCLUSIONES

En Uruguay hay al menos nueve especies de *Eimeria* que infectan a los terneros. *Eimeria bovis* y *E. zuernii* son los más prevalentes, seguidos de *E. ellipsoidalis*, *E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. canadensis*, *E. illinoisensis*, *E. wyomingensis* y *E. cylindrica*. Los terneros entre 21 y 40 días de edad son los más propensos a ser afectados por la eimeriosis y las medidas de control y prevención de la coccidiosis deben centrarse en el manejo y monitoreo de los animales en esta edad.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Bangoura, B., Mundt, H., Schmäschke, R., Westphal, B., Dauschies, A. (2012). Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German cattle herds and factors influencing oocyst excretion. *Parasitol. Res.* 2, 875–881.
doi:10.1007/s00436-011-2569-z
- 2-Berto, B.P., McIntosh, D., Lopes, C.W.G. (2014). Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 23, 1–15.
doi:10.1590/S1984-29612014001
- 3-Bruhn, F.R.P., Lopes, M.A., Demeu, F.A., Perazza, C.A., Pedrosa, M.F., Guimarães, A.M. (2011). Frequency of species of *Eimeria* in females of the holstein-friesian breed at the post-weaning stage during autumn and winter. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 20, 303–307. doi:10.1590/S1984-29612011000400008
- 4-Caffarena, R.D. (2017). Aspectos clínicos y epidemiológicos de la diarrea neonatal en terneros de tambos de Uruguay y su asociación con infección por *Cryptosporidium* spp. y *Escherichia coli* F5 (K99)+. Msc Thesis. Facultad de Veterinaria - UDELAR.

- 5-Castro, E.R., Trenchi, H. (1955). Fauna Parasitológica Comprobada en el Uruguay, y Bibliografía Parasitológica Nacional, Laboratorio de Biología Animal “Dr. Miguel Rubino.” Pando.
- 6-Cervantes-valencia, M.E., Alcalá-canto, Y., Sumano-lopez, H., Ducoing-watty, A.M., Gutierrez-olvera, L. (2016). Effects of *Curcuma longa* dietary inclusion against *Eimeria* spp . in naturally-infected lambs. Small Rumin. Res. 136, 27–35. doi:10.1016/j.smallrumres.2015.12.035
- 7-Cordero del Campillo, M.; Francisco A. Rojo Vázquez (2000). Parasitología Veterinaria. Ed. McGraw-Hill Interamericana de España, Edición: 1ª, 1ª Reimpresión, ISBN: 84-486-0236-6.
- 8-Cruvinel, L.B., Borges, D.G.L., Nicaretta, J.E., Bastos, T.S.A., Moro, E., Gama, R.D., Borges, F. de A., Lopes, W.D.Z. (2017). Avaliação da eficácia da lasalocida e de alguns fatores epidemiológicos de *Eimeria* spp. parasitando bezerros Nelore mantidos em regime de pastejo. Pesqui. Vet. Bras. 37, 121–128. doi:10.1590/S0100-736X2017000200005
- 9-Dauguschies, A., Najdrowski, M. (2005). Eimeriosis in cattle: Current understanding. J. Vet. Med. Ser. B Infect. Dis. Vet. Public Heal. 52, 417–427. doi:10.1111/j.1439-0450.2005.00894.x
- 10-Díaz De Ramirez, A., Hernandez, A., Garcia, A., Lilido, R.I. (2001). Excercion De Oocistos De *Eimeria* Durante Los 3 Primeros Meses De Vida En Becerros. Rev. Cient. FVC-LUZ 11, 207–211.
- 11-Dohoo, I., Martin, W., Stryhn, H. (2009). Veterinary Epidemiologic Research, Second Edi. ed.
- 12-Dutra, F. (2015). Archivo Veterinario del Este - Coccidiosis nerviosa en terneros. Boletín N° 24 3.
- 13-Eckert, J., Taylor, M., Catchpole, J., Licois, D., Coudert, P., Bucklar, H. (1995). Identification of *Eimeria* species and strains. Morphological characteristics of oocysts, in: European Cooperation in the Field of Scientific and Technical Research (COST), Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research. pp. 103–106.
- 14-Enemark, H.L., Dahl, J., Dehn Enemark, J.M. (2013). Eimeriosis in danish dairy calves - Correlation between species, oocyst excretion and diarrhoea. Parasitol. Res. 112, 169–176. doi:10.1007/s00436-013-3441-0
- 15-Fiel, César, Pedro Steffan, and Diego Ferreyra (2011). Primera edición

Diagnóstico de Las Parasitosis Más Frecuentes de Los Rumiantes: Técnicas de Diagnóstico E Interpretación de Resultados.

<http://www.aavld.org.ar/publicaciones/Manual Diagnostico final.pdf>.

- 16-Florião, M.M., Lopes, B. do B., Berto, B.P., Lopes, C.W.G. (2016). New approaches for morphological diagnosis of bovine *Eimeria* species: a study on a subtropical organic dairy farm in Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 48, 577–584. doi:10.1007/s11250-016-0998-5
- 17-Glombowsky, P., da Silva, A.S., Volpato, A., Soldá, N.M., Campigotto, G., Galli, G.M., Fávero, J.F., da Silva Santos, D., Machado, G. (2017). Relation between diarrhea and infection by protozoans in dairy calves. *Comp. Clin. Path.* 26, 929–933. doi:10.1007/s00580-017-2467-6
- 18-Gopalakrishnan, A., Dimri, U., Joshi, V., Kundave, V.R., Ajith, Y., Yattoo, M.I. (2017). A clinically rare occurrence of rectal mucosal prolapse associated with tenesmus in a calf caused by *Eimeria* sp. *J. Parasit. Dis.* 41, 723–725. doi:10.1007/s12639-016-0877-z
- 19-INIA GRAS (2019). INIA GRAS. URL <http://www.inia.uy/gras> (accesado 2.25.19).
- 20-Isler, C.M., Bellamy, J.E., Wobeser, G.A. (1987). Labile neurotoxin in serum of calves with “nervous” coccidiosis. *Can. J. Vet. Res.* 51, 253–260.
- 21-Joachim, A., Altreuther, G., Bangoura, B., Charles, S., Dauschies, A., Hinney, B., Lindsay, D.S., Mundt, H.C., Ocak, M., Sotiraki, S. (2018). W A A V P guideline for evaluating the efficacy of anticoccidials in mammals (pigs, dogs, cattle, sheep). *Vet. Parasitol.* 253, 102–119. doi:10.1016/j.vetpar.2018.02.029
- 22-Jolley, W.R., Bardsley, K.D. (2006). Ruminant Coccidiosis. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 22, 613–621. doi:10.1016/j.cvfa.2006.07.004
- 23-Keeton, S.T.N., Navarre, C.B. (2017). Coccidiosis in Large and Small Ruminants. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 34, 201–208. doi:10.1016/j.cvfa.2017.10.009
- 24-Lassen, B., Østergaard, S. (2012). Estimation of the economical effects of *Eimeria* infections in Estonian dairy herds using a stochastic model. *Prev. Vet. Med.* 106, 258–265. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.04.005
- 25-Lassen, B., Viltrop, A., Raaperi, K., Jarvis, T. (2009). *Eimeria* and *Cryptosporidium* in Estonian dairy farms in regard to age, species, and diarrhoea. *Vet. Parasitol.* 166, 212–219. doi:10.1016/j.vetpar.2009.08.022

- 26-Levine, N., Ivens, V. (1967). The Sporulated Oocysts of *Eimeria illinoisensis* n. sp. and of Other Species of *Eimeria* of the Ox. J. Protozool. 14, 360–363.
- 27-Levine, N.D., Levine, N.D. (1985). Veterinary protozoology. Iowa State University Press.
- 28-Lucas, A.S., Swecker, W.S., Lindsay, D.S., Scaglia, G., Neel, J.P.S., Elvinger, F.C., Zajac, A.M. (2014). A study of the level and dynamics of *Eimeria* populations in naturally infected, grazing beef cattle at various stages of production in the Mid-Atlantic USA. Vet. Parasitol. 202, 201–206.
doi:10.1016/j.vetpar.2014.02.053
- 29-Odden, A., Enemark, H.L., Robertson, L.J., Ruiz, A., Hektoen, L., Stuen, S. (2017). Treatment against coccidiosis in Norwegian lambs and potential risk factors for development of anticoccidial resistance — a questionnaire-based study. Parasitol. Res. 116, 1237–1245. doi:10.1007/s00436-017-5400-7
- 30-Oliveira, P. aguiar de, Ruas, J.L., Riet-Correa, F., Coelho, A.C.B., Santos, B.L., Marcolongo-Pereira, C., Sallis, E.S.V., Schild, A.L. (2017). Doenças parasitárias em bovinos e ovinos no sul do Brasil: Frequência e estimativa de perdas econômicas. Pesqui. Vet. Bras. 37, 797–801. doi:10.1590/s0100-736x2017000800003
- 31-Philippe, P., Alzieu, J.P., Taylor, M.A., Dorchies, P. (2014). Comparative efficacy of diclazuril (Vecoxan®) and toltrazuril (Baycox bovis®) against natural infections of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in French calves. Vet. Parasitol. 206, 129–137. doi:10.1016/j.vetpar.2014.10.003
- 32-Radostits, O.M., Done, S.H. (2007). Veterinary medicine : a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats, and horses, 10th ed. Spain.
- 33-Rind, R., Probert, A. J., & Rind, M. I. (2000). Studies on morphological characteristics of *Eimeria* species oocysts. Pakistan Veterinary Journal, 20(3), 113-117.
- 34-Roberts, F. H. S., & O'sullivan, P. J. (1950). Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. Crop and Pasture Science, 1(1), 99-102.
- 35-Rossanigo, C. (1997). Coccidiosis Clínica Bovina Post Destete En Establecimientos De Cría Extensiva De San Luís. Rev. Med. Vet., Bs. As. 78, 377–379.
- 36-Rubino, M. C. (1946). Coccidiosis de los terneros (Diarrea roja), in: MGAP (Ed.),

- Compilación de Trabajos Científicos Del Dr. Miguel Rubino. Montevideo, p. 563.
- 37-Sánchez, R. (2007). Estudio etiológico y epidemiológico de coccidiosis bovina producida por especies de *Eimeria*. PhD Tesis, Universidad Nacional de La Plata - Facultad de Ciencias Veterinarias.
- 38-Sánchez, R., Romero, J., Rossanigo, C. (2013). Epidemiología y Control de Coccidios y *Cryptosporidium*, in: Sur, H. (Ed.), Enfermedades Parasitarias de Importancia Clínica y Productiva En Rumiantes - Fundamentos Epidemiológicos Para Su Prevención y Control. Buenos Aires, Argentina, pp. 357–380.
- 39-Sánchez, R.O., Romero, J.R., Founroge, R.D. (2008). Dynamics of *Eimeria* oocyst excretion in dairy calves in the Province of Buenos Aires (Argentina), during their first 2 months of age. *Vet. Parasitol.* 151, 133–138.
doi:10.1016/j.vetpar.2007.11.003
- 40-Statacorp (2015). Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP.
- 41-Sudhakara Reddy, B., Sivajothi, S., Rayulu, V.C. (2013). Clinical coccidiosis in adult cattle. *J. Parasit. Dis.* 39, 557–559. doi:10.1007/s12639-013-0395-1
- 42-Svensson, C., Uggla, A., Pehrson, B. (1994). *Eimeria alabamensis* infection as a cause of diarrhoea in calves at pasture. *Vet. Parasitol.* 53, 33–43.
doi:10.1016/0304-4017(94)90014-0
- 43-Williams, R. (2006). Generalized ordered logit/partial proportional odds models for ordinal dependent variables. *Stata J.* 6, 58–82.
doi:10.1177/1536867x0600600104