



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**RESPUESTA SEROLÓGICA Y CLÍNICA A LA HEMOVACUNA CONGELADA DE  
BABESIA Y ANAPLASMA EN BOVINOS ADULTOS EN UN PREDIO COMERCIAL**

**Por**

**DE LEON GALLARDO, Pablo Andrés**

**RUBIO FORLONG, Gonzalo**

TESIS DE GRADO presentada como uno de

los requisitos para obtener el título

de Doctor en Ciencias Veterinarias

**ORIENTACIÓN: Producción Animal**

**MODALIDAD: Ensayo Experimental**

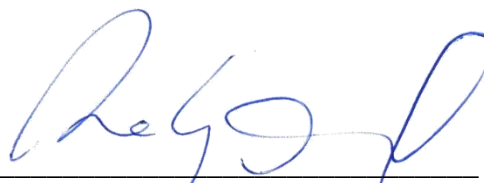
**URUGUAY**

**2021**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de Grado aprobada por

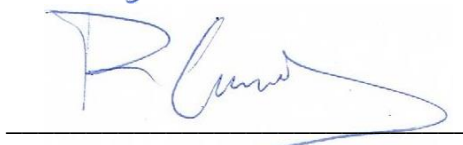
Presidente de Mesa:



---

Dr. Rodrigo Puentes


Segundo miembro (Tutor):



---

Dr. Rafael Carriquiry

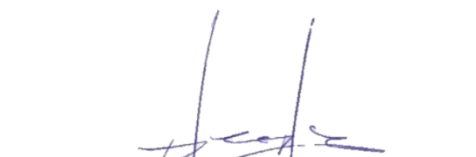
Tercer miembro:



---

Dr. Uruguaysito Benavides

Cuarto miembro (Co-tutor):

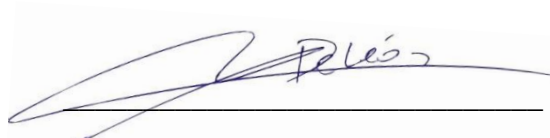


---

Dr. Pablo Parodi

Fecha: 5/05/2021

Autores:



---

Br. Pablo De León



---

Br. Gonzalo Rubio

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradecer a nuestros familiares por darnos la posibilidad de estudio y acompañarnos durante el proceso. A nuestros amigos, los de siempre y los nuevos, con los que compartimos innumerables horas de estudio y experiencias. En segundo lugar, a todos aquellos que hicieron posible llevar a cabo el proyecto, al personal del establecimiento María Elena, quienes nos hospedaron y nos abrieron las puertas de su casa, al laboratorio DILAVE Paysandú (Miguel C. Rubino) por facilitarnos instalaciones y recursos para realizar las técnicas y labores pertinentes. Por último, pero no menos importante, a nuestros tutores el Dr. Rafael Carriquiry y Dr. Pablo Parodi.

## TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
HIPÓTESIS	15
Objetivos	15
MATERIALES Y MÉTODOS	15
<i>Lugar del ensayo</i>	15
<i>Animales del estudio</i>	15
<i>Condición corporal</i>	16
<i>Diseño del estudio y toma de muestras</i>	16
<i>Signos clínicos</i>	17
<i>Procesamiento de las muestras</i>	17
RESULTADOS	18
<i>Serología</i>	18
<i>Hematocrito</i>	19
<i>Temperatura</i>	20
<i>Presencia o ausencia de garrapata</i>	22
<i>Signos clínicos</i>	22
<i>Condición corporal</i>	23
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIONES	27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

**CUADRO I:** Resultados serológicos para los agentes de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma spp.* al día 0 y al día 60 en el grupo control y tratamiento.

**CUADRO II:** Regresión logística de los resultados de la serología para los agentes de tristeza parasitaria bovina.

**CUADRO III:** Proporción de animales con anemia de acuerdo al hematocrito.

**CUADRO IV:** Predicción lineal para la comparación entre días del ensayo.

**CUADRO V:** Media de la temperatura rectal.

**CUADRO VI:** Predicción lineal para la temperatura según los días.

**CUADRO VII:** Animales del grupo control y grupo tratamiento con presencia de garrapata al día 0, 10, 12 y 60.

**CUADRO VIII:** Número de animales según su condición corporal al día 0.

**CUADRO IX:** Número de animales según su condición corporal al día 60.

**FIGURA 1:** Ciclo de vida de *Babesia bigemina* en el vacuno y en la garrapata.

**FIGURA 2:** Modelo conceptual de *Rhipicephalus microplus*.

**FIGURA 3:** Evolución del porcentaje de microhematocrito (media) en animales control e inmunizados con vacuna contra tristeza bovina.

**FIGURA 4:** Evolución de la temperatura rectal °C (promedio).

## RESUMEN

El complejo tristeza parasitaria bovina es una problemática frecuente y de gran impacto económico para los productores del Uruguay y la región. Causada por tres agentes infecciosos, *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale*. Pueden actuar solos o en conjunto y frecuentemente culmina con la muerte de los animales afectados. Pese a la disponibilidad de vacunas para su prevención, la utilización es muy baja. Las vacunas disponibles en Uruguay son eficaces e inocuas en terneros, mientras que la utilización en animales adultos no es recomendada, ya que son elaboradas con parásitos vivos atenuados que pueden provocar la presentación clínica de la enfermedad. El diaminazene aceturato es uno de los principios activos que se utiliza para el tratamiento y profilaxis de la babesiosis, actuando sobre el ácido nucleico del protozoario, alterando su estructura helicoidal. El objetivo de este trabajo fue observar la seroconversión y respuesta clínica a la hemovacuna congelada en bovinos adultos, con una dosis de modulación de Diminazene al día 10 post-inmunización. El diaminazene se administró con la finalidad de modular la vacuna reduciendo su infectividad. El estudio se llevó a cabo en el establecimiento rural “María Elena”, ubicado a 20 km de la localidad de Paso del Cerro, al noreste del departamento de Tacuarembó. Este predio presentaba infección con *Rhipicephalus microplus* y antecedentes de muerte de animales por hemoparásitos. El estudio se realizó en un lote de 90 vaquillonas de 2 a 3 años, de razas carniceras, donde se tomaron 30 vaquillonas de forma completamente aleatoria, fueron clasificadas en dos grupos de 15 animales (control y tratamiento). Al grupo tratamiento se le aplicó el protocolo de vacunación con su respectiva modulación. La seroconversión generada con este protocolo fue 73% para *Babesia bigemina*, 40% para *B. bovis* y 47% para *Anaplasma centrale*, resultando éstos porcentajes inferiores a los esperados. En el transcurso de los 60 días del ensayo no hubo sintomatología clínica en los animales vacunados. Podemos concluir que la utilización de este protocolo previene la manifestación de síntomas clínicos, pero incita a seguir estudiando los mecanismos de respuesta inmune de los bovinos para con los agentes del complejo tristeza parasitaria y cuáles serían los criterios para considerar que un animal está protegido. Para obtener mejores resultados en el futuro, con protocolos similares, se podría hacer hincapié en algunos puntos, como realizar titulación de anticuerpos con el fin de evaluar la respuesta a la vacuna, utilizar la re-vacunación para intensificar la respuesta inmune y una mayor seroconversión; y exponer los animales vacunados a una cepa de campo que los desafíe, para evaluar su inmunoprotección.

## SUMMARY

The “tristeza parasitaria” bovine complex is a frequent problem with a great economic impact for farmers in Uruguay and the region. Caused by three infectious agents, *Babesia bovis*, *B. bigemina*, and *Anaplasma marginale*. They can work alone or together and frequently culminate in the death of affected animals. Despite the availability of vaccines, the use is very low. The vaccines available in Uruguay are effective and safe in calves, while their use in adult animals is not recommended, since they are made with live attenuated parasites that can cause the clinical presentation of the disease. Diaminazene aceturate is one of the active principles used for the treatment and prophylaxis of babesiosis, it alters the helical structure of the nucleic acid of the protozoan. The objective of this work was to observe the seroconversion and clinical response to frozen hemovaccine in adult bovines, with a modulating dose of Diminazene at day 10 post-immunization. Diaminazene was administered in order to modulate the vaccine by reducing its infectivity. The study was carried out in the rural establishment “María Elena”, located 20 km from the town of Paso del Cerro, northeast of the department of Tacuarembó. This farm had infection with *Rhipicephalus microplus* and a history of death of animals due to hemoparasites. The study was carried out in a batch of 90 heifers from 2 to 3 years old, of meat breeds, where 30 heifers were taken in a completely random way, they were classified into two groups of 15 animals (control and treatment). The treatment group was administered the vaccination protocol with its respective modulation. The seroconversion obtained with this protocol was 73% for *Babesia bigemina*, 40% for *Babesia bovis* and 47% for *Anaplasma centrale*, resulting in lower percentages than expected. During the 60 days of the trial there were no clinical symptoms in the vaccinated animals. We can conclude that the use of this protocol prevents the manifestation of clinical symptoms, but encourages further study of the immune response mechanisms of bovines to the agents of the “Tristeza Parasitaria” complex and what would be the criteria to consider that an animal is protected. To obtain better results in the future, with similar protocols, some points could be emphasized, such as performing antibody titration in order to evaluate the response to the vaccine, using re-vaccination to intensify the immune response and a greater seroconversion; and exposing vaccinated animals to a challenging field strain to evaluate their immunoprotection.

## INTRODUCCIÓN

En el año 1920 se comienza a utilizar el término de premunición, este concepto abarca los sistemas tradicionales de prevención, haciendo referencia a la inmunidad coinfecciosa que se consideraba que los bovinos debían mantener para estar protegidos contra las babesias. Esto posteriormente se demostró que no era necesario, ya que no debían mantenerse infectados, debido a que habían generado inmunidad (Vanzini y Ramirez, 1994). Para generar inmunidad en el bovino contra la tristeza parasitaria, se puede obtener inoculando de forma natural o artificial los hemoparásitos. La forma natural se obtiene con el “garrapateo” o exposición de los terneros a garrapatas infectadas, esta es una herramienta utilizada por los productores, aunque es cuestionada, ya que la inmunidad generada es incierta (no todas las garrapatas están infectadas) y no siempre es la adecuada (Solari, 2006). Otra alternativa es inocular sangre de animales infectados, pero al no conocer el grado de infección y tratarse de cepas no atenuadas, puede provocar la enfermedad, así como dispersar otros agentes infecciosos (Fiel y Nari, 2013).

La inmunidad artificial se consigue con el uso de diferentes tipos de vacunas, entre ellas, vacunas muertas, vacunas vivas atenuadas y vacunas recombinantes. La respuesta humoral de la vacuna muerta desarrolla una reacción más elevada que la de vacunas vivas, pero ésta declina con mayor rapidez en el tiempo y a los 5-6 meses los anticuerpos tienden a desaparecer. Las vacunas vivas no desarrollan una reacción humoral tan elevada, pero ésta se mantiene constante en el transcurso del tiempo (Vanzini y Ramirez, 1994), generando inmunidad de por vida (Fiel y Nari, 2013), siendo esta última vacuna la más utilizada. Las vacunas recombinantes son una alternativa promisoriosa a futuro, gracias a las nuevas técnicas que existen para su elaboración y a los avances en el estudio del mecanismo de inmunidad contra los protozoarios, aunque aún es necesario más conocimiento en esta área para ser utilizadas ampliamente (Bock, et al., 2004).

A la hora de generar inmunidad en el rebaño hay que tener en cuenta que la infección por *B. bovis* no protege contra un desafío ante *B. bigemina*, pero sí al revés. Aunque experimentos de inmunotransferencia demostraron reactividad cruzada entre *B. bovis* y *B. bigemina* (Bock, et al., 2004). Muchos antígenos son comunes para ambos parásitos, comparten proteínas antigénicas similares, pero *B. bovis* tiene más proteínas antigénicas que *B. bigemina*. Esto se traduce a que si un animal tiene inmunidad contra *B. bovis* no quiere decir que haya inmunidad contra *B. bigemina* (Bock, et al., 2004). Luego de una infección por *B. bovis* la inmunidad persiste hasta 4 años (Mahoney, 1972) y para *B. bigemina* la inmunidad se mantiene por más de 4 años (Aguirre y col.1993; Callow, Mcregor, Parker y Dalgliesh, 1974). El mecanismo inmune protector contra *Anaplasma* no está totalmente entendido, ni la respuesta inmune que se produce para establecer una infección persistente, pero se sabe que ante una infección aguda se desarrolla inmunidad contra una cepa homóloga y que la inmunidad generada contra *A. centrale* protege contra una infección de *A. marginale*, pero no a la inversa (Bock y de Vos, 2001). Información más reciente indica que los eritrocitos infectados son fagocitados por macrófagos, lisados por anticuerpos y el sistema del



complemento al igual que ocurre con las babesias (Tizard; 2009). La inmunidad frente a los protozoarios intracelulares sugiere una respuesta inmune TH1 que involucra células T cooperadoras, macrófagos y la producción de anticuerpos opsonizantes y fijadores del complemento. (Garcia, D., Alvarez, J., Figeroa, J y Vega, C. 2003)

En el mercado uruguayo, hay disponible dos presentaciones de hemovacunas, una refrigerada y otra congelada. Estas son elaboradas con cepas atenuadas de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. centrale* (cepa heteróloga de *A. marginale*), utilizando por dosis una concentración conocida de parásitos y seguras para el animal (Fiel y Nari, 2013). Ambas son eficientes para la profilaxis de la enfermedad, ya que no tienen diferencias significativas en la seroconversión, generando inmunidad de por vida (Solari y Quintana, 1994; Bock y de Vos, 2001; Miraballes, et al., 2018). A pesar de la disponibilidad de las vacunas, son poco utilizadas y las causas pueden ser varias como: falta de información por parte de los productores y veterinarios, dificultades en el manejo y conservación de las vacunas, costos por dosis y aplicación (Miraballes, et al., 2018).

La vacuna congelada tiene algunas ventajas sobre la refrigerada, la principal es la vida media que es significativamente mayor, esto permite una evaluación post-producción de potencia y seguridad. En cuanto a la vacuna refrigerada, tiene corta vida media y no es posible realizar chequeos de calidad previa a la remisión a los productores ya que se perdería mucho tiempo, por lo que el control pre-producción es clave, especialmente que los animales donantes no tengan otras infecciones transmisibles (Bock, et al., 2004).

La inmunización no debe coincidir con la aplicación de otras vacunas, o cualquier otro tratamiento que interfiera con la salud. Es imprescindible que no se realice en temporada de garrapata, para mantener controlado el desafío con los hemoparásitos (Solari, et al., 2013). Es indicado la utilización de la vacuna en terneros entre 3 y 9 meses de edad para conseguir inmunidad de por vida sin producir signos clínicos (Bock, et al., 2004). La multiplicación de los hemoparásitos inoculados produce una reacción leve que generalmente cursa sin manifestaciones clínicas, aunque por razones de seguridad es conveniente mantener a los animales vacunados en observación. La reacción por *B. bovis* y *B. bigemina*, ocurre entre los días 7 y 20 postvacunación y la de *A. centrale* entre los días 35 y 45 post vacunación (Zimmer, 2013). Si se desea inmunizar toros se debe tener en cuenta que puede haber esterilidad transitoria por fiebre alta, más si son toros de alto peso. El monitoreo de animales adultos es necesario cuando se vacunan, si detectamos signos clínicos se deben tratar (Bock, et al., 2004).

La vacuna en animales adultos no está recomendada por las reacciones posvacunales que se pueden presentar, pero existe la posibilidad de modular la vacuna y evitar la aparición de signos clínicos (Vanzini y Ramirez, 1994). Uno de los fármacos utilizados para modular la vacuna es el diminazene, a dosis de 1.2-1.5 mg/kg, esta modulación busca detener la multiplicación de los parásitos, dándole tiempo al animal para generar anticuerpos sin presentar signos clínicos de enfermedad. Es importante tener en cuenta que la modulación no se puede administrar el mismo día de vacunación ya que corremos el riesgo de eliminar los parásitos atenuados de la vacuna y

obtener una respuesta inmune menor o nula (Vanzini y Ramirez, 1994). Algunos autores no están de acuerdo con esta práctica (Bock, et al., 2004), fundamentando que los principios activos que se utilizan para la modulación no son aconsejables por el efecto que puede tener en la producción de la inmunidad.

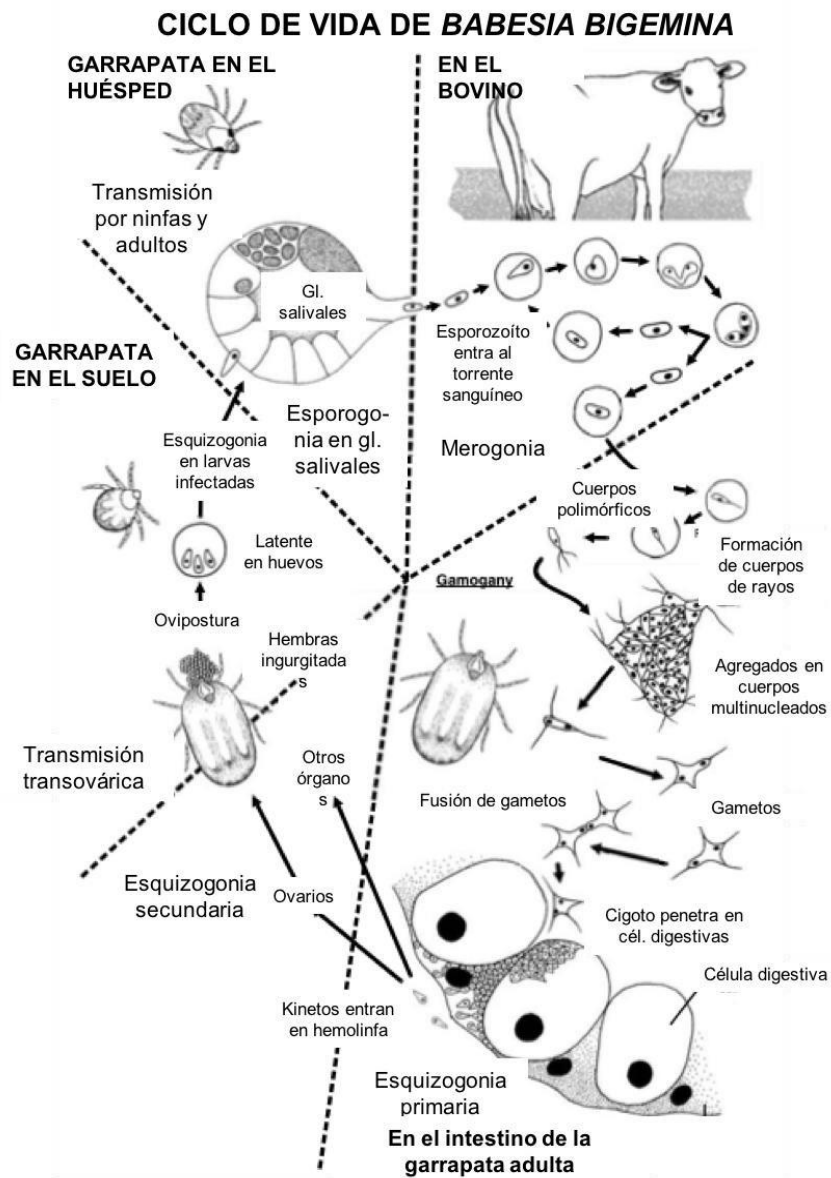
Una vez inoculada la vacuna comienzan a interactuar los agentes con el sistema inmune del animal. Para generar una inmunidad sólida, el tiempo en que persisten los hemoparásitos atenuados circulando y en contacto con células inmunitarias es fundamental, ya que cuanto más tiempo, mayor cantidad de variantes antigénicas van a expresar y más sólida será la inmunidad. (Bock, et al., 2004; Suarez, et al., 1991). Las células plasmáticas del sistema inmune son las responsables de producir anticuerpos, mientras que las células de memoria reconocerán los antígenos. Cuando estas últimas se enfrenten a una nueva parasitosis, generarán una respuesta inmune específica rápida, por ende mantendrán la inmunidad aunque ya no hayan anticuerpos circulando en sangre (Tizard. 2009). Hay amplia evidencia de literatura que sugiere que la presencia de anticuerpos no es necesariamente un indicador de inmunidad, ni que la ausencia de anticuerpos detectables indique falta de inmunidad. Ocurre que las células plasmáticas del animal sintetizan anticuerpos cuando detectan los agentes, pero ante la ausencia de los patógenos por mucho tiempo, el sistema inmune deja de utilizar recursos en algo contra lo que no se va a enfrentar. Por lo tanto, la presencia de anticuerpos es un indicador de infección reciente, tanto por infección natural como vacunación (Bock, et al., 2004).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se denomina tristeza parasitaria bovina al complejo febril y anemizante, causado por dos enfermedades: babesiosis y anaplasmosis (Almeida, et al., 2006). Estas enfermedades ocasionan importantes pérdidas económicas estimadas en 14 millones de dólares anuales (Solari, 2006) en los establecimientos rurales dedicados a la ganadería en el Uruguay. La ganadería es uno de los principales sectores de producción agropecuaria, contando con 12.100.000 cabezas bovinas, con perspectivas a crecer (Antúnez, 2020; DIEA, 2020). Tanto la babesiosis como anaplasmosis repercuten directamente en los costos productivos, con pérdidas en ganancia de peso y producción de leche, pérdidas por muerte de animales y costos en tratamientos (Solari, 2006). Sumado a la merma en los índices reproductivos de los rodeos por abortos y retrasos en la concepción (Correa W M, Correa G N M, y Gottschalik, 1978; Swift, Settlemyre, y Thomas, 1978). Estas enfermedades son de alta prevalencia en el país, donde se estima en base a una encuesta, que la presentación de casos de tristeza parasitaria en establecimientos en Uruguay es de 16%, y un 38% manifiesta haber tenido garrapata (Aráoz, 2019).

La babesiosis bovina en Uruguay es causada por dos hemoparásitos, *Babesia bovis* y *B. bigemina*, transmitido únicamente por la garrapata *Rhipicephalus microplus* (Bock, Jackson, de Vos, y

Jorgensen, 2004; Mahoney y Mirre, 1979; Guglielmone, 1995). Estos protozoarios tienen dos mecanismos de reproducción, uno es sexuado que se da en la garrapata, y otro asexual que se da por fisión binaria en los eritrocitos del bovino. Cuando una garrapata ingiere estos eritrocitos infectados, los merozoitos evolucionan hasta diferenciarse en gametos masculinos y femeninos, para luego fusionarse y formar un cigoto, este cigoto parasita el intestino de la garrapata, se diseminan por vía hemolinfática llegando a los ovarios, dándose la transmisión transovarica, infectando los huevos de las garrapatas (Fiel y Nari, 2013). *B. bovis* es transmitida al bovino por la larva infectada, mientras que para *B. bigemina* es la ninfa y adultos quienes la transmiten (Mahoney y Mirre, 1971).



**FIGURA 1:** Ciclo de vida de *Babesia bigemina* en el vacuno y en la garrapata.

Adaptado de Bock y col., 2004.

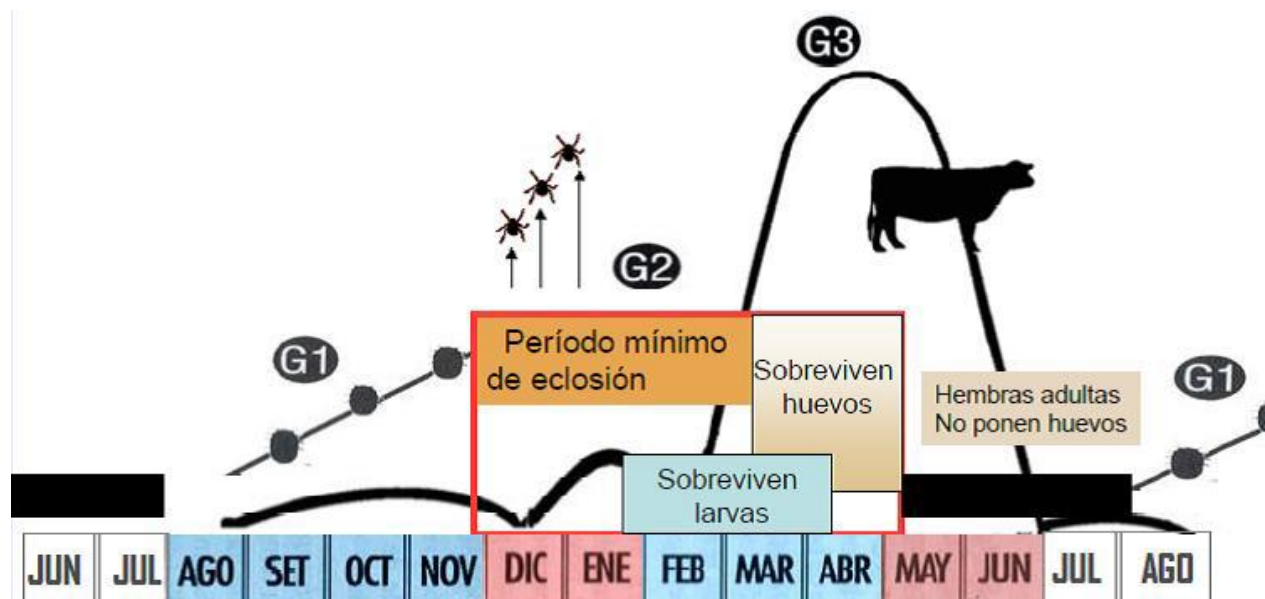
La anaplasmosis bovina es provocada por una rickettsia, *Anaplasma marginale* y es transmitida por garrapatas, entre ellas *R. microplus* (Shimada et al., 2004), dípteros hematófagos como tábanos, moscas (*Stomoxys calcitrans*), mosquitos, iatrogenia, ya sea por transfusiones de sangre, cirugías (descornes, castraciones) y vacunaciones donde se utilizan fomites contaminados con sangre (Fiel y Nari, 2013; Shimada, et al., 2004). No tiene un ciclo biológico en la garrapata, la transmisión es transestadial, y el macho tiene un papel preponderante en la transmisión. Se multiplica por fisión binaria dentro de los eritrocitos formando cuerpos iniciales, que contienen entre 4 a 8 rickettsias. Estos salen de las células mediante exocitosis infectando otros eritrocitos (Kocan, de la Fuente, Coetzee y Ewing, 2010).

La babesiosis y anaplasmosis bovina históricamente se encuentran vinculadas, ya que comparten características muy similares, entre ellas, ambas infectan los eritrocitos de los bovinos exclusivamente, causan enfermedades clínicamente semejantes, pueden ser transmitidas por *R. microplus* y con frecuencia coexisten en áreas endémicas (Suarez y Noh, 2011). Estas enfermedades tienen alta letalidad en animales adultos, moderada a severa en animales de sobreaño y leve o subclínica en terneros. Como cuadro clínico en común, se caracteriza por intensa anemia y fiebre mayor a 40°C (Fiel y Nari, 2013; Amorim, Wenceslau, Carvalho, Carneiro y Albuquerque, 2014).

La babesiosis provoca una anemia hemolítica intravascular, esta anemia se caracteriza por ser macrocítica, hipocrómica; conllevando a desórdenes vasculares y falla circulatoria (Vally y Gentry, 2007). La hemólisis que causa *B. bigemina* es severa ocasionando anemia, ictericia y hemoglobinuria, mientras que *B. bovis* suele ser más aguda causando la muerte del animal antes de ver la hemoglobinuria. En las infecciones por *B. bovis*, éstas liberan sustancias que activan el sistema del complemento, provocando hipotensión, vasodilatación, aumento de la permeabilidad endotelial, daño en los endotelios de los capilares y estasis circulatoria (Ahmed, 2002). Tiene la particularidad de adherirse a los endotelios de la microcirculación periférica lo que le permite sobrevivir en el huésped por varios años evitando el clearance esplénico (Fiel y Nari, 2013). Debido a los trastornos circulatorios provocados por *B. bovis*, es común observar síntomas nerviosos como agresividad, ataxia, trastornos del equilibrio e incoordinación (Cipolini, Mangold y Jacobo, 2004). Los glóbulos rojos parasitados por las babesias expresan en su membrana antígenos los cuales interactúan con los anticuerpos siendo opsonizados y eliminados mediante fagocitosis por macrófagos y linfocitos citotóxicos (Tizard, 2009; Morilla, 1981). En cuanto anaplasmosis el curso de la enfermedad es más prolongado y se caracteriza por la anemia, siendo común observar valores del volumen globular inferiores al 10%. En las mucosas se observa ictericia y palidez intensa, no hay hemoglobinuria, aunque la orina frecuentemente presenta color marrón, debido a la presencia de pigmentos biliares (Cipolini, et al., 2004).

Para comprender la epidemiología de estas enfermedades, se debe tener en cuenta el conjunto de factores compuesto por: el/ los vector/es, los hemoparásitos y el bovino. La garrapata *R. microplus* es el único vector conocido para la transmisión de las babesias, mientras que anaplasma también

se transmite de forma mecánica por insectos hematófagos y por iatrogenia (Vanzini y Ramirez, 1994). Por un lado, el comportamiento de la garrapata *R. microplus* en Uruguay está netamente relacionado al clima, características geológicas e hídricas de los suelos, entre otros. El ciclo parasitario es de 21 días aproximadamente, con una viabilidad de 8 a 10 meses en su fase no parasitaria. Dependiendo de la intensidad y duración de las bajas temperaturas se presentan de 1,5 a 3,5 generaciones de *R. microplus* al año, con un pico otoñal, coincidiendo con la mayor presentación de brotes de tristeza (Fiel y Nari, 2013). La presencia de resistencia a determinadas moléculas garrapaticidas, entre otras causas, trae aparejado un riesgo, ya que se ve un aumento en la población de garrapatas, incrementando la probabilidad de un brote de tristeza (Cuore, 2006).



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

Con respecto a los hemoparásitos, estudios realizados han demostrado cómo afecta el clima en las garrapatas infectadas por babesia. Se vio que las bajas temperaturas que se presentan en invierno, incidieron de forma negativa en el mantenimiento de la infección, interrumpiendo la infección por babesias en la mayoría de las garrapatas, siendo el bovino portador el que mantiene el problema entre temporadas (Solari, Dutra y Quintana, 2013). En el caso de *B. bigemina* la garrapata infectada es el reservorio y su transmisión es debida a la cantidad de bovinos parasitados por garrapatas (Mastropaolo, 2014). Para la perpetuación de anaplasma también tiene un rol importante los animales portadores pudiendo estar de por vida infectados (Suarez y Noh, 2011).

El último factor de la tríada epidemiológica es el animal, el cual para enfrentar estas enfermedades debe haber generado en algún momento de su vida anticuerpos (de forma natural o artificial), estableciendo los conceptos de estabilidad e inestabilidad enzoótica en el rodeo (Solari, et al., 2013). Se reconoce que un rodeo está en equilibrio enzoótico, cuando se encuentra con muy bajos desafíos de garrapatas y seroprevalencia menor a 19%, o con altos desafíos y seroprevalencia mayor a un 80%. Por otro lado, se habla de inestabilidad enzoótica cuando hay mayor riesgo por

fluctuaciones de garrapata con seroprevalencia entre 20% y 79%, en este estatus se encuentra la mayoría del rodeo uruguayo (Fiel y Nari, 2013; Miraballes, Lara, Lorenzelli, Lemos y Riet-Correa, 2018).

El diagnóstico de tristeza parasitaria puede realizarse de forma indirecta o directa. Las pruebas diagnósticas indirectas detectan la presencia de anticuerpos generados posterior al contacto con los parásitos. Siendo las técnicas más utilizadas en los países del conosur, la aglutinación en tarjeta (Card Test) y fijación del complemento para *Anaplasmaspp.* y la inmunofluorescencia indirecta para *Babesia. spp.* (IICA, 1987). En el caso de la aglutinación en tarjeta es una prueba sencilla, fácil de realizar y de interpretación objetiva (IICA, 1987). Por su parte, la inmunofluorescencia es una técnica sensible y específica, de fácil preparación, donde su fundamento se basa en la detección (presencia o ausencia) de inmunoglobulinas (Tizard, 2009). Estas pruebas aportan resultados de estatus serológico e información epidemiológica, pero son de poca utilidad para diagnosticar animales en fases agudas (IICA, 1987). Por otro lado, las técnicas directas como lo son la visualización de frotis coloreados con Giemsa y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), buscan la presencia del agente o en su caso ADN, siendo útiles en diagnosticar animales enfermos (Parodi, Crbellini, y Leotti, 2020; Böse, Jorgensen, Dalgliesh, Friedhoff y de Vos 1995).

En cuanto al tratamiento terapéutico, hay dos principios activos específicos para eliminar las babesias, uno de ellos es el diminazeneaceturato (3,5 mg/ kg de peso vivo) y el otro es el dipropionato de imidocarbo (1 a 2 mg/kg de peso vivo). Ambos compuestos tienen acción profiláctica; el imidocarbo administrado a una dosis de 3 mg/kg de peso vivo, tiene una acción de hasta 28 días para ambas babesias, mientras que el diminazene su acción se prolonga por 2 semanas a dosis de 5 mg/kg. Para el tratamiento de anaplasmosis, es efectivo el uso de tetraciclina a dosis de 20 mg/kg de peso vivo o dipropionato de imidocarbo a dosis de 3 mg/kg de peso vivo, pero estas drogas no tienen acción profiláctica (Fiel y Nari, 2013). Estos tratamientos pueden ser complementados con una terapia de apoyo, como puede ser la transfusión de sangre, donde se busca reponer el hematocrito (Carriquiry, 2002; Solari, et al., 2013).

La erradicación de la garrapata y la consecuente disminución de la tristeza parasitaria bovina es un objetivo que muchas veces es difícil de alcanzar, provocando el quiebre de la estabilidad enzoótica (Bock, et al., 2004). En este contexto la inmunización de los animales susceptibles aparece como una de las alternativas más acertadas para la prevención (Vanzini y Ramirez, 1994). Se recomienda su utilización en terneros entre 3 y 9 meses de edad, los cuales generan inmunidad sin presentar signos clínicos (Bock, et al., 2004). No es recomendada la utilización de la vacuna en animales adultos ya que pueden tener reacciones posvacunales, pero existe la posibilidad de atenuar la reacción de la vacuna y evitar la aparición de signos clínicos (Vanzini y Ramirez, 1994).

## HIPÓTESIS

El uso en bovinos adultos de la hemovacuna trivalente congelada, modulada al día 10 post-inmunización, con una dosis de 1,24 mg/kg PV de Diminazene aceturato, genera entre un 80 y 85% de seroconversión de anticuerpos para los tres hemoparásitos y la modulación previene la manifestación de signos clínicos que podría causar la inmunización.

### **Objetivos**

Determinar la seroconversión de la hemovacuna congelada en animales adultos con una dosis de modulación de 1,24mg/kg PV de Diaminazene aceturato al día 10 post-inmunización.

Evaluar las implicancias clínicas que tiene utilizar la hemovacuna modulada en animales adultos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Lugar del ensayo*

El estudio se llevó a cabo en el establecimiento rural “María Elena” (31°28'44"S 55°49'56"O), ubicado a 20 km de la localidad de Paso del Cerro, al noreste del departamento de Tacuarembó. Se accede al establecimiento por camino vecinal desde la ruta 5, km 407.

El establecimiento cuenta con una superficie de 1272 ha, de las cuales 641 ha son utilizadas por la firma y las restantes 631 están arrendadas por un tercero. Forma parte de la unidad de paisaje Quebradas del norte, donde predominan suelos superficiales y muy superficiales, con pendientes pronunciadas y alto nivel de rocosidad. El pastizal natural es el principal recurso forrajero con una alta presencia de vegetación leñosa.

En 2017 la firma actual adquirió ganado de cría principalmente de raza Angus, libre de garrapatas, no así el campo, el cual tenía presencia de garrapatas. En 2018 aparecieron los primeros casos de tristeza parasitaria, vinculados con una falla en el control de garrapatas, que luego se confirmó que era consecuencia de resistencia a la Ivermectina.

### *Animales del estudio*

El estudio se realizó en un lote de 90 vaquillonas de 2 a 3 años (cruza Hereford y Aberdeen Angus Colorado), compradas 6 meses antes del inicio del estudio. De éstas, 76 vaquillonas fueron compradas en abril en un remate en la Asociación Rural de Tacuarembó. Las 14 restantes se compraron de forma particular en la localidad de Laureles.

En el establecimiento se sigue un plan sanitario, que incluye el control estratégico de garrapata con rotación generacional de principios activos (Fluazuron, Fipronil, Amitraz). Se vacuna contra leptospirosis cada seis meses al rodeo de cría (usando booster en las vaquillonas de 1er entore) y anualmente contra Carunco (todo el rodeo). La alimentación es a base de pasturas naturales y se suplementa con sales minerales.

### *Condición corporal*

En lo que respecta a la condición corporal, tomamos los siguientes valores en base a la escala de ganado de carne, en un rango de 1-8; validada para el país por (Vizcarra, Ibáñez, Orcasberro., 1986), donde:

Muy mala = 1-2

Mala=3-4

Buena =5-6

Muy buena =7-8

### *Diseño del estudio y toma de muestras*

De las 90 vaquillonas se seleccionaron 30 de forma completamente aleatoria. Fueron identificadas en dos grupos de 15 animales (control y tratamiento). Durante el estudio se realizaron 4 visitas al predio, instancias donde se tomaron muestras.

La primera visita “día 0”: se identificaron y seleccionaron aleatoriamente los individuos que participaron en el ensayo. Se registró: temperatura corporal (vía rectal), condición corporal, y presencia de garrapatas (al tacto e inspección visual). Se tomaron muestras de sangre por punción de la vena coccígea media, obteniendo dos tubos por animal, uno con anticoagulante EDTA K<sup>+</sup> y otro sin anticoagulante.

Al grupo tratamiento se lo vacunó con la hemovacuna congelada trivalente (CEUAFVET-1062111900-00050520), compuestas por *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. centrale*. La dosis a administrar fue de 2 ml por animal, vía subcutánea en la región escapular caudal. Cada dosis contiene  $1,0 \times 10^7$  eritrocitos infectados (información que brinda el prospecto de la vacuna) de cada cepa atenuada de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. centrale*. Al grupo control no se le realizó ningún tratamiento.

Segunda visita, “día 10”. Diez días posterior a la vacunación, a los 30 animales en estudio se les midió: temperatura corporal, se determinó la presencia de garrapatas, y se les extrajo sangre con anticoagulante EDTA K<sup>+</sup>.

Al grupo tratamiento se le moduló (atenuó) la reacción de la vacuna inyectando vía intramuscular profunda en la región del anca 1, 24 mg/kg/PV de Diminazene de aceturato.



Tercera visita “día 12”. Doce días post vacunación a ambos grupos se les midió temperatura corporal y se les extrajo sangre con anticoagulante EDTA K+.

Cuarta visita “día 60”. Sesenta días post vacunación a ambos grupos se les tomó la temperatura corporal, condición corporal, se buscó la presencia de garrapatas y se extrajo muestra de sangre en tubos con anticoagulante EDTA K+ y sin anticoagulante.

Durante todo el ensayo ambos grupos fueron manejados en un mismo potrero, pastoreando campo natural y con sales minerales, tuvieron supervisión (personal rural capacitado y entrenado) diaria en búsqueda de sintomatología clínica atribuible a la reacción de la vacuna durante 60 días. Se utilizó antiparasitario (Fipronil al 1%) para el control de garrapata.

#### *Signos clínicos*

Se evaluó diariamente, a campo, por un periodo de 60 días, la presencia (o ausencia) de sintomatología clínica como: cambio en la coloración de la mucosa ocular y vulvar (ictericia [amarilla] o anemia [blancas]), decaimiento, agresividad, animales que se rehúsan a caminar y orina con coloración rojiza.

#### *Procesamiento de las muestras*

#### *Análisis serológico*

Las muestras de sangre sin anticoagulante que se tomaron el día 0 y 60 fueron remitidas al Laboratorio DILAVE- Central para realizar prueba serológica de Inmunofluorescencia indirecta para *B. bovis* y *B. bigemina* y Card test para *A. marginale*, para así determinar la seroconversión de los animales.

#### *Microhematocrito*

Se estudió la evolución del perfil de anemia en los animales, para esto se utilizó sangre con anticoagulante EDTA K+. Se realizó microhematocrito, cargando sangre en capilares de 70 µl y centrifugando a 11.000 rpm durante 4 minutos. Con posterior lectura del porcentaje de glóbulos rojos.

#### *Análisis estadístico*

Se realizó un modelo de regresión logística para evaluar el estatus serológico entre el día 0 y el día 60 de los animales pertenecientes a cada grupo (control o tratamiento), utilizando la información si eran positivos o negativos a cada hemoparásito.

Se realizaron dos modelos de regresión lineal en el software estadístico Stata 16, uno para evaluar el efecto de la temperatura y otro para evaluar el efecto del hematocrito. Las variables independientes fueron el grupo (tratamiento sí o no), presencia de garrapatas y el día. Se consideró el efecto animal como aleatorio (medidas repetidas). Estos modelos de Regresión Lineal, tomaron

como variable dependiente Y al *microhematocrito* o *temperatura* y como variables explicativas X a los grupos Tratamiento/ Control + Presencia de garrapatas + Día.

## RESULTADOS

### *Serología*

Los resultados obtenidos en este muestreo se evaluaron de forma cualitativa, determinando la presencia o ausencia de anticuerpos. Tomando como “presencia” a los animales positivos de la prueba diagnóstica, y “ausencia” a los animales negativos a la misma.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

**CUADRO I:** Resultados serológicos para los agentes de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma spp.* al día 0 y al día 60 en el grupo control y tratamiento.

	GRUPO CONTROL		GRUPO TRATAMIENTO	
	DÍA 0	DÍA 60	DÍA 0	DÍA 60
	n/N	n/N	n/N	n/N
<b>Babesia bovis (IFI)</b>	5/15	3/15	0/15	6/15 (40%)
<b>Babesia bigemina (IFI)</b>	3/15	5/15	1/15	11/15 (73%)
<b>Anaplasma spp</b>	6/15	6/15	3/15	7/15 (47%)

n= número de animales positivos a la serología, N=número de animales del grupo.

El modelo de regresión logística expresó que las diferencias no fueron significativas para *B. bovis* (valor  $p=0,226$ ) y *A. marginale* (valor  $p= 0,285$ ); mientras que para *B. bigemina* los resultados sí fueron de diferencia significativa ( $p=0,002$ ).

**CUADRO II:** Regresión logística de los resultados de la serología para los agentes de tristeza parasitaria bovina.

	Odds ratio	[95% Conf.	Interval]	P>   z
Anaplasma spp.	1,789442	0,61602	5,0198048	0,285
B.bovis	2,153379	0,6220321	7,454664	0,226
B.bigemina	7,849498	2,113957	28,79767	0,002

P> | z | : valor de significancia.

*Hematocrito*

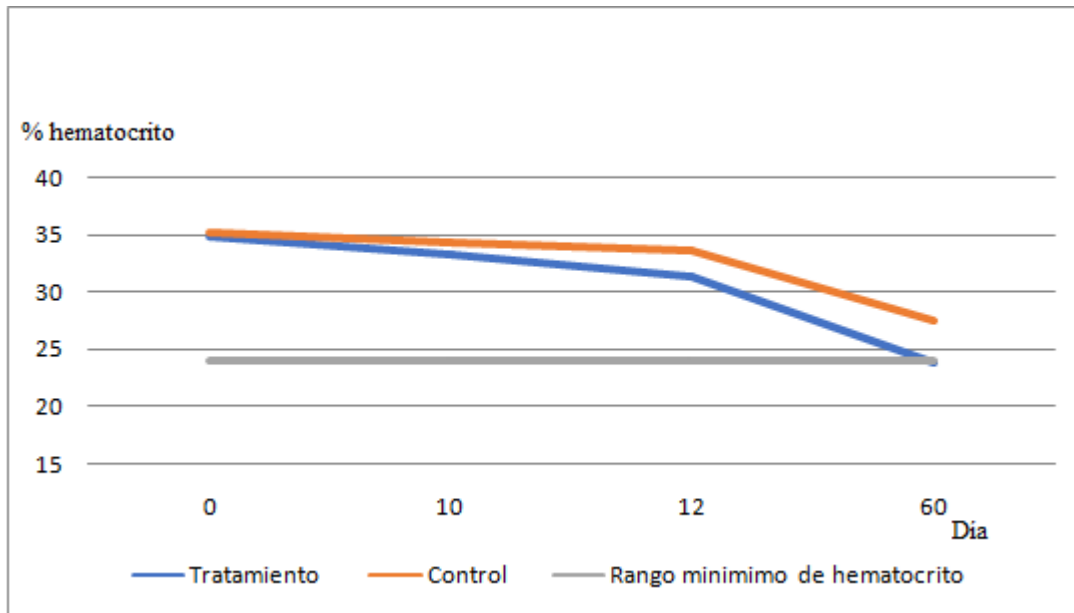
Se tomó como normal un hematocrito con valores entre 24% y 40%. Todo animal con hematocrito menor a 24% se contabilizó como un animal con anemia. En las 4 visitas se tomaron y procesaron muestras para medir el hematocrito, estas demostraron los siguientes datos:

**CUADRO III:** Proporción de animales con anemia de acuerdo al hematocrito.

	<b>DÍA 0</b>	<b>DÍA 10</b>	<b>DÍA 12</b>	<b>DÍA 60</b>
	n/N	n/N	n/N	n/N
<b>Grupo Tratamiento</b>	0/15	0/15	0/15	7/15
<b>Grupo control</b>	0/15	0/15	0/15	3/15

n= animales con hematocrito menor 24%, N=número de animales.

Al análisis estadístico no hubo diferencias significativas entre los hematocritos de ambos grupos (“Control” y “Tratamiento”), p=0,080.



**FIGURA 3:** Evolución del porcentaje de microhematocrito (media) en animales control e inmunizados con vacuna contra tristeza bovina.

Hubo diferencias significativas en los valores de hematocrito entre el día 0 y 60, con un  $p=0,000$ .

**CUADRO IV:** Predicción lineal para la comparación entre días del ensayo.

Día	Margin	[95% Conf.	Interval]	$P >  z $
0	34,96667	33,42553	36,5078	0
10	33,8	32,25886	35,34114	0
12	32,36812	30,780055	33,95569	0
60	25,7	24,15886	27,24114	0

Margin: Media del microhematocrito;  $P > |z|$ : Es el valor de significancia.

#### *Temperatura*

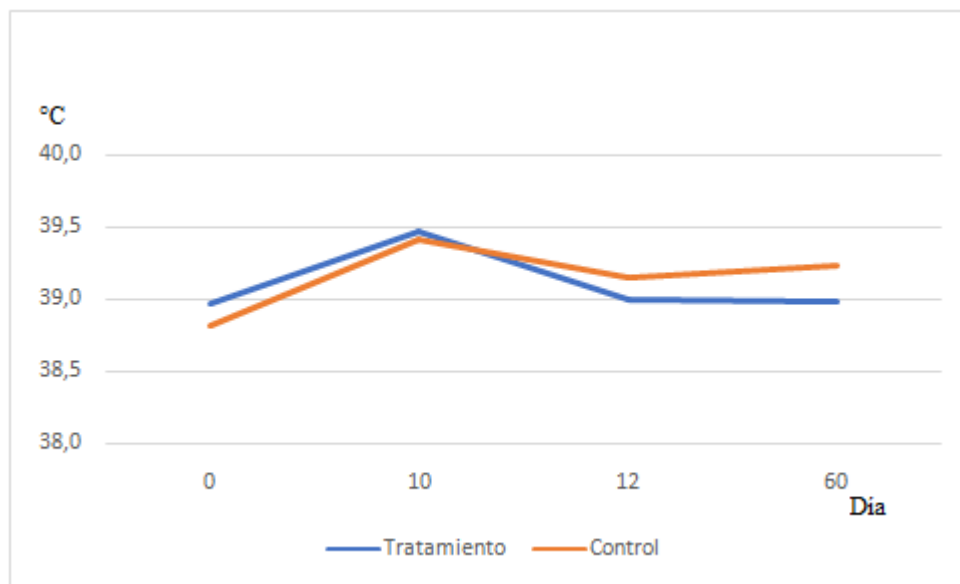
En el día 0 no hubo temperaturas mayores a 40 grados, al día 10 sólo dos (2/15) animales del grupo tratamiento presentó temperatura  $\geq 40$  °C y uno (1/15) en el grupo control. Al día 12 no hubo temperaturas rectales mayores a 40 °C. Por último, al día 60 uno (1/15) en el grupo control presentó temperatura mayor a 40 °C.

La media para las temperaturas rectales fueron las siguientes:

**CUADRO V:** Media de la temperatura rectal.

	<b>DÍA 0</b>	<b>DÍA 10</b>	<b>DÍA 12</b>	<b>DÍA 60</b>
<b>Grupo tratamiento</b>	38,8°	39,1°	39,2°	38,9°
<b>Grupo control</b>	38,8°	39,5°	39,2°	38,9°

Se realizó una regresión lineal, la cual no manifestó diferencias en la temperatura de acuerdo al grupo ( $p=0,564$ ), esta variable fue removida del modelo final por esta razón.



**FIGURA 4:** Evolución de la temperatura rectal (promedio).

Hubo diferencias significativas de temperatura en las diferentes visitas ( $p=0.000$ ), entre los días 0-10, 0-12, 0-60 respectivamente.

**CUADRO VI:** Predicción lineal para la temperatura según los días.

Día	Margin	[95% Conf.	Interval]	P>  z
0	38,83	38,74	39,03	0,00
10	39,44	39,29	39,58	0,00
12	39,07	38,92	39,21	0,00
60	39,11	38,96	39,25	0,00

Margin: Media de la temperatura; P> |z|: valor de significancia.

*Presencia o ausencia de garrapata*

La presencia y/o ausencia de garrapata fue evaluada cualitativamente en el tubo, en cada una de las visitas, mediante la inspección visual y al tacto.

**CUADRO VII:** Animales del grupo control y grupo tratamiento con presencia de garrapata al día 0, 10, 12 y 60.

	<b>DÍA 0</b>	<b>DÍA 10</b>	<b>DÍA 12</b>	<b>DÍA 60</b>
	n/N	n/N	n/N	n/N
<b>Grupo tratamiento</b>	1/15	2/15	6/15	13/15
<b>Grupo control</b>	6/15	2/15	7/15	13/15

n/N; n= presencia de garrapata, N=número de animales

*Signos clínicos*

En el transcurso de los 60 días del ensayo no se manifestó sintomatología clínica asociada a la vacunación.

*Condición corporal*

**CUADRO VIII:** Número de animales según su condición corporal al día 0.

	<b>GRUPO CONTROL</b>	<b>GRUPO TRATAMIENTO</b>
<b>MUY MALA</b>	5	5
<b>MALA</b>	8	10
<b>BUENA</b>	2	0
<b>MUY BUENA</b>	0	0

**CUADRO IX:** Número de animales según su condición corporal al día 60.

	<b>GRUPO CONTROL</b>	<b>GRUPO TRATAMIENTO</b>
<b>MUY MALA</b>	0	0
<b>MALA</b>	3	2
<b>BUENA</b>	11	13
<b>MUY BUENA</b>	1	0

## DISCUSIÓN

La hipótesis del ensayo manifiesta el interés de generar entre un 80 y 85% de seroconversión de anticuerpos para los tres hemoparásitos (*B.bigemina*, *B.bovis*, *A.centrale*). Se obtuvo una seroconversión de 73 % para *Babesia bigemina*, 40% para *Babesia bovis* y 47% para *Anaplasma centrale*. No alcanzado una seroprevalencia del 80%, es decir, que no se logró estabilidad enzoótica (Fiel y Nari, 2013). En lo que refiere a la manifestación de la enfermedad, en el transcurso del ensayo no se detectó sintomatología clínica asociada a la vacunación.

La presencia de anticuerpos en algunos animales del ensayo en el día 0 demuestra que estos estuvieron en contacto con cepas de campo. La implementación de este plan de vacunación fue en temporada de garrapatas, y al ser este un predio con historial de lucha para el control del ácaro se tendría que haber hecho en invierno, tanto por la seguridad de los animales como para poder atribuir los resultados de seroconversión a la vacuna y que no existiera la posibilidad de una infección y/o contaminación del ensayo con una cepa de campo de *Babesia spp.*. En aquellos animales del grupo tratamiento que ya habían tenido contacto con alguno de los agentes, lo que hicimos al vacunarlos fue estimular la respuesta inmune humoral, es decir reactivar sus células de memoria. Ocurre que las células plasmáticas del animal sintetizan anticuerpos cuando detectan los agentes; pero ante la ausencia de esos agentes patógenos por mucho tiempo, el sistema inmune deja de utilizar recursos en algo contra lo que no se van a enfrentar (Bock, et al., 2004). Aquellos animales del grupo control que serológicamente dieron positivos para *B. bovis* al día 0 y negativos al día 60, podrían ser falsos negativos, ya que la prueba de inmunofluorescencia tiene 95% sensibilidad, 90% de especificidad (Barani ,2018; Pita y Pértegas, 2013).

Esta técnica tiene algunas limitaciones, como reacciones cruzadas entre *B. bovis* y *B. bigemina*, e inespecificidad en el caso de *A. marginale* (OIE, 2014). Lo mismo sucedió para aquellos animales del grupo tratamiento que fueron negativos al día 0 y luego volvieron a ser negativos al día 60. Puede ocurrir, que la técnica no capte animales con pocos anticuerpos (por una mala respuesta a la vacuna y su modulación), tal vez la concentración de anticuerpos venía en declive. Otras posibilidades son que el material estuviese mal acondicionado y/o reacciones inespecíficas.

La presencia de garrapatas en el establecimiento, determinó que hubiera animales seropositivos desde el inicio de este trabajo, que se presentaron en mayor cantidad en el grupo control; para el caso de *B. bigemina* la cantidad de seropositivos aumentó al día 60 en los dos grupos.

Los animales del grupo Tratamiento, generaron anticuerpos contra todos los agentes, no se puede determinar si es consecuencia de una infección por cepa de campo o por la vacuna, pero sí sabemos que existió infección reciente. La detección de anticuerpos es un indicador muy efectivo de infección reciente, tanto por infección natural como vacunación (Bock, et al., 2004).



Podemos suponer que los animales positivos a *A. marginale* al día 0 (en grupo control y grupo tratamiento) se infectaron previo al experimento, resultando positivos al día 0 y al día 60. Cuando el ganado bovino es infectado puede suceder que los anticuerpos no eliminen la parasitemia en su totalidad (Tizard, 2009).

Los animales han estado expuestos también a *B. bigemina* previo y durante al experimento, partimos en el grupo control de 3 animales infectados, y durante el experimento 2 animales más de este grupo se infectaron. El modelo estadístico (Cuadro II) demostró que para *B. bigemina* las diferencias en los resultados fueron significativas ( $p=0,002$ ) y el Odds Ratio fue de 7,85, es decir, que hay 7,85 más probabilidad que haya una seroconversión si vacunamos el ganado. Este resultado evidencia que la vacunación si tuvo un efecto (en la seroconversión) para el agente *B. bigemina*.

En el caso de *B. bovis* y *A. marginale* las diferencias no fueron significativas, es decir, que no se logró el efecto deseado sobre la seroconversión.

Trabajos realizados por Vanzini y Ramirez (1994) especifican, que es necesaria la revacunación sin modulación cuando se utiliza este tipo de protocolo, una vez terminada la reacción de *Anaplasma centrale*.

Un microhematocrito bovino normal oscila entre 28 y 33%, en caso de tristeza parasitaria se observan porcentajes menores de 26% (Radostits, Gay, Blood y Hinchcliff, 2002; Amorím, et al., 2014). En el ensayo no se observó hematocritos menores a 24% en las tres primeras visitas, Vanzini y Ramirez (1994) recomiendan tratar los casos en los que el hematocrito es de 22% o menor. La gráfica descriptiva (Figura 1) indica que ambos grupos disminuyeron su microhematocrito al día 60, y el “p valor” fue de  $p=0,080$ , lo que significa que cuando se comparó el porcentaje (%) de microhematocrito entre grupos Tratamiento vs Control, no hubo una diferencia significativa. Esa pequeña diferencia al día 60 de hematocrito (media % microhematocrito Control - media % microhematocrito Tratamiento= 3.67) no estaría explicada (en este modelo estadístico) por el efecto del tratamiento (uso de la vacuna). Sin embargo, hubo diferencias significativas en el hematocrito de acuerdo al día ( $p=0,000$ ). Los valores del hematocrito fueron más bajos al día 60 respecto al día 0, esto se puede atribuir a la fuga en el control de ectoparásitos y a factores medioambientales, como podrían ser nematodos intestinales o trematodos.

La temperatura corporal normal de los mamíferos va de 36 °C a 40 °C aproximadamente, varía con la hora del día (aumenta al atardecer), y tiende a seguir las fluctuaciones de la temperatura del ambiente (Cruz y Saravia, 2003). Si un animal presenta una temperatura mayor a 40°C por dos días consecutivos entre los 7 y 20 días se lo asocia a reacción de la vacuna por las babesias (Vanzini y Ramirez, 1994). En todas las instancias que fue medido la temperatura rectal hubo elevada temperatura ambiente y humedad, siendo estos los elementos e índices meteorológicos que dificultan más la disipación de calor por parte del animal hacia el medio ambiente (Cruz y Saravia, 2003), pese a esto a nivel poblacional no hubo temperaturas mayores a 40°C (Figura II). El análisis

estadístico confirma esto, ya que no hubo diferencia de temperatura entre los grupos de estudio (“Control” y “Tratamiento”) con un  $p=0,564$ , si hubo diferencia entre los días ( $p=0,000$ ).

En un estudio realizado en Uruguay sobre la garrapata común del ganado y la tristeza parasitaria, se vio que un 38% de los productores tienen o tuvieron garrapata en el predio y un 16% manifestó haber tenido casos de tristeza parasitaria (Aráoz, 2019), demostrando que la presencia del vector está muy relacionada a que se desarrolle la enfermedad. Podemos apreciar (Cuadro VII) una disminución de animales parasitados en el grupo control entre el día 0 y el día 10, posiblemente debido a error humano en la detección de los ácaros, al igual que la diferencia entre el día 10 y el 12. Si bien la presencia del ácaro pudo afectar en la serología, en ambos modelos lineales no hubo diferencias significativas en la presencia de garrapatas ( $p= 0,312$  hematocrito y  $p= 0,841$  temperatura), esto significa que la presencia de garrapatas no tuvo un efecto sobre los porcentajes (%) de microhematocrito ni en la temperatura para ambos grupos (Tratamiento y Control). Para que haya una diferencia significativa el  $p$  valor tiene que ser menor a 0,05 (nivel de confianza 95%).

Ambas enfermedades tienen alta letalidad en animales adultos, moderada a severa en animales de sobreño y leve o subclínica en terneros (Fiel y Nari, 2013). Cuando se decide vacunar animales adultos, se sugiere mantenerlos vigilados y si detectamos signos clínicos o fiebre se deben tratar (Bock, et al., 2004). El seguimiento de los signos clínicos en la vacunación fue uno de los objetivos a estudiar, en el transcurso del ensayo no se vio sintomatología clínica asociada a la vacunación. Las reacciones a la vacuna ocurrirían entre los días 7 y 20 pos vacunación para las *Babesiasspp.* y entre los días 35 y 45 post vacunación para *A.marginale*(Zimmer, 2013). Es recomendado que el momento de aplicación ideal de la modulación con diaminazene sea entre los días 9 y 11 y la dosis a administrar sea la mitad de la dosis terapéutica (3,5 mg/kg) aproximadamente, siendo 1.5mg/kg el límite máximo recomendado, para así evitar eliminar la vacuna. En el ensayo se usó un tercio de la dosis terapéutica, 1,24 mg/kg (Lorenzelli, Machi, Etchebarne y Salada, comunicación personal).

La condición corporal es un signo clínico o subclínico de enfermedad, de haberse dado pérdida de la misma, se podría haber adjudicado a la vacuna, cosa que no sucedió. La condición corporal también está vinculada con la inmunidad que puede generar el animal, cuando la condición corporal es pobre, hay altas chances de fracaso vacunal, por una respuesta inmune disminuida. Por ejemplo, los animales muy parasitados o mal nutridos pueden estar inmunodeprimidos y no deberían ser vacunados (Tizard; 2009). En este caso, los animales en el transcurso del ensayo ganaron peso, por ende condición corporal.

## CONCLUSIONES

El fin de este ensayo fue lograr seroconversión para los agentes de la tristeza parasitaria en animales adultos, sin que se manifestaran signos clínicos de la enfermedad. Podemos concluir que la utilización de este protocolo no provoca la manifestación de síntomas clínicos. En cuanto a la seroconversión obtenida para los tres agentes, no alcanzó los niveles que nos planteamos como objetivo. Pese a esto, se logró seroconversión a la vacuna, y una posible protección a futuras infecciones, ya que la presencia de anticuerpos no infiere que haya protección. Posiblemente sean otros mecanismos inmunoprotectores, que aún no se conocen, los que determinen que los bovinos estén protegidos, se nos ha informado que en este predio problema ha habido nuevos casos de tristeza parasitaria, pero no en los animales vacunados en el estudio.

Los porcentajes de seroconversión obtenidos con este protocolo, nos llevan a rechazar la hipótesis planteada.

Entendemos que se podrían incorporar técnicas diagnósticas como PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) al día 10 posterior a la vacuna (previo a la administración del Diminazene), para determinar la presencia o ausencia de material genético de la vacuna en el organismo de los animales inoculados y al día 12 para determinar si la dosis de modulación elimina los parásitos atenuados de la vacuna.

Se debería realizar hematocrito entre los días 35 y 45 ya que es cuando los animales vacunados podrían presentar síntomas a *Anaplasma centrale*.

También, se debería analizar la vacuna a administrar, evaluando su infectividad en el laboratorio o dejando un grupo de animales sin modular para constatar si desarrollan síntomas de la enfermedad.

Puede ser útil revacunar sin modulación al día 60, y estudiar la seroconversión con muestras pareadas hasta el día 120, ya que es posible que los niveles de seroconversión alcanzados sean mayores.

Las muestras pareadas podrían brindar información para el estudio de la reacción serológica de los bovinos a las vacunas/hemoparásitos, aún más si se incluyeran pruebas que cuantifiquen (titulación) la cantidad de anticuerpos, permitiendo evaluar la evolución, intensidad y duración de la respuesta generada.

Por último, se debería desafiar los animales vacunado enfrentandolos a cepas de campo, para así evaluar la inmunidad generada, esta sería la verdadera prueba de eficacia.

Para concluir, sabemos que hay experiencia práctica de campo en esta temática y ensayos similares que no se han publicado, es poco el material científico generado en el país en esta temática. Con este trabajo esperamos incitar a que se publiquen artículos similares y a que se estudien en mayor

profundidad los mecanismos de respuesta inmune de los bovinos para con los agentes del complejo tristeza parasitaria y cuáles serían los criterios para considerar que un animal está inmunoprotegido.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, D.H., de Echaide, S.T., y Gulielmone, A.A. (1993). Duración prolongada de la inmunidad contra *Babesia Bigemina* en ausencia de reinfección. *Revista de Medicina Veterinaria*, 74(4), 223-225.
- Ahmed, J.S. (2002). The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of piroplasmosis. *Parasitology Research*, 88, 48–50.
- Almeida, M.B., Tortelli, F.P., Riet-Correa, B., Montiel, J.L., Soares, M.P., Farias N.A., y Schild, A. L. (2006). Tristeza parasitaria bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 26, 237-242.
- Amorim, L.S., Wenceslau, A. A., Carvalho, F.S., Carneiro, P.L.S. y Albuquerque, G.R. (2014). Bovine babesiosis and anaplasmosis complex: diagnosis and evaluation of the risk factors. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(3), 328–336.
- Antúnez, P. (2020, agosto 21). MGAP confirmó la producción de terneros que es récord histórico. *El País*. Recuperado de <https://rurales.elpais.com.uy/ganaderia/mgap-confirmando-produccion-de-terneros-que-es-record-historico>
- Aráoz, V. (2019). *Estudio transversal de la garrapata común del bovino (Rhipicephalus microplus) y la tristeza parasitaria bovina en Uruguay*. (Tesis de maestría). UDELAR, Montevideo.
- Barani, M. (2018). *Diagnóstico serológico de Babesia bovis, Babesia bigemina y Anaplasma marginale en establecimientos del departamento de Tacuarembó* (Tesis de grado). UDELAR, Montevideo.
- Bock, R. E, y de Vos, A. J. (2001). Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Australian Veterinary Journal*, 79, 832–839.
- Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., y Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129, 247–269.
- Böse, R., Jorgensen, W.K., Dalgliesh, R. J., Friedhoff, K.T., y de Vos A.J. (1995) . *Current state and future trends in the diagnosis of Babesiosis*. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7597794/>.
- Callow, L. L., McGregor, W., Parker, R. J. y Dalgliesh, R. J. (1974). Immunity of cattle to *Babesia bigemina* following its elimination from the host, with observations on antibody levels detected by the indirect fluorescent antibody test. *Australian Veterinary Journal*, 50, 12–15.
- Carrquiry, R. (2002). Uso de la transfusión de la sangre entera como terapia de apoyo en casos clínicos de Tristeza Parasitaria. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (ed.), *X Congreso Latinoamericano de Buiatría. XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría de Paysandú* (pp. 299-301). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.

- Cipolini, M., Mangold, A., y Jacobo, R. (2004). *Actualización: tristeza bovina, diagnóstico clínico, tratamiento*. Recuperado de [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/parasitarias/Bovinos\\_garrapatas\\_tristeza/30-tristeza\\_bovina.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/Bovinos_garrapatas_tristeza/30-tristeza_bovina.pdf)
- Correa, W.M., Correa, G.N.M., y Gottschalik, A. (1978). Bovine abortion associated with *Anaplasma marginale*. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 42: 227-228.
- Cuore, U. (2006) Resistencia a los acaricidas, manejo y perspectivas. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (ed.), *XXXIV Jornadas de Buiatría Paysandú*. Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/resistencia-acaricidas-manejo-perspectivas>
- Cruz, G. y Saravia, C. (2003). *Influencia del ambiente atmosférico en la adaptación y producción animal*. Recuperado de [http://dedicaciontotal.udelar.edu.uy/adjuntos/produccion/662\\_academicas\\_academicaarchivo.pdf](http://dedicaciontotal.udelar.edu.uy/adjuntos/produccion/662_academicas_academicaarchivo.pdf)
- DIEA (2020). *Anuario estadístico agropecuario*. Recuperado de <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2020/ANUARIO2020.pdf>
- Fiel, C., y Nari, A. (2013). Epidemiología y prevención de los hemoparásitos (babesia y anaplasma) en Uruguay. En *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes* (pp. 665-670). Montevideo: Hemisferio Sur.
- García, D., Álvarez, J., Figueroa, J y Vega, C. (2003). Babesiosis bovina: características relevantes de la respuesta inmune. Recuperado de <https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol9/CVv9c4.pdf>.
- Guglielmone, A.A. (1995). Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*, 57, 109–119.
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F. y Ewing, S. A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 167 (2-4), 95–107.
- IICA (1987). Técnicas para el diagnóstico de Babesiosis y Anaplasmosis bovina. Comité de expertos sobre hematozoarios del área Sur del IICA. San José: IICA.
- Lorenzelli, E., Machi, I., Etchebarne, J. y Salada, D. Utilización de hemovacuna congelada en vacunos adultos asociada a la aplicación de babesicidas. Manuscrito inédito.
- Mastropaolo, M. (2014). *Epidemiología de la babesiosis de los bovinos causada por Babesia bigemina (Smith y Kilborne, 1893) en el sudoeste de la provincia del Chaco* (Tesis). Universidad de la Plata, Argentina.
- Mahoney, D. F. y Mirre, G. B. (1971). Bovine babesiosis: Estimation of infection rate in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 65 (3), 309-317.
- Mahoney, D. F. (1972). Immune responses to hemoprotozoa II. *Babesia spp.* En E.J.L. Soulsby (Ed.), *Immunity to Animal Parasites* (pp.301–341). New York: Academic.
- Mahoney, D.F. y Mirre, G.B. (1979). A note on the transmission of *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*) by the one-host tick, *Boophilus microplus*. *Research in Veterinary Science*, 26, 253–254.

- MGAP. (2020). *Declaración jurada anual de existencias*. Recuperado de <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiZGQxMzRhMTYtMjhhYy00YTc4LTg1NWQ0tNjFkZmE4ODI0YTBlIiwidCI6ImM2OGQ2NjUxLTEwZmEtNDEyZC1hZjc3LWI1MTc3NTYyNzIxZkxZSJ9>
- Miraballes, C., Lara, S., Lorenzelli, E., Lemos, E., y Riet-Correa, F. (2018). Eficacia de dos vacunas, congelada y refrigerada, contra la tristeza parasitaria bovina. *Veterinaria (Uruguay)*. Recuperado de <http://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/80>
- Morilla, A. (1981). Inmunología de la Babesiosis. Recuperado de <https://fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol3/CVv3c09.pdf>.
- Nari, A. Solari, M.A. (1990). Desarrollo y utilización de vacuna contra *Boophilusmicroplus*, babesiosis y anaplasmosis, perspectiva actual en el Uruguay. XVIII Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú. 20p.
- OIE. (2014). Babesiosis bovina. En *Manual terrestre de la OIE 2014* (pp. 1-18). París: OIE.
- Parodi, P., Crbellini, L., y Leotti, V. (2020). *Validation of a multiplex PCR assay to detect Babesia spp. and Anaplasma marginale in cattle in Uruguay in the absence of a gold standard test*. Recuperado de <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1040638720975742>.
- Pita, S. y Pértegas, S. (2013). *Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad*. Recuperado de [http://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas\\_diagnosticas/pruebas\\_diagnosticas.asp](http://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas/pruebas_diagnosticas.asp)
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., y Hinchcliff, K.W. (2002). Enfermedades asociadas con protozoarios. En *Medicina veterinaria: tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino* (9ª ed., pp. 1495-1501). Madrid: McGraw-Hill.
- Shimada, M.K., Yamamura, M.H., Kawasaki, P.M., Tamekuni, K., Igarashi, M., Vidotto, O., y Vidotto, M.C. (2004). Detection of *Anaplasma marginale* DNA in Larvae of *Boophilusmicroplus* ticks by Polymerase Chain Reaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026, 95-102.
- Solari, M.A. y Quintana, S. (1994), Epidemiología y prevención de los hemoparásitos (Babesia y Anaplasma) en el Uruguay. En A. Nari y C. Fiel (Coord.), *Enfermedades de importancia económica en Bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control*. (pp. 498-504). Montevideo: Hemisferio Sur.
- Solari, M. (2006). Epidemiología y perspectivas en el control de hemoparásitos. En Centro Médico Veterinario de Paysandú, *Jornadas de Buiatría XXXIV*. Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.
- Solari, M.A., Dutra, F. y Quintana, S. (2013). Epidemiología y prevención de los hemoparásitos (Babesia y Anaplasma) en el Uruguay. En C. Fiel, A. Nari (Coord.), *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes* (pp. 657-688). Montevideo: Hemisferio Sur.
- Suarez, C.E., y Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 180, 109-125.
- Suarez, C. E., Palmer, C. H., Jasmer, D. P., Hines, S. A., Perryman, L. E., y McElwain, T. F. (1991). Characterization of the gene encoding a 60- kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 46, 45-52.

- Swift, B.L, Settlemire, J., y Thomas, G.M. (1978). Inoculation of pregnant heifers at mid gestation with *Anaplasma marginale*. *Theriogenology*, 10, 481-485.
- Tizard, I. (2009). *Introducción a la inmunología veterinaria* (8ª ed.). Barcelona: Elsevier.
- Vally, T. y Gentry, P.A. (2007). Hematopoietic system. En M. Grant Maxie, *Jubb, Kennedy and Palmer's. Pathology of domestic animals* (5ª ed., Vol. 3, pp. 239-247). Edinburgh: Saunders.
- Vanzini, V.R., y Ramirez, L.V., (1994). Babesiosis y anaplasmosis bovina, diagnóstico, epidemiología y control. *RIA*, 25(3): 137-190. Recuperado de [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_babesiosis\\_y\\_anaplasmosis\\_bovina.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_babesiosis_y_anaplasmosis_bovina.pdf)
- Vizcarra, J.A., Ibáñez, W., y Orcasberro, R. (1986). Repetibilidad y reproductibilidad de dos escalas para estimar la condición corporal en vacas Hereford. *Investigaciones Agronómicas*, 7, 45-47.
- Zimmer, P. (2013). Vacunas para babesiosis y anaplasmosis (tristeza). Instituto nacional de tecnología agropecuario. *INTA Noticias y Comentarios*, 504. Recuperado de [https://inta.gob.ar/sites/default/files/scripttmpinta\\_vacuna\\_babesiosis\\_y\\_anaplasmosis\\_not\\_y\\_com\\_504.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/scripttmpinta_vacuna_babesiosis_y_anaplasmosis_not_y_com_504.pdf)