



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**ABORDAJE MULTIFACTORIAL AL DIAGNÓSTICO DE TRISTEZA  
PARASITARIA BOVINA EN EL URUGUAY**

**PABLO ANDRÉS PARODI THEXEIRA**

**TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL**

**URUGUAY  
2019**



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**ABORDAJE MULTIFACTORIAL AL DIAGNÓSTICO DE TRISTEZA  
PARASITARIA BOVINA EN EL URUGUAY**

**PABLO ANDRÉS PARODI THEXEIRA**

---

PhD María Teresa Armúa  
**Directora de Tesis**

---

MSc Rodolfo Rivero  
**Co-director**

---

PhD José M. Venzal  
**Co-director**

2019

## **INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS**

**Franklin Riet Correa; DMV, MSc., PhD. (Presidente)**

Plataforma de Salud Animal, INIA  
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria – Uruguay

**Andrés D. Gil; DMV, MSc., PhD.**

Facultad de Veterinaria.  
Universidad de la República – Uruguay.

**María Silvia Llambi; DMV, MSc, PhD**

Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República – Uruguay.



**FACULTAD DE VETERINARIA  
Programa de Posgrados**

**ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS  
DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL**

**Abordaje multifactorial del diagnóstico de tristeza parasitaria  
bovina en el litoral noroeste del Uruguay**

**Por: Dr. Pablo Andrés PARODI THEXEIRA**

**Directora de Tesis: Dra. Teresa Armúa**

**Codirectores de Tesis: Dr. Rodolfo Rivero  
Dr. José M. Venzal**

**Tribunal**

**Presidente: Dr. Franklin Riet-Correa**

**Segundo Miembro: Dr. Andrés Gil**

**Tercer Miembro: Dra. Silvia Llambí**

**Fallo del Tribunal: APROBADO**

**Anfiteatro de Anatomía  
Martes 12 de marzo de 2019**

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)



*La realización de la presente tesis de maestría fue posible gracias a:*

**Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA)  
Plataforma de Salud Animal**

*Beca de posgrado, dentro del marco del proyecto ``Determinación de la situación actual de la garrapata Rhipicephalus microplus y tristeza parasitaria y control integrado de ambas enfermedades``.*



**Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca (MGAP)**



**División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE- Paysandú)**



**Facultad de Veterinaria - Cenur Litoral Norte  
Laboratorio de vectores y enfermedades transmitidas**



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiere expresar gratitud a mis tutores: Teresa Armúa, Rodolfo Rivero y José Venzal, por su constante apoyo, consejos, enseñanzas y principalmente mostrarme el camino de la investigación.

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Plataforma de Salud Animal por el apoyo financiero al proyecto de investigación y a mi formación académica proporcionándome la beca para poder realizar la Maestría en Salud Animal.

A la DILAVE Regional Noroeste, Paysandú del MGAP, por permitirme desarrollar el presente trabajo de investigación, por brindarme materiales y equipamiento necesarios.

A todos mis compañeros y amigos de DILAVE, Paysandú, Rodolfo, Edgardo, Adriana, Carolina, Marcelo, Rosina, Víctor, Marcos, Florencia, Ana, Lucía, por el compañerismo, amistad y apoyo en las diferentes actividades que involucraron el presente trabajo. Muchas gracias por el estímulo permanente y por hacerme sentir como en casa.

Al Laboratorio de Vectores y Enfermedades Transmitidas por el soporte institucional prestado para el desarrollo de este trabajo de maestría y a mis compañeros María Laura Félix y Valentín Bazzano.

A todos mis compañeros de la Plataforma de Salud Animal, Franklin Riet Correa Cecilia Miraballes, Tatiana Saporiti, Virginia Araos.

Al Doctor Joaquín Slavica, por la ayuda con el envío de muestras para este estudio

A la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, por permitirme continuar mi formación profesional y desarrollar mis estudios de posgrado.

A los Veterinarios particulares y productores de los diferentes establecimientos agropecuarios, por brindarme su apoyo técnico y abrirnos las de sus establecimientos.

A Doctor Luis Gustavo Corbellini por su gran ayuda en análisis de datos e interpretación de resultados y por la enseñanza brindada en aspectos epidemiológicos.

A Anderson Saravia, por su constante ayuda en diferentes momentos del trabajo y una gran persona que conocí realizando este trabajo.

A la Doctora María Angélica Solari y al Departamento de Parasitología de la DILAVE Miguel C Rubino, por su apoyo y por su importante colaboración en el envío de muestras control para el desarrollo de la PCRm.

A mi familia, por estar siempre presente y apoyarme en los diferentes proyectos de vida, especialmente a mi madre y mi hermana por su amor incondicional.

A Leticia mi compañera de la vida, por su apoyo, paciencia y compañerismo en esta etapa.

# ÍNDICE

Página

LISTA DE CUADROS, IMÁGENES Y FIGURAS .....	vi
RESUMEN.....	viii
SUMMARY .....	ix
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Historia de los hemoparásitos de la tristeza parasitaria bovina.....	1
1.2 Etiología de la tristeza parasitaria bovina .....	1
1.3 Ciclos de vida y patogenia de los hemoparásitos de la TPB.....	2
1.3.1 <i>Babesia</i> spp. ....	2
1.3.2 <i>Anaplasma marginale</i> .....	3
1.4 Signos clínicos .....	3
1.4 Hallazgos de necropsia.....	4
1.5 Epidemiología de la tristeza parasitaria .....	4
1.5.1 Vías de transmisión .....	4
1.5.2 Factores de riesgo.....	5
1.5.2.1 Relacionados con el animal.....	6
1.5.2.2 Relacionados con el ambiente y manejo .....	6
1.6 Tratamiento y prevención .....	7
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS .....	7
2.1 Diagnóstico.....	7
2.1.1 Diagnóstico directo .....	7
2.1.1.1 Frotis .....	8
2.1.1.3 Biología molecular .....	9
2.1.2 Diagnóstico indirecto .....	10
2.1.2.2 ELISA .....	10
2.1.2.3 Inmunofluorecencia indirecta.....	10
2.1.2.4 Aglutinación en tarjeta .....	10
2.2 Microhematocrito.....	11
2.3 Diagnóstico de TPB en Uruguay y en la región.....	11
2.4 Normativas nacionales .....	11
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	12
4. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN .....	12
5. PARTE I: DESARROLLO Y PUESTA A PUNTO DE UNA PCR MULTIPLEX PARA EL DIAGNÓSTICO DE TRISTEZA PARASITARIA BOVINA .....	12
5.1 HIPÓTESIS .....	12
5.2 OBJETIVOS .....	13
5.2.1 Desarrollar y poner a punto una PCRm para el diagnóstico de TPB. ....	13
5.2.2 Comparar sensibilidad y especificidad entre las técnicas de diagnóstico (PCRm vs frotis) .....	13
5.3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
5.3.1 Tipo de muestreo y muestras procesadas .....	13
5.3.2 Procesamiento de muestras .....	13
5.3.3 Desarrollo PCRm para el diagnóstico de TPB .....	13
5.3.3.2 Puesta a punto de la PCRm .....	15
5.3.3.4 Límite de detección (LD) en sangre de la PCRm .....	15
5.3.3.5 Robustez de la PCRm.....	16
5.3.4 Cálculo de sensibilidad y especificidad e Índice de Kappa de Cohen del frotis y la PCRm.....	16
5.3.5 Análisis estadístico.....	17

5.4 RESULTADOS .....	17
5.4.1 Descripción de los brotes estudiados .....	17
5.4.2 Diagnóstico por frotis.....	17
5.4.3 Análisis del microhematocrito .....	18
5.4.5 Puesta a punto PCRm.....	19
5.4.6 Secuenciación.....	20
5.4.7 Diagnóstico por PCRm .....	20
5.4.8 Límite de detección (LD) de la PCRm para sangre .....	20
5.4.9 Robustez de la PCRm para TPB .....	21
5.4.10 Sensibilidad y especificidad diagnóstica de las técnicas e Índice de Kappa de Cohen. ....	21
6. PARTE II: ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LOS BROTES DE TPB .....	22
6.1 HIPÓTESIS .....	22
6.2 OBJETIVOS.....	22
6.2.1 Estudiar la frecuencia de brotes de TPB por agente. ....	22
6.2.2 Establecer estacionalidad de los brotes y lugares de ocurrencia.....	22
6.2.3 Establecer prevalencia y frecuencia de categoría animal afectada y reportar valores de morbilidad/mortalidad/letalidad.....	22
6.2.4. Evaluar asociación estadísticas en base a los signos clínicos/hallazgos de necropsia con TPB y factores de riesgo (garrapatas/inyectables).....	22
6.2.5. Describir los diagnósticos diferenciales para TPB en la región noroeste del Uruguay.....	22
6.3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
6.3.1 Estudio descriptivo de los brotes en base al muestreo realizado en la.....	22
Parte I.....	22
6.3.1.1 Localización y dinámica estacional de los brotes .....	23
6.3.1.2 Categorías afectadas, morbilidad, mortalidad y letalidad .....	23
6.3.1.2 Signos clínicos, hallazgos de necropsia y asociaciones de riesgo .....	23
6.3.2 Análisis estadístico.....	23
6.4. RESULTADOS .....	24
6.4.1 Estudio descriptivo de los brotes de TBP .....	24
6.4.2 Lugares de presentación de los brotes de TPB y curvas epidémicas .....	24
6.4.3 Categorías afectadas.....	26
6.4.4 Indicadores epidemiológicos.....	27
6.4.5 Tasas epidemiológicas .....	27
6.4.6 Signos clínicos y hallazgos de necropsia .....	29
6.4.7 Asociación de riesgo .....	30
7. DISCUSIÓN .....	30
8. CONCLUSIONES .....	34
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
10. ANEXOS .....	43
Anexo I. Planilla de ingreso de muestras y datos epidemiológicos .....	43
Anexo II. Planilla de síntomas clínicos.....	43
Anexo III. Planilla de hallazgos de necropsia.....	44
Anexo IV. Límite de detección PCRm. ....	44
Anexo V. Distribución de brotes de TPB según agente.....	48

## LISTA DE CUADROS, IMÁGENES Y FIGURAS

- Cuadro I** Se indican los nombres, secuencias y tamaños de los amplicones generados con cada set de primers
- Cuadro II.** Tabla las medias de porcentajes de microhematocrito, error estándar y la correlación entre el factor y el agente.
- Cuadro III.** Cuadro de diagnósticos por técnicas.
- Cuadro IV.** Frecuencias relativas de los brotes por cada agente de TPB
- Cuadro V.** Frecuencia relativa categoría animal afectadas por agente de TPB
- Cuadro VI.** Indicadores epidemiológicos según agente de TPB expresados en porcentajes
- Cuadro VII.** Tasas de morbilidad
- Cuadro VIII.** Tasas de mortalidad
- Cuadro IX.** Tasas de letalidad
- Cuadro X.** Asociación de síntomas clínicos con resultados positivos de diagnóstico de TPB
- Cuadro XI.** Asociación de hallazgos de necropsia con resultados positivos de diagnóstico de TPB
- Cuadro XII.** Asociación de riesgo
- 
- Figura 1** Representación esquemática de la dispersión generacional de la garrapata *R. microplus* en Uruguay (Fuente: Fiel y Nari, 2013).
- Figura 2.** Frotis de sangre, coloreado con Giemsa y visualizado con objetivo inmersión 100X. Formas parasitarias intraeritrocitarias: A) *B. bovis*. B) *B. bigemina*.
- Figura 3.** Frotis de sangre, coloreado con Giemsa y visualizados con objetivo inmersión 100X. Formas parasitarias intraeritrocitarias de *A. marginale*
- Figura 4.** Frotis de sangre y órganos coloreados con Giemsa prontos para su lectura
- Figura 5.** Frotis de sangre coloreados con Giemsa, visualizados con objetivo de inmersión 100X.
- Figura 6.** Corrida electroforética (agar 1, 5%) mostrando las bandas de 500 pb (Familia Babesiidae) y 345 pb (Familia Anaplasmataceae)
- Figura 7.** Corrida electroforética de PCRM en agar 1,5%
- Figura 8.** Ruta diagnóstica según resultados e interpretación de las técnicas.

**Figura 9** Se indica en el mapa de Uruguay las seccionales policiales con escala de colores según número de brotes diagnosticados.

**Figura 10.** Se representan las curvas epidémicas en relación a los brotes negativos (cuadros rojos) y brotes positivos (cuadros azules).

## RESUMEN

La tristeza parasitaria bovina (TPB) es un complejo de enfermedades que causa importantes pérdidas económicas en la ganadería de nuestro país. Este complejo está compuesto por dos enfermedades, una es la babesiosis, causada por dos protozoarios, *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, y la otra enfermedad, anaplasmosis cuyo agente es una rickettsia, *Anaplasma marginale*. Ambos agentes invaden los eritrocitos causando su destrucción, provocando anemia y desórdenes vasculares que conllevan a la muerte. En Uruguay, el diagnóstico en animales enfermos se realiza por visualización de frotis, pero ésta tiene limitantes en su sensibilidad. El primer objetivo del presente estudio fue fortalecer el diagnóstico de los brotes de TPB, desarrollando e implementando una prueba de la reacción en cadena de la polimerasa multiplex a tiempo final (PCRm). El segundo objetivo se basó en el estudio descriptivo de los brotes de TPB. Se realizó un muestreo de conveniencia con muestras provenientes de rodeos con signos compatibles a TPB, las cuales fueron remitidas por veterinarios de libre ejercicio al Laboratorio DILAVE-MGAP, Paysandú. Se obtuvieron muestras de 152 brotes presuntivos a TPB, pertenecientes a 10 departamentos del Uruguay. Se trabajó con 375 animales de los cuales se extrajeron: 340 muestras de sangre y 127 órganos entre ellos bazo, corazón, hígado, riñón y sistema nervioso central. Por cada brote, se recolectó información epidemiológica (lugar, fecha de ocurrencia, categoría, número de animales enfermos y muertos), signos clínicos, hallazgos de necropsia, presencia de garrapatas y manejos sanitarios que involucraron inyectables. El diagnóstico fue abordado de forma multifactorial, tomando aspectos epidemiológicos, clínicos, hallazgos de necropsia y técnicas de laboratorio. Se realizó frotis coloreados con Giemsa y análisis de microhematocrito. Así mismo, se desarrolló una PCR multiplex (PCRm) para la detección de los tres agentes. Se estableció para esta nueva PCRm: límite de detección y robustez (congelación y autólisis de las muestras). La sensibilidad y especificidad fue calculada para ambas técnicas (frotis: 73%, 98% y PCRm: 99%, 72.3%). El 63% (96/152) de los brotes fueron positivos a los agentes de TPB, siendo 43% *A. marginale*, 22% *Babesia bovis*, 22% *B. bigemina* y 13% infecciones mixtas. Se establecieron los indicadores de morbilidad, mortalidad y letalidad. Se realizaron 340 análisis de microhematocrito, siendo 136 positivos (frotis y PCRm) a al menos un agente, obteniendo porcentajes de anemia inferiores a 26%. La categoría más afectada fue la vaca. Los signos clínicos con una asociación significativa fueron: anemia, mucosas pálidas, emaciación, fiebre, ictericia, ataxia y agresividad. Mientras que los hallazgos de necropsia con una asociación significativa: esplenomegalia, anemia, ictericia, hígado de color anaranjado. La curva epidemiológica de los agentes de la TPB, estableció una clara estacionalidad en los brotes de babesiosis en los meses de verano y principalmente, en otoño, siendo la presencia de *Rhipicephalus microplus* el factor de riesgo principal para la presentación de babesiosis. Para anaplasmosis, se registraron casos a lo largo de todo el año, siendo la utilización de inyectables la causa más probable de transmisión de *A. marginale*. Para concluir, las pruebas diagnósticas reflejaron poseer diferentes ventajas y limitaciones. Por lo cual, se considera que el frotis y PCRm deberían ser utilizadas conjuntamente en Uruguay, tanto con fines diagnósticos, como en investigaciones epidemiológicas.

## SUMMARY

Tick-borne diseases (TBD) is a complex of diseases that causes significant economic losses in the livestock of our country. Two diseases compose this complex; one is babesiosis, caused by two protozoans, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*, and the other disease, anaplasmosis whose agent is a rickettsia, *Anaplasma marginale*. Both agents invade the erythrocytes causing cellular destruction, anemia and vascular disorders that lead to death. In Uruguay, sick animals' diagnosis is carried out through smear visualization, however, this method has sensitivity limitations. The first objective of the present study was to improve the diagnosis of TBD outbreaks, by developing and implementing a multiplex polymerase chain reaction (mPCR). The second objective was focused on the descriptive study of TBD outbreaks. A convenience sampling was carried out with samples from herds with clinical signs compatible with TBD, which were sent by practitioner veterinarians to the DILAVE-MGAP Laboratory, Paysandú. Samples were obtained from 152 presumptive outbreaks of TBD, coming from 10 departments of Uruguay. From a total of 375 animals: 340 blood samples and 127 organs including spleen, heart, liver, kidney and central nervous system were used. For each outbreak, epidemiological information was collected (place, date of occurrence, category, number of sick and dead animals), clinical signs, necropsy findings, presence of ticks and sanitary management involving injectables. The diagnosis was approached taking into account multifactorially epidemiological, clinical, necropsy findings and laboratory techniques. The laboratory diagnosis was based on smears stained with Giemsa and microhematocrit analysis. Likewise, a multiplex PCR was developed for the detection of each agent. The detection limit and robustness (freezing and autolysis of the samples) was established for this new mPCR. Sensitivity and specificity were calculated for both techniques (smear: 73%, 98% and mPCR: 99%, 72.3%). The 63% (96/152) of the outbreaks were positive for TBD agents, where 43%, 22%, 22% and 13% were *A. marginale*, *B. bovis*, *B. bigemina* and mixed infections, respectively. Morbidity, mortality and lethality indicators were established. Microhematocrit analyzes of 340 samples were performed, with 136 positives (smear and mPCR) to at least one agent, obtaining percentages of anemia lower than 26%. The category most affected was the cow. The clinical signs with a significant association were anemia, pale mucous membranes, emaciation, fever, jaundice, ataxia and aggressiveness. Meanwhile, the necropsy findings with a significant association were splenomegaly, anemia, jaundice, orange-colored liver. The epidemiological curve of the TBD agents established a clear seasonality in the outbreaks of babesiosis during summer and mainly, in autumn, being the presence of *Rhipicephalus microplus* the main risk factor for the presentation of babesiosis. For anaplasmosis, cases were recorded throughout the year, with the use of injectables being the most likely cause of *A. marginale* transmission. To conclude, the diagnostic tests showed to have different advantages and limitations. Therefore, it is considered that smear and mPCR should be used together in Uruguay, both, for diagnostic purposes and epidemiological researchs.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Historia de los hemoparásitos de la tristeza parasitaria bovina

Las enfermedades hemoparasitarias en bovinos se conocen desde el siglo XIX. Un trabajo publicado por Babes (1888) en Rumania, reportó la enfermedad de hemoglobinuria bacteriana bovina provocada por un microorganismo, *Haematococcus bovis*, que parasitaba los eritrocitos. Posteriormente, dicho organismo pasó a llamarse *Babesia bovis* (Todorovic, 1974; Angus, 1996). Esta era una importante enfermedad parasitaria que provocaba pérdidas económicas graves. Investigaciones posteriores realizadas por Smith y Kilborne en 1893, en los Estados Unidos de América, demostraron el organismo causal de “Texas fever” (babesiosis), quienes lo llamaron *Phyrosoma bigeminum* (denominada actualmente *Babesia bigemina*). Estos investigadores fueron los primeros en demostrar la transmisión de esta enfermedad por artrópodos (*Boophilus annulatus*) a los bovinos (Smith y Kilborne, 1893). En trabajos posteriores, se reportaron varios casos de babesiosis en el resto del mundo. En Australia, la enfermedad llamada “Red Water” fue reconocida como una etiología idéntica a “Texas fever” por el Dr. Sidney Hunt (Angus, 1996). Mientras que en Argentina, la enfermedad fue reportada por Lignieres (1903), quien describió dos formas de tristeza, la forma A y la forma C, causados por *Babesia bigemina* y *Babesia argentina* (= *Babesia bovis*), respectivamente.

Por otro lado, el género *Anaplasma*, fue reportado por Sir Arnold Theiler en 1910, quien fue el primero en reconocer un punto marginal dentro de los eritrocitos de los bovinos enfermos, causantes de una enfermedad específica, distintos morfológicamente de *Babesia* spp., pero que podían co-existir en el mismo animal (Theiler, 1910; 1911). Desde estos años en adelante, fue reconocido en regiones tropicales, subtropicales y en algunas zonas templadas del viejo mundo, aunque muchas veces era confundido con la enfermedad de “Texas fever” (Kocan y cols., 2010). Tanto *Babesia* spp. como *Anaplasma* spp., han sido estudiados en su morfología, epidemiología, patogenia, diagnóstico, entre otras áreas, ya que son considerados parásitos responsables de grandes impactos económicos en la producción ganadera mundial (Suarez y Noh, 2011).

En Uruguay, la historia comienza desde la década de 1930, donde se realizaron los primeros estudios relacionados a garrapata y tristeza parasitaria, dándole importancia a la babesiosis y anaplasmosis (Rubino, 1964). Los primeros en reportar a *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* como causantes de la enfermedad en los bovinos en Uruguay fueron Castro y Trenchi (1955) indicando que estos provocaban importantes pérdidas económicas (Solari y cols., 2013).

### 1.2 Etiología de la tristeza parasitaria bovina

Se le llama tristeza parasitaria bovina (TPB) al complejo febril y anemizante, causado por dos enfermedades bien conocidas: babesiosis y anaplasmosis (Almeida y cols., 2006).

La babesiosis bovina también llamada “Texas fever”, “Fiebre del agua roja”, o “Fiebre bovina transmitida por la garrapata”, en Uruguay es causada por dos hemoparásitos, *B. bovis* y *B. bigemina*. Estos son protozoarios del phylum Apicomplexa, orden Piroplasmida, familia Babesiidae, género *Babesia*. Están divididos morfológicamente en dos grupos, los pequeños (1–2,5 µm de longitud) con formas de anillos vacuolados, en el cual se encuentra *B. bovis* y los grandes (4–5 µm

de longitud) con formas ovales o irregulares, la cual incluye a *B. bigemina* (Laha y cols., 2015). Son transmitidos por garrapatas, y en esta región la única que tiene la capacidad vectorial es *Rhipicephalus microplus* (Bock y cols., 2004). La babesiosis afecta especialmente al ganado bovino, que es el principal reservorio. También el búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) y al búfalo africano (*Syncerus caffer*) pueden ser infectados. Recientemente, se diagnosticó *B. bovis* y *B. bigemina* en el venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en México (CFSPH, 2008). Esta enfermedad está ampliamente distribuida a nivel mundial y es de gran importancia en África, Asia, Australia, Centroamérica y Sudamérica (OIE, 2014).

La anaplasmosis bovina es provocada por una rickettsia, *A. marginale* que pertenece al phylum Proteobacteria, orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae, género *Anaplasma* (Dumler y cols., 2001). Son microorganismos intracelulares obligados, cuya morfología se observa como pequeñas estructuras pleomorfas dentro de los eritrocitos. Las vías de transmisión son mucho más amplias implicando: garrapatas, dípteros hematófagos o de forma mecánica con algún fómite contaminado con sangre (Shimada y cols., 2004).

La anaplasmosis clínica ocurre mayormente en bovinos, pero otros rumiantes, incluido el búfalo de agua (*B. bubalis*), Bisonte americano (*Bison bison*), venado cola blanca (*O. virginianus*), ciervo mula (*Odocoileus hemionus hemionus*), venado cola negra (*Odocoileus hemionus columbianus*) y alces de las Montañas Rocosas (*Cervus elaphus nelsoni*) pueden ser infectados. Rumiantes salvajes, especialmente los ciervos y alces pueden estar vinculados en la epizootiología de la anaplasmosis bovina en algunas regiones del mundo (Zaugg y cols.1996; Sevilla y cols., 2002; Kocan y cols., 2010). Esta enfermedad se presenta en la mayoría de los países tropicales y subtropicales, y en algunas regiones más templadas (OIE, 2015).

### **1.3 Ciclos de vida y patogenia de los hemoparásitos de la TPB**

#### **1.3.1 Babesia spp.**

El ciclo parasitario de *B. bovis* y *B. bigemina*, está representado por tres fases: merogonia, gametogonia y esporogonia. El ciclo en el bovino comienza cuando los esporozoitos son inoculados junto a la saliva de la garrapata cuando esta se alimenta. Ya en la sangre, invaden los eritrocitos y dentro de estos, se produce la reproducción asexual por fisión binaria, convirtiéndose en merozoitos que invaden nuevos eritrocitos. En la siguiente etapa se transforman en trofozoitos dividiéndose nuevamente por fisión binaria, terminando la etapa de merogonia. El periodo prepatente es de 6 y 8 días para *B. bovis* y 14 a 15 días *B. bigemina* (Bock y cols., 2004). La reproducción sexual ocurre dentro de la garrapata, en el cual los trofozoitos se convierten en gametocitos que son ingeridos por las garrapatas al alimentarse. Los cigotos invaden las células digestivas dividiéndose por meiosis, luego entran en la hemolinfa y hemocele de las garrapatas invadiendo los ovarios para la penetración en los huevos. Una vez eclosionada la larva, los esporozoitos entran en las células de las glándulas salivales de la garrapata, replicándose asexualmente (esporogonia) quedando a la espera de su próximo hospedero. La larva infectada se fija al vacuno y en 24 a 72 horas se reactiva *B. bovis* y se transmite la infección. Para *B. bigemina*, esto sucede después de alcanzar la etapa de ninfa (Mahoney y Mirre, 1971; Mosqueda y cols., 2002 a, b; Yokayama y cols., 2006; Suarez y Noh, 2011).

La patogenia de la babesiosis es típica de una anemia hemolítica intravascular con característica macrocítica, hipocrómica, complicada con desórdenes vasculares y falla circulatoria (Vally y Gentry, 2007). La hemólisis que causa *B. bigemina* es más rápida que la provocada por *B. bovis*, dando lugar a una intensa anemia, ictericia y hemoglobinuria. Sustancias farmacológicamente activas son liberadas por la *B. bovis* que activan el sistema caliceína-cinina y el complemento, provocando hipotensión, vasodilatación y aumento de la permeabilidad endotelial, estos desórdenes vasculares no son tan frecuentes en *B. bigemina* (Suarez y Noh, 2011). Por intermedio de la expresión de los derivados antigénicos de la membrana celular de los eritrocitos parasitados por *B. bovis*, adquieren la capacidad de evitar el clearance esplénico, adhiriéndose a los endotelios de la microcirculación periférica. Esta capacidad le permite generar trastornos especialmente en el sistema nervioso y tener la capacidad de sobrevivir en el huésped por varios años evitando el sistema fagocítico-mononuclear (Callow y McGavin, 1963, Barros y cols. 2006; Suarez y Noh, 2011). Los brotes causados por *B. bigemina* suelen ser menos graves que los provocados por *B. bovis*, y no causan afecciones cerebrales (Bock y cols., 2004)

### **1.3.2 *Anaplasma marginale***

El ciclo de vida *A. marginale*, es sencillo ya que únicamente parasita eritrocitos maduros de los bovinos a través de procesos endocíticos. Se reproduce mediante fisión binaria y dentro de los eritrocitos se forma una inclusión ligada a la membrana o también llamada cuerpos iniciales, que contienen entre 4 a 8 rickettsias. Estos salen de las células mediante exocitosis e infectan otros eritrocitos (Kocan y cols., 2010). A partir de este momento, comienzan a multiplicarse exponencialmente por fisión binaria, parasitando nuevos eritrocitos, y en su etapa aguda pueden llegar a parasitar hasta el 70% de los mismos (Ristic, 1977; Richey, 1981). Tienen un periodo prepatente o de incubación que varía entre 7 a 60 días, según el grado de infección inicial, teniendo un promedio de 28 días. La transmisión de animal a animal ocurre por vectores animados (artrópodos hematófagos) o inanimados (fómites) llevando eritrocitos infectados. Cabe destacar también, que los animales portadores de por vida tienen una gran relevancia en la perpetuación de la enfermedad (Suarez y Noh, 2011). Para que se manifieste la enfermedad al menos el 15% de los eritrocitos deben estar infectados. Los eritrocitos parasitados son eliminados mediante fagocitosis por el sistema reticuloendotelial, destruidos principalmente en bazo o hígado. Esto causa una hemólisis extravascular, cuyo resultado fundamentalmente es anemia de grado variable, dependiente de la proporción de eritrocitos infectados. Estos procesos liberan sustancias inflamatorias y con la consiguiente aparición de fiebre (Radostits y cols., 2002).

### **1.4 Signos clínicos**

Los signos clínicos de ambas enfermedades son semejantes, y es por esto que son llamados complejo de tristeza parasitaria bovina. Son enfermedades de alta letalidad. Afectan principalmente animales adultos y con menos severidad a terneros pudiendo ser leve o subclínica en ésta categoría (Amorim y cols., 2014). Los principales signos clínicos son depresión marcada y fiebre elevada, 40,5°C. Por la ruptura de los eritrocitos se produce anemia y abatimiento que pueden terminar en la muerte del animal. En el caso particular de babesiosis, esta provoca vasodilatación, hipotensión, incremento en la permeabilidad capilar, edema, colapso vascular, desórdenes en la coagulación, daños en los endotelios capilares y estasis circulatorio (Wright y cols. 1989; Ahmed, 2002). Es por estos desórdenes que *Babesia bovis* produce lesiones en

capilares del cerebro dando signos nerviosos como agresividad e incoordinación (Bock y cols., 2004). Unas de las diferencias clínicas entre anaplasmosis y babesiosis, es que esta última, por el tipo de hemólisis intravascular provoca hemoglobinuria. Todos estos trastornos provocan disminución en la producción de carne y leche. Sumado a la merma en los índices reproductivos de los rodeos por abortos y retrasos en la concepción (Correa y cols., 1978; Swift y cols., 1978).

#### **1.4 Hallazgos de necropsia**

La apertura de los cadáveres y observación de las alteraciones macroscópicas orientan mucho al diagnóstico. Las carcasas pueden estar pálidas, con ictericia severa y la sangre acuosa. El hígado de coloración amarillenta, con un patrón lobular o “nuez moscada”, como así también, congestión y edema a nivel pulmonar, petequias o hemorragias en el subendocardio (Barros y cols., 2006).

Como característica general, el bazo se presenta agrandado de tamaño, con 3 cm o más de espesor y de coloración oscura, que al corte puede exudar sangre. La esplenomegalia es distintiva en ambas enfermedades, ya que, en babesiosis el bazo toma una consistencia barrosa, mientras que en la anaplasmosis es firme, compacto, y con hiperplasia marcada de los corpúsculos de Malpighi (Rodríguez y cols., 2005; Coetzee y cols., 2005).

Los riñones pueden estar hinchados. Particularmente, en los casos de babesiosis tienen una coloración oscura, con nefrosis por la anoxia, mientras que en los casos de anaplasmosis no se observan esta alteración (Barros y cols., 2006; Fry y McGavin, 2007; Suarez y Noh, 2011).

Las lesiones encefálicas difieren según la enfermedad actuante. En el caso de babesiosis nerviosa (*B. bovis*), son muy llamativas, observando en general un encéfalo de color cereza y al corte se puede apreciar la sustancia gris de color rojizo contrastando la sustancia blanca (Silva y cols., 2018). Por otro lado, debido a la intensa anemia provocada por la anaplasmosis, en general, se ve el encéfalo más pálido que en las babesiosis, así como también, la musculatura esquelética y el corazón (Kocan y cols., 2010).

#### **1.5 Epidemiología de la tristeza parasitaria**

Para comprender la epidemiología de la tristeza parasitaria bovina en el Uruguay, se debe tener en cuenta el trinomio involucrado en el desarrollo de este complejo de enfermedades: vectores-hemoparásitos-bovino. De esta manera, se pueden enumerar algunos de los factores con mayor influencia como por ejemplo: la dinámica poblacional de *Rhipicephalus microplus*; el clima, los manejos sanitarios que involucren la transmisión de forma iatrogénica (en el caso particular de *A. marginale*) así como; la presencia de animales crónicos (portadores) y la situación inmunológica de los bovinos (Solari y cols., 2013).

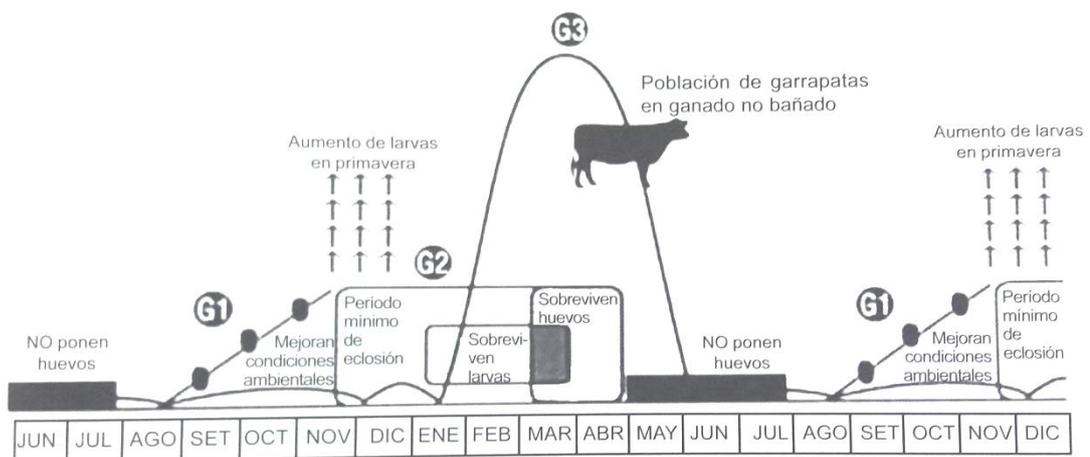
##### **1.5.1 Vías de transmisión**

El único vector biológico en la región para las dos especies de babésidos es la garrapata *R. microplus* (Bock y col., 2004). La presencia de esta garrapata es un factor crucial para la propagación de estos protozoarios ya que deben completar su

ciclo biológico dentro de esta. Cabe destacar que los babésidos son transmitidos transováricamente de la teleogina a su progenie, perpetuándose así entre generaciones de garrapatas (Solari y cols., 2013).

La epidemiología de *R. microplus* en Uruguay es altamente dependiente del clima, de las características geológicas e hídricas de los suelos, sumado a la presencia de montes naturales y los tipos de sistemas de producción. Tanto el norte como el sur del país no son lo suficientemente distantes geográficamente como para observar diferencias en la vida de estos ectoparásitos (Fiel y Nari, 2013).

Por lo tanto, se comprobó que en Uruguay se presentan de 1,5 a 3,5 generaciones de garrapata al año (Figura 1) y con una viabilidad máxima fuera del huésped entre 8 a 10 meses (Nari y cols., 1979; Cardozo y cols., 1984; Sanchis y cols., 2008). La mayor carga de garrapatas se presenta en la tercera generación, entre los meses de enero y mayo, coincidiendo esto con los brotes de hemoparásitos que se presentan principalmente en los meses de Otoño (Solari y cols., 2013).



**Figura 1** Representación esquemática de la dispersión generacional de la garrapata *R. microplus* en Uruguay (Fuente: Fiel y Nari, 2013).

Para *A. marginale* los vectores involucrados en la transmisión son dípteros hematófagos como tábanos, moscas (*Stomoxys calcitrans*) y en el caso de *R. microplus* los machos pueden jugar un rol en la transmisión. Dentro de *R. microplus*, *A. marginale* tiene la capacidad de permanecer entre los estadios dentro de las glándulas salivales de forma infectiva (Kocan y cols., 2010). Otras formas de transmisión son las mecánicas (vectores inanimados) por transfusiones de sangre, cirugías colectivas (descornes, castraciones) y vacunaciones. También, se ha comprobado la transmisión materno-fetal tanto en portadores agudos como crónicos (Guglielmone, 1995; Shimada y cols., 2004; Solari y cols., 2013).

Tanto para los casos de babesiosis como de anaplasmosis, aquellos animales que se hayan recuperado de un estado agudo de la enfermedad pueden quedar como portadores, o persistentemente infectados de por vida, siendo estos una fuente de infección continua (Suarez y Noh, 2011).

### 1.5.2 Factores de riesgo

### 1.5.2.1 Relacionados con el animal

Entre los factores de riesgo individuales, se encuentran la diferencia de susceptibilidad o resistencia de cada animal, de razas y categorías. Los bovinos de razas índicas (*Bos indicus*), demuestran tener mayor resistencia contra las garrapatas, así como también contra los hemoparásitos, con respecto a las razas europeas (*Bos taurus*) (Bose y cols., 1995).

Por otro lado, las categorías jóvenes, menores de 1 año, poseen un sistema inmunológico capaz de contrarrestar los efectos de estas enfermedades, siendo asintomáticos o produciendo signos leves, desarrollando una fuerte inmunidad de por vida (Bock y cols., 2004; Zintl y cols., 2005). Mientras que las categorías mayores, poseen una alta susceptibilidad tanto para las cepas de campo como las vacunales (Treuman y Blight, 1978).

### 1.5.2.2 Relacionados con el ambiente y manejo

La ocurrencia de graves brotes de anaplasmosis/babesiosis, se dan cuando hay una ruptura brusca en la estabilidad enzoótica. El desequilibrio enzoótico se presenta cuando algunos animales del rodeo no poseen anticuerpos para estas enfermedades o el nivel de los mismos está disminuido considerablemente, favoreciendo la ocurrencia de brotes cuando los animales entran en contacto con alguno de los agentes (Aguirre y cols., 2011). Para conocer el estado inmunológico del rodeo se deben realizar pruebas serológicas en búsqueda de anticuerpos. Estas técnicas tienen gran utilidad en la predicción del riesgo de ocurrencia de brotes de hemoparásitos, estableciendo la proporción de terneros entre 7-9 meses de edad con anticuerpos específicos contra *Babesia* spp. y *A. marginale*. Cuando esta relación oscila entre 20% y 79%, se considera que el rodeo se encuentra en una inestabilidad enzoótica, recomendándose la vacunación (premunición). Por lo tanto, para que un rodeo se encuentre en estabilidad enzoótica los niveles de anticuerpos deben superar el 80% (Fiel y Nari, 2013).

El ambiente y el manejo de los animales son factores muy importantes en la ocurrencia de la TPB. Por ejemplo, el traslado de bovinos, con pobre inmunidad o que no hayan sido premunizados con antelación a zonas endémicas de *R. microplus* es de alto riesgo para contraer TPB. De la misma forma, si se ingresa animales portadores de TPB en un establecimiento donde los bovinos conviven con los vectores, pero sin la presencia de los hemoparásitos, las chances de que se desencadene un brote aumentarán considerablemente (Smith y cols., 2000).

El clima también toma un papel fundamental, ya que condiciones ambientales templadas y húmedas, aceleran la reproducción de los vectores, aumentando la posibilidad de contacto con bovinos susceptibles. Por el contrario, condiciones desfavorables (bajas temperaturas y sequía) harán que disminuya la cantidad de vectores. Las bajas temperaturas son principalmente determinantes en la subrevida de los babésidos dentro de las garrapatas (Solari y cols., 2013; Fiel y Nari, 2013).

Otros de los factores de riesgo relacionados al manejo (en el caso de anaplasmosis) son las aplicaciones de inyectables, descornes colectivos, castraciones o cualquier otro tipo de manejo que esté implicada la contaminación de materiales inanimados con sangre, pudiendo vehiculizar eritrocitos parasitados con *A. marginale* de un animal a otro (Suarez y Noh, 2011; Guglielmone, 1995).

## 1.6 Tratamiento y prevención

El tratamiento comienza con una detección temprana de los animales clínicamente enfermos, donde el tratamiento terapéutico específico y de apoyo posee mayores posibilidades de éxito. En animales donde el porcentaje de anemia sea alto, se recomienda reponer 400 ml de sangre para ayudar a recomponer el microhematocrito (Solari y cols., 2013). Hay que tener en cuenta que los bovinos tienen distintos grupos sanguíneos, por lo cual, aunque es poco frecuente, se podría desencadenar un shock anafiláctico debido a las transfusiones. Este cuadro puede ser revertido con la administración de antihistamínicos (Humble, 1954).

El tratamiento específico para las babesiosis se puede realizar utilizando 2 drogas, diminazene aceturato (3.5mg/kg de peso vivo), con una acción residual de 2 semanas (Solari y cols., 2013). Otra droga utilizada es diprionato de imidocarb (1 a 2 mg/kg de peso vivo), teniendo un periodo de acción y, por ende, profiláctico de 28 días (Rodríguez y Trees, 1996; Solari y cols., 2013).

Para el tratamiento de anaplasmosis la droga de elección es la oxitetraciclina (22mg/kg de peso vivo). Un trabajo realizado por Reinbold y cols. (2010) reportó que 22mg/kg de peso vivo administrado intravenoso cada 24hs por 5 días puede llegar a “esterilizar” el animal eliminando el estado portador. También puede usarse diprionato de imidocarb a una dosis mayor que para babesiosis (3mg/Kg de peso vivo) (Vanzini y Ramírez, 1994).

La prevención de ambas enfermedades está enfocada en generar una fuerte inmunidad a largo plazo en terneros menores de un año, lo que se logra preimmunizando los animales. La base de la protección se centra en inocular de forma natural o artificial los hemoparásitos. La forma natural se consigue exponiendo los terneros de 6 a 9 meses a grandes cantidades de *R. microplus* (“garrapateando”), pero la inmunidad que se consigue es muy cuestionable ya que no todos los animales llegan a tener el contacto con los hemoparásitos. La otra alternativa es inocular sangre de animales que se conozca que estén infectados. Esto es altamente riesgoso ya que no se sabe qué grado de infección tiene la sangre inoculada y debido a que no son cepas atenuadas puede desencadenar un cuadro clínico. Por lo antes dicho, la medida que se recomienda es utilizar vacunas congeladas o refrigeradas en terneros entre 6 y 9 meses, con los organismos vivos atenuados (*B. bovis*, *B. bigemina*) y heterólogos (*Anaplasma centrale*), a fin de obtener de manera programada una estabilidad enzoótica del rodeo (Nari y cols., 1979; Nari y Solari, 1990, Miraballes y cols., 2018).

## 2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

### 2.1 Diagnóstico

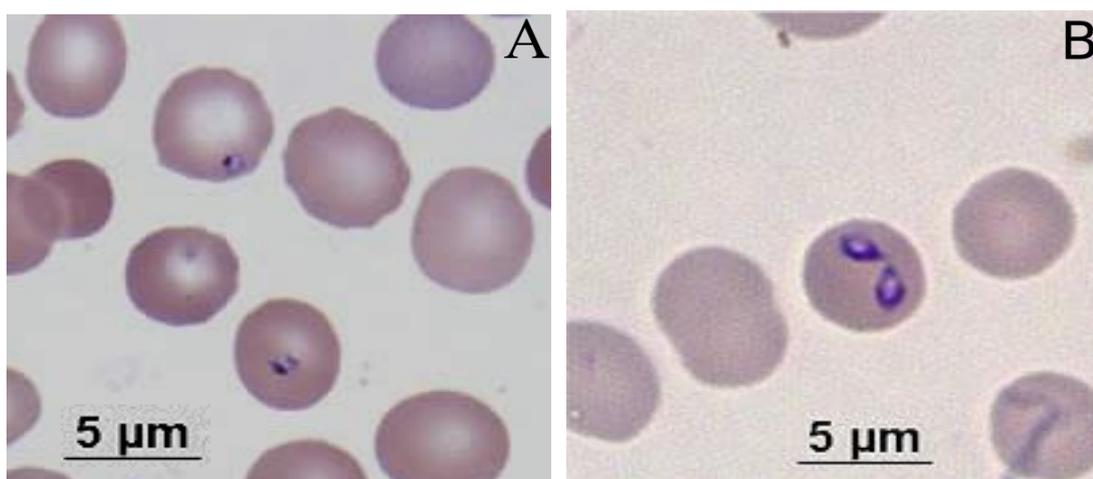
#### 2.1.1 Diagnóstico directo

El diagnóstico directo está basado en la utilización de técnicas que permitan constatar la presencia del parásito en el bovino. La técnica más utilizada para la visualización de los hemoparásitos es el frotis (de sangre y órganos). Por otro lado, con las técnicas de biología molecular, se busca la presencia de ADN de los agentes causales de la TPB.

### 2.1.1.1 Frotis

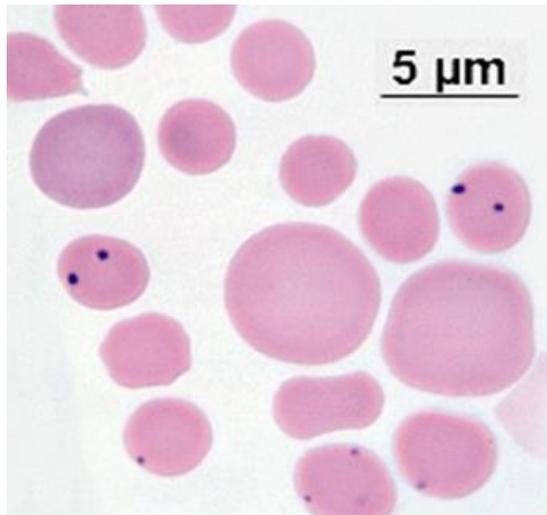
Es una técnica relativamente portátil (se puede realizar a campo) y de bajo costo. Es el método más antiguo y rutinario que existe. Esta técnica se puede realizar partiendo de muestras de sangre periférica u órganos, donde se realizan frotis de extensión o impronta, fijados con alcohol metílico y coloreado con Giemsa. La visualización de los frotis se realiza con objetivo de inmersión 100X, donde los eritrocitos toman una coloración rosada fuerte y los parásitos una coloración azul (OIE, 2014; Bose, 1995).

Las formas intraeritrocitarias que se pueden encontrar en una infección con *B. bovis* son, formas reticulares (inmaduras), redondas de pequeño tamaño o alargadas ovoides. Estas últimas tienen citoplasma azulado y vacuolas claras, de unas 3 micras de longitud (Laha y cols., 2015). Las formas de *B. bigemina*, son bastante semejantes a las de *B. bovis*, teniendo diferencia en su tamaño, siendo la forma madura de mayor tamaño (5 a 6 micras). La forma bigeminada está consituída por elementos piriformes que van de lado a lado del eritrocito unidos en un ángulo agudo. También es posible encontrar formas redondeadas, ameboideas, elípticas, trigeminadas o cuadrigeminadas (Figura 2). Para distinguir estas diferencias morfológicas entre las especies se necesita de personal entrenado en la observación de frotis, lo cual puede ser una limitante en la identificación de especie (Smith y Kilborne, 1893).



**Figura 2.** Frotis de sangre, coloreado con Giemsa y visualizado con objetivo inmersión 100X. Formas parasitarias intraeritrocitarias: A) *B. bovis*. B) *B. bigemina*. Fuente: <http://parasitosenrumiantes.blogspot.com/2009/11/proteccion-contra-babesiosis-bovina-con.html>

*Anaplasma marginale*, también se localiza intraeritrocitariamente, es de pequeño tamaño, 0,3 a 0,8 micras (Figura 3), de forma redonda y de coloración azul, se pueden encontrar de uno a varias dentro de un mismo eritrocito (Kocan y cols., 2010).



**Figura 3.** Frotis de sangre, coloreado con Giemsa y visualizados con objetivo inmersión 100X. Formas parasitarias intraeritrocitarias de *A. marginale*.

Fuente: <http://eclinpath.com/hematology/infectious-agents/anaplasma/anaplasma-marginale/>

En la fase aguda de la enfermedad, cuando la parasitemia es elevada, los parásitos son fácilmente detectados dentro de los eritrocitos (Farias, 1995). Sin embargo, cuando los animales se encuentran en una fase subclínica o son portadores, la carga parasitaria es muy baja y la visualización se hace dificultosa o en algunos casos, imposible (Oliveira Sequeira y cols., 2005). Por otro lado, si bien el frotis es la técnica considerada “gold standard” para el diagnóstico de TPB, los falsos negativos y falsos positivos pueden ser frecuentes. Estos están relacionados a diferentes factores como: al manejo y realización de las pruebas; el entrenamiento del laboratorista; tiempo que se dedica para la visualización de láminas; artefactos propios de la técnica; problemas en reconocimiento de formas inmaduras de los parásitos o la calidad de las muestras (muestras autolíticas). Esto disminuye considerablemente la sensibilidad de la técnica y aumenta la posibilidad de resultados falsos-negativos o falsos-positivos (Bose y cols., 1995). Estas limitantes disminuyen si se adoptan otros métodos de diagnóstico como los basados en biología molecular, en especial la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la cual los resultados son objetivos, descartando la subjetividad del laboratorista que realiza la lectura de los frotis. Además, es una herramienta sumamente robusta a la hora de trabajar con muestras autolíticas, debido a su alta sensibilidad y especificidad (Canever, 2014; Figueroa, 1993).

### **2.1.1.3 Biología molecular**

Las pruebas diagnósticas en base a la detección de ácidos nucleicos son muy sensibles y entre ellas, la PCR es la más utilizada. Se han reportado varias PCRs que permiten detectar la presencia tanto de diferentes especies de *Babesia* como de *Anaplasma*, siendo capaces de identificarlas, inclusive, en animales portadores (Figueroa y cols., 1992, 1993; Torioni y cols., 1998; Brito y col., 2006). Dentro de las PCRs más utilizadas son las llamadas a tiempo final (Carelli y cols., 2007; Decaro y cols., 2008; Reinbold y cols., 2010). Las PCRs para el diagnóstico de TPB

no son técnicas utilizadas de rutina ya que conlleva un cierto costo por equipamientos y reactivos específicos, pero sirven muchas veces para confirmar el diagnóstico. Además, esta técnica tiene una cierta flexibilidad con la calidad y cantidad de las muestras que se trabaja, ya que pueden ser frescas, congeladas o también trabajar con muestras autolíticas, debido a que el ADN es un material muy estable y resiste a diferentes condiciones físicas (Gayo, 1996)

### **2.1.2 Diagnóstico indirecto**

Los diagnósticos indirectos están basados en la búsqueda de anticuerpos generados por los animales con previo contacto a los parásitos. Es de fundamental importancia para saber el estado de equilibrio enzoótico que se encuentra un rodeo. Dentro de estas técnicas las más utilizadas son: enzimoimmunoanálisis (ELISA), Inmunofluorescencia indirecta y Aglutinación en tarjeta

#### **2.1.2.2 ELISA**

El enzimoimmunoanálisis (ELISA), es una técnica que se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática (Lequin, 2005). Para el diagnóstico de TPB, por lo general, a no ser que los animales hayan sido tratados o se encuentren en una fase temprana de la enfermedad, la mayoría de los laboratorios eligen la técnica de ELISA de competición como medio para identificar los animales infectados. Esta técnica se denomina de competición ya que el suero problema es incubado previamente con el antígeno, antes de incubarlo con el antisuero fijado en la placa, y por tanto compete con él (Gan y Patel, 2013). El ELISA de competición demostró tener una buena sensibilidad y especificidad para *Babesia* spp. y *A. marginale* (Goff y cols., 2003; Torioni y cols., 1998).

#### **2.1.2.3 Inmunofluorescencia indirecta**

La prueba de Inmunofluorescencia (IF) es una técnica utilizada para visualizar la distribución de una proteína o antígeno específico en células o secciones de tejido. Esta utiliza anticuerpos específicos para un antígeno dirigiendo marcadores fluorescentes a las biomoléculas dianas de forma específica. En el fundamento de la inmunofluorescencia indirecta (IFI) se utiliza un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo para reconocer un anticuerpo primario. La IFI fue una técnica utilizada anteriormente, pero en la actualidad se ha dejado de utilizar ya que presenta algunas limitantes (reacciones cruzadas entre *B. bovis* y *B. bigemina*, e inespecificidad en el caso de *A. marginale*). Además, tiene un bajo rendimiento de procesamiento de muestras por día y es una técnica muy subjetiva (OIE, 2014).

#### **2.1.2.4 Aglutinación en tarjeta**

El principio de la prueba de aglutinación en tarjeta se basa en la interacción de un antígeno componente de la superficie de los parásitos, con anticuerpos específicos divalentes, formando una malla o conglomerado macroscópicos. Esta es una técnica sensible, que puede ser realizada en laboratorio o a campo dando resultados en pocos minutos. Pero las reacciones inespecíficas pueden ser un problema, y la subjetividad en la interpretación puede tener como consecuencia una variación los resultados (OIE, 2014, 2015).

Por consiguiente, todas las pruebas descritas anteriormente que se utilizan para el diagnóstico indirecto de TPB, son útiles para obtener datos epidemiológicos de una base amplia, pero se debe tener precaución en lo que respecta a su uso para la certificación de la enfermedad, ya que se toman en cuenta los anticuerpos generados, no la presencia del parásito.

## **2.2 Microhematocrito**

Si bien el microhematocrito no es un diagnóstico directo ni indirecto, es altamente orientativo ya que la TPB es una enfermedad anemizante, y por lo tanto, es un signo que está presente en todos los casos (Farias, 2007; Costa y cols., 2013). El microhematocrito se realiza con muestras de sangre central, donde se cargan capilares con anticoagulante y se centrifugan a 12.000 rpm por 4 minutos, separando la parte de los hematíes del plasma. Luego, se mide con una regla estandarizada el porcentaje de glóbulos rojos, determinando así el grado de anemia del animal. A modo de ejemplo, un microhematocrito normal de un bovino se encuentra entre 28 a 33%, mientras que, en caso de TPB se observan porcentajes menores de 26 (Radostits y cols., 2002; Amorim y cols., 2014)

## **2.3 Diagnóstico de TPB en Uruguay y en la región**

Entre los años 1988 al 2011, se diagnosticaron entre las regiones norte, este y noroeste del Uruguay 300 brotes de TPB (Solari y cols., 2013; Fiel y Nari, 2013). Mientras que, desde 1993 al 2013 en el Laboratorio Regional Noroeste Miguel C. Rubino-DILAVE, Paysandú, dicha enfermedad parasitaria fue la más diagnosticada en bovinos de la región noroeste del Uruguay, llegando a diagnosticar 274 brotes, de los cuales el 69% estaba representado por las *Babesia* spp., 27% *A. marginale* y un 4% infecciones mixtas (Buroni, 2012). Por otro lado, en el sur de Brasil, Pelotas, el 57.4% de los casos de enfermedades parasitarias está representado por TPB (Tortelli y col, 2005). Estos datos indican que tanto para Uruguay como la región, la TPB es una de las enfermedades parasitarias de mayor importancia en bovinos de producción (Tortelli y cols., 2005; Buroni, 2012; Solari y cols., 2013; Fiel y Nari, 2013).

Estudios de seroprevalencia realizados por el MGAP entre los años 1979 y 1992, donde se analizaron 1682 sueros provenientes de 169 rodeos, se obtuvieron 65,7% y 74% de establecimientos positivos para *Babesia* sp. y *Anaplasma* sp. respectivamente (Cardozo y cols., 1992; Solari y Quintana, 1994; Solari y cols., 2013)

## **2.4 Normativas nacionales**

El Poder Legislativo el 17 de abril del 2008, creó la ley N° 18.268 en el cual establece en su artículo 1, el interés nacional de la lucha contra la garrapata del bovino *R. microplus* en todo el territorio nacional y en todas las especies que parasita. Además, quedan incluidas bajo el mismo marco normativo implementando en la misma ley, las enfermedades infecciosas de los animales transmitidas por este ectoparásito, tales como *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*. Quedando la obligación de denunciar la constatación de garrapata *R. microplus* y sus enfermedades transmitidas ante la oficina del servicio sanitario más próxima (MGAP, 2008).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La TPB es un conjunto de enfermedades que generan un fuerte impacto en los sistemas productivos, ocasionando la muerte a un número elevado de animales cada año. Además, es la enfermedad parasitaria diagnosticada con mayor prevalencia en la región noroeste de Uruguay.

Al igual que en otros países del mundo, en Uruguay se lleva a cabo una campaña para el control y erradicación de la garrapata del bovino (*R. microplus*) y las enfermedades transmitidas por este (TPB), con esfuerzos conjuntos del sector público y privado. El cometido principal es disminuir la prevalencia de la enfermedad y, así, minimizar las pérdidas económicas que esta causa.

Hasta la fecha, en Uruguay, el diagnóstico de TPB se realiza principalmente por visualización de frotis coloreados con Giemsa. La sensibilidad de dicho método en infecciones agudas y con muestras en buen estado de conservación resulta muy buena. Sin embargo, tiene varias limitantes: la necesidad de contar con personal entrenado en la lectura de frotis; artefactos de la técnica que dificultan las lecturas; baja en la sensibilidad de diagnóstico cuando las muestras están autolíticas o fueron mal conservadas; entre otras.

Por lo tanto, teniendo en cuenta la importancia que representa la TPB para el país, y las limitaciones para confirmar su diagnóstico, es imperativo la necesidad de establecer nuevas y más certeras técnicas de diagnóstico utilizando herramientas de biología molecular que puedan contribuir en la detección precoz de dicho complejo y así, poder establecer medidas sanitarias para combatir la TPB.

### **4. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN**

El presente estudio se compone de dos trabajos, primero (**Parte I**), desarrollo, puesta a punto e implementación de una reacción en cadena de la polimerasa multiplex a tiempo final (PCRm) para el diagnóstico de tristeza parasitaria bovina, con el objetivo principal de fortalecimiento al diagnóstico de TPB.

El segundo trabajo, un estudio descriptivo de los brotes de TPB (**Parte II**), teniendo como objetivo estudiar la frecuencia de los brotes de TPB, establecer estacionalidad de los brotes, frecuencia y prevalencia de categorías afectadas, estudiar indicadores epidemiológicos (morbilidad, mortalidad y letalidad). Así como también, evaluar asociación con signos clínicos, hallazgos de necropsia, presencia de garrapata y utilización de inyectables.

### **5. PARTE I: DESARROLLO Y PUESTA A PUNTO DE UNA PCR MULTIPLEX PARA EL DIAGNÓSTICO DE TRISTEZA PARASITARIA BOVINA**

#### **5.1 HIPÓTESIS**

El desarrollo y utilización de una técnica molecular PCR multiplex (PCRm) aumenta la sensibilidad y especificidad del diagnóstico de la TPB.

## **5.2 OBJETIVOS**

**5.2.1** Desarrollar y poner a punto una PCRm para el diagnóstico de TPB.

**5.2.2** Comparar sensibilidad y especificidad entre las técnicas de diagnóstico (PCRm vs frotis)

## **5.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.3.1 Tipo de muestreo y muestras procesadas**

Se realizó un muestreo de conveniencia entre agosto 2016 y octubre 2018, recolectando muestras remitidas por veterinarios de libre ejercicio a la División de Laboratorio Veterinarios (DILAVE-MGAP, Paysandú-Uruguay) con diagnóstico presuntivo a TPB. Se definió como muestra de brote presuntivo aquella proveniente de establecimientos donde el veterinario constató casos de animales con signos clínicos o hallazgos de necropsia compatibles con TPB. Los síntomas fueron: fiebre (> 39.9°C), anemia (microhematocrito <26%), decaimiento, debilidad, agresividad, ictericia, esplenomegalia. Se trabajó con muestras de sangre periférica y central colectadas con anticoagulante EDTA potásico de animales clínicamente enfermos o muertos y órganos (bazo, riñón, corazón, hígado, sistema nervioso central) de animales necropsiados.

Por cada brote presuntivo de TPB, se recolectó información epidemiológica (fecha de ocurrencia, lugar (DICOSE), categoría animal afectada, número de animales afectados, número de animales muertos, total de animales en riesgo). Sumado a los signos clínicos y hallazgos de necropsia observados por el veterinario actuante, se registró la presencia o no de *R. microplus* en el animal y manejo sanitario (inyectables) 25 días previos al brote (Anexo I, II, II).

### **5.3.2 Procesamiento de muestras**

A todas las muestras recolectadas se les realizó frotis y PCRm (los detalles del desarrollado y puesta a punto se describen más abajo). Los frotis de sangre se hicieron por extensión fina, mientras que los de órganos se realizaron por impronta. Ambos fueron fijados con alcohol metílico durante 5 minutos y coloreados con Giemsa durante 45 minutos. Los frotis fueron visualizados en campo de inmersión de 100x. Los animales positivos se establecieron con una sensibilidad analítica mayor al 5% de eritrocitos parasitados (EP) para *B. bigemina*, más del 1% de EP para *B. bovis* y superior a 5% para *A. marginale* (Mangold, 2003).

A todas las muestras de sangre se le realizó el análisis de microhematocrito para establecer el porcentaje de anemia de los animales. Brevemente, se cargaron microcapilares con 70µl con sangre, centrifugados a 12.000 rpm por 4 minutos. La lectura se realizó con regla estandarizada de microhematocrito. Se calculó media y error estándar.

### **5.3.3 Desarrollo PCRm para el diagnóstico de TPB**

Para el desarrollo de la PCRm para TPB se trabajó con muestras de sangre y órganos positivos al frotis. Las mismas fueron 15 muestras de sangre de distintos

animales, 5 por cada agente, *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*. De las cuales fueron, 15 muestras de órganos, 5 por cada agente, las cuales fueron: riñón (n=3), hígado (n=3), bazo (=3), corazón (n=3) y sistema nervioso central (n=3), provenientes de 3 animales necropsiados. Se extrajo ADN utilizando un kit comercial, PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Alemania), a partir de 200 µl de sangre fresca y 25mg de órgano, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN fue cuantificada con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoScientific).

Para corroborar que las muestras utilizadas fueron positivas, se realizó una primera PCRm “screening” previamente optimizada en el Laboratorio de Vectores y enfermedades transmitidas (LVET) del Centro Universitario Regional- Litoral Norte, Salto- Uruguay, Universidad de la República, la cual emplea primers que amplifican fragmentos de los genes 16S y 18S de la familia Anaplasmataceae y Babesiidae, respectivamente. Los primers empleados fueron EHR16SD/EHR16SR, que amplifica 345 pares de bases (pb) de un fragmento del gen 16s rARN (Parola y cols., 2000) y BAB 143-167/BAB 694-667 que amplifica aproximadamente 500 pb de un fragmento del gen 18s rARN (Cuadro I) (Soares y cols., 2011).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial 94°C por 5’, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30’’, anelling a 57°C por 40’’ y extensión 72°C por 1’, y una extensión final a 72°C por 5’. Se utilizaron como controles positivos muestras previamente secuenciadas de *Ehrlichia canis* y *Rangelia vitalii*, almacenadas y congeladas en el LVET. El producto resultante de la PCRm se visualizó utilizando un transiluminador UV inmediatamente luego de una corrida de electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, conteniendo un intercalante GoodView® Nucleic Acid Stain (Beijing SBS Genetech Co., LTd).

### 5.3.3.1 Diseño PCRm para TPB

Para diseñar la PCRm se seleccionaron 3 pares de primers específicos (previamente publicados) por cada especie de parásito. Se tomó en cuenta: que tuvieran condiciones de ciclado semejantes; que no fueran complementarios y que los amplicones producidos tuvieran distintos tamaños. Para *B. bovis* y *B. bigemina* se seleccionó primers diseñados para amplificar fragmentos de 356 pb y 400 pb, respectivamente, de dos regiones del gen asociado a las proteínas de la roptria (Suarez y cols., 1991; Petrigh y cols., 2008). Por último, para *A. marginale* se utilizó primers diseñados por Torioni y cols. (1998) que amplifican 458 pb de una proteína de superficie altamente conservada (MSP-5) (Cuadro I).

**Cuadro I** Se indican los nombres, secuencias y tamaños de los amplicones generados con cada set de primers

Primers	Secuencia (5’ a 3’)	Tamaño del producto (pb)
<b>PCR screening</b>		
EHR16SD	GGTACCYACAGAAGAAGTCC	345
EHR16SR	TAGCACTCATCGTTTACAGC	
BAB143-167	CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC	500

BAB694-667	GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG	
<b><i>Babesia bovis</i></b>		
BoF	CACGAGGAAGGAACTACCGATGTTGA	365
BoR	CCAAGGAGCTTCAACGTACGAGGTCA	
<b><i>Babesia bigemina</i></b>		
Bib400F	AGCTTGCTTTCACAACCTCGCC	400
Bib400R	TTGGTGCTTTGACCGACGACAT	
<b><i>Anaplasma marginale</i></b>		
Msp5 eF	GCATAGCCTCCGCGTCTTTC	458
Msp5 eR	TCCTCGCCTTGGCCCTCAGA	

### 5.3.3.2 Puesta a punto de la PCRm

La puesta a punto se realizó con las 30 muestras positivas antes mencionadas en la sección 4.3.3 (15 de sangre y 15 de órganos). Se realizaron varias PCRs probando diferentes gradientes de temperatura de annealing. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial 95°C por 5', seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 95°C por 1', temperaturas de annealing testeadas 55/58/60°C por 1', extensión a 72°C por 1' y una extensión final a 72°C por 10'. Los controles positivos utilizados de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* habían sido secuenciados previamente y almacenados en el LVET. El producto resultante de cada PCR se visualizó utilizando un transiluminador UV inmediatamente luego de una corrida de electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, conteniendo un intercalante GoodView® Nucleic Acid Stain (Beijing SBS Genetech Co., LTd).

### 5.3.3.3 Especificidad analítica/secuenciación

Para establecer la especificidad analítica de la PCRm, se tomaron los amplicones de tamaño esperados de las 30 muestras, se purificaron mediante un kit comercial PureLink®Quick PCR Purification kit (Invitrogen, Alemania) y fueron enviados a secuenciar a la empresa MacroGen (Corea del Sur). Se utilizaron ambos primers (forward y reverse) de cada especie para secuenciar. Para el estudio de la identidad, las secuencias obtenidas de cada muestra fueron alineadas y de ser necesario, corregidas manualmente. Las secuencias consenso resultantes de cada muestra fueron comparadas con las disponibles en el GenBank mediante búsqueda en BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### 5.3.3.4 Límite de detección (LD) en sangre de la PCRm

Se utilizó sangre con anticoagulante EDTA potásico con cepas de referencia de *B. bovis*, y *B. bigemina* proporcionadas por el Departamento de Parasitología de la DILAVE Miguel C. Rubino, Laboratorio Central-MGAP (Montevideo). Estas cepas son utilizadas para la elaboración de vacunas. La cepa de *A. marginale* fue recolectada de un caso clínico de campo, la cual fue remitida una muestra de sangre con EDTA potásico al DILAVE Paysandú-MGAP. A las cuatro muestras de sangre se les realizó microhematocrito y conteo de eritrocitos parasitados (EP) en base a 1000 eritrocitos observados en varios campos del frotis fino de extensión.

Se realizaron diluciones de sangre 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000 y 1/1.000.000, las cuales fueron preparadas en base a 40 µl de sangre (con EDTA potásico) parasitada en 360 µl de sangre (con EDTA potásico) extraída de animales sanos de zonas libres de garrapata y TPB, localizados en el departamento de Colonia, Uruguay (33°59'42''S, 57°56'33''O). La sangre libre de hemoparásitos utilizada para realizar las diluciones fue analizada perviamente por medio de la PCRm screening detallada en la sección 4.3.3. (Cuadro I). De cada dilución se extrajo ADN a partir de 200 µl utilizando el kit comercial PureLink®Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Alemania). La concentración de ADN extraído fue cuantificada con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoScientific). Por cada dilución de sangre se realizó PCR individual por género y PCRm para TPB.

### 5.3.3.5 Robustez de la PCRm

Para el estudio de la robustez de la técnica varias de las muestras positivas fueron sometidas a diferentes procesos de congelación y putrefacción. Las muestras seleccionadas fueron 15 de sangre (5 por cada hemoparásito) y 15 de órganos (5 por cada hemoparásito). De los cuales, 10 muestras de sangre y 6 de órganos fueron congeladas a -4°C por más de 1 año y 5 muestras de sangre y 9 órganos congelados por un periodo menor a 6 meses. Se tomaron alícuotas de estas 30 muestras y se las sometió a un proceso de putrefacción en estufa a 24°C por 24 y 48hs, La extracción de ADN y posterior **PCRm** de todas las muestras se realizaron como se detalló anteriormente.

### 5.3.4 Cálculo de sensibilidad y especificidad e Índice de Kappa de Cohen del frotis y la PCRm

La sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) de las técnicas se calculó de la siguiente manera:

#### Frotis

$$\text{Se frotis} = \frac{\text{animales positivos al frotis y PCRm}}{\text{animales positivos al PCRm}}$$

$$\text{Sp frotis} = \frac{\text{animales negativos al frotis y PCRm}}{\text{animales negativos al PCRm}}$$

#### PCRm

$$\text{Se PCRm} = \frac{\text{animales positivos al frotis y PCRm}}{\text{animales positivos al frotis}}$$

$$\text{Sp PCRm} = \frac{\text{animales negativos al frotis y PCRm}}{\text{animales negativos al frotis}}$$

Se aplicó el índice Kappa de Cohen para medir el acuerdo entre los diferentes métodos de diagnóstico empleados (Frotis vs PCRm). El índice de Kappa se utilizó para evaluar la concordancia entre las pruebas con un nivel de confianza del 95 %. Un valor dentro del rango 0-0,2 indica concordancia leve, 0,21-0,4 aceptable, 0,41-0,6 moderada, 0,61-0,8 sustancial, 0,81-1 casi perfecta a perfecta (Landis y Koch, 1977).

### **5.3.5 Análisis estadístico**

Se utilizó el software estadístico Rstudio para el cálculo de la media para el microhematocrito por patógeno y cálculo del Índice de Kappa de Cohen entre las técnicas (Frotis, PCRm). Para el cálculo de sensibilidad, especificidad, la unidad del análisis es el material enviado para el diagnóstico (n=467). El análisis fue hecho en el software R con el paquete *caret*.

## **5.4 RESULTADOS**

### **5.4.1 Descripción de los brotes estudiados**

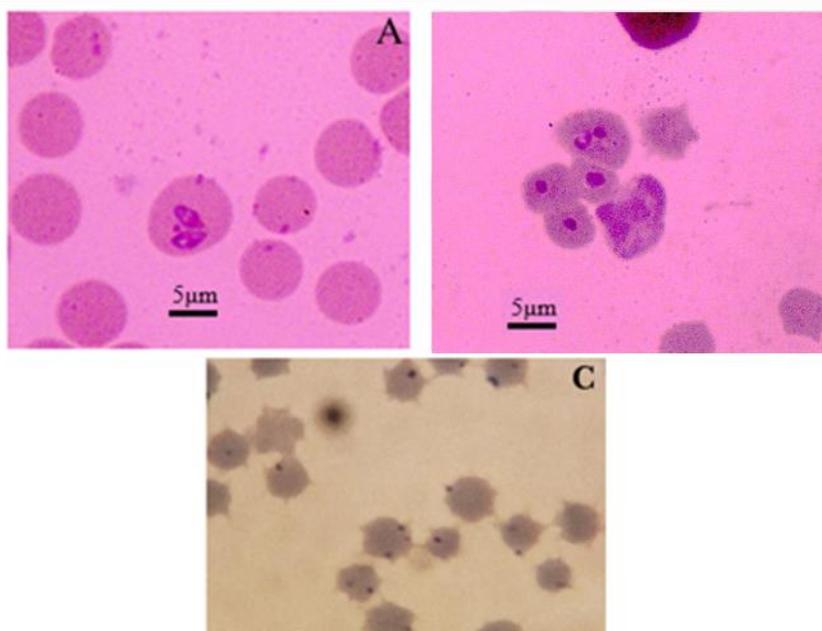
Dentro del periodo de estudio (8/2016 al 10/2018) se recolectaron muestras de un total de 152 brotes presuntivos a TPB. Se trabajó con 467 muestras (340 muestras de sangre y 127 muestras de órganos que incluyeron riñón, bazo, hígado, corazón y SNC), pertenecientes a 375 animales. Estas muestras provinieron de 122 establecimientos de 10 departamentos, de los cuales el 91% de las muestras provinieron de los departamentos del Litoral noroeste del Uruguay (Artigas, Salto, Paysandú, Rio Negro), mientras que el 9% fueron muestras de Tacuarembó, Rivera, Flores, Lavalleja Maldonado y Soriano.

### **5.4.2 Diagnóstico por frotis**

Se procesaron un total de 467 muestras por frotis coloreados con Giemsa (Figura 4), obteniendo 202 muestras positivas y 264 negativas. De las muestras positivas se visualizaron 36 de *B. bovis*, 22 de *B. bigemina*, 24 de *Babesia* spp. (no se pudo identificar especie), 106 de *A. marginale* y 14 de infecciones mixtas (Figura 5).



**Figura 4.** Frotis de sangre y órganos coloreados con Giemsa previos a su lectura



**Figura 5.** Frotis de sangre coloreados con Giemsa, visualizados con objetivo de inmersión 100X. A) Eritrocito parasitados por *B. bigemina*. B) Eritrocitos parasitados por *B. bovis*. C) Eritrocitos parasitados por *A. marginale*

#### 5.4.3 Análisis del microhematocrito

Se realizaron 340 análisis de microhematocrito, de los cuales 136 fueron positivos (frotis y PCRm) al menos a un agente, obteniendo porcentajes de anemia inferiores a 26%. Los resultados medios por agente fueron para *B. bovis* 16,60%, *B. bigemina* 18,50%, *A. marginale* 16,14% e infecciones mixtas 17,70%. El estudio de la correlación entre el porcentaje de microhematocrito y agente dio un  $p > 0.05$ , por lo cual no hubo diferencias significativas entre ellas (Cuadro II).

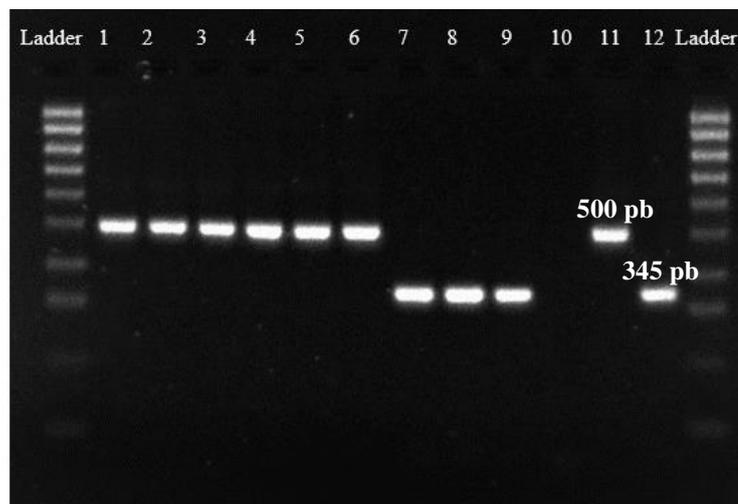
**Cuadro II.** Tabla las medias de porcentajes de microhematocrito, error estándar y la correlación entre el factor y el agente.

Agente	$\bar{x}$ Micro (%)	S
<i>Babesia bovis</i>	16,60	2,0
<i>Babesia bigemina</i>	18,50	1,6
<i>Anaplasma marginale</i>	16,14	1,3
Infección mixta	17,70	1,4

$\bar{x}$  Micro (%): resultado de la media del microhematocrito. S: Error estándar.

#### 5.4.4 Diseño de la PCRm.

A las 30 muestras iniciales se les realizó PCRm de screening obteniendo como resultados: 20 positivas para la familia Babesiidae (500 pb) y 10 positivas para Anaplasmataceae (345pb). En la Figura 6, se muestra una corrida electroforética con algunas de las muestras positivas. Luego de la confirmación por esta PCR se prosiguió con el desarrollo de la PCRm utilizando estas mismas muestras.



**Figura 6.** Corrida electroforética (agar 1,5%) mostrando las bandas de 500 pb (Familia Babesiidae) y 345 pb (Familia Anaplasmataceae) luego de realizada la PCR screening. Línea 1 a la 9 muestras positivas. Línea 10 control negativo. Línea 11 control positivo *R. vitalii*. Línea 12 control positivo *E. canis*. Ladder (marcador de peso molecular).

#### 5.4.5 Puesta a punto PCRm

Los tres pares de primers seleccionados para la PCRm, mostraron una buena performance al ser combinados en la misma reacción amplificando exitosamente los amplicones del tamaño esperado. Con respecto a la optimización de la temperatura de annealing, el mejor resultado se obtuvo con 58°C (Figura 7), ya que se observó

con las otras temperaturas de anealing testeadas (55 y 60°C) la amplificación de bandas inespecíficas (datos no mostrados).



**Figura 7.** Corrida electroforética de PCRm en agar 1,5%

Línea 1 y 2 muestras positivas a *B. bovis*. Líneas 3 muestras negativa. Línea 4 muestra positivas a *B. bovis* y *A. marginale*. Línea 5 y 6 muestra positiva a *B. bigemina* y *A. marginale*. Línea 7 muestras positivas a *A. marginale*. Línea 8 control positivo *B. bovis*. Línea 9 control positivo *B. bigemina*. Línea 10 control positivo *A. marginale*. Línea 11 control múltiple *B. bovis*/*B. bigemina* y *A. marginale*. Línea 12 control negativo.

#### 5.4.6 Secuenciación

El estudio de identidad para las 30 muestras utilizadas en la optimización de la PCRm confirmó con un 99% de identidad las muestras primariamente diagnosticadas en el frotis como *B. bovis* (n=10), *B. bigemina* (n=10) y *A. marginale* (n=10).

#### 5.4.7 Diagnóstico por PCRm

Se procesaron un total de 467 muestras por PCRm, obteniendo 272 muestras positivas y 195 negativas. De las muestras positivas se obtuvieron 56 para *B. bovis*, 63 para *B. bigemina*, 133 para *A. marginale*, 3 para infecciones mixtas por *B. bovis* y *A. marginale*, por último 17 infecciones mixtas por *B. bigemina* y *A. marginale*.

#### 5.4.8 Límite de detección (LD) de la PCRm para sangre

Para el cálculo de LD se trabajó con muestras de sangre con valores de microhematocrito de 27%, 31% y 20% para *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*, respectivamente. El conteo de EP en base a 1000 eritrocitos observados, fue el siguiente: 8 EP por *B. bovis*, 3 EP por *B. bigemina* y 5 EP por *A. marginale*.

El LD de la PCR individual por género para *B. bovis* fue de 0,008 EP ( $10^{-3}$ ), para *B. bigemina* 0.003 EP ( $10^{-3}$ ) y para *A. marginale* 0.005 EP ( $10^{-4}$ ) (Anexo 4).

Por otro lado, el LD de la PCRm para los tres agentes de TPB, fue de 0,08 ( $10^{-2}$ ) de EP por *B. bovis*, 0,03 ( $10^{-2}$ ) de EP por *B. bigemina* y 0,02 ( $10^{-2}$ ) de EP por *A. marginale* (Anexo 5).

#### 5.4.9 Robustez de la PCRm para TPB

##### Efecto de la congelación

Tres de las diez (3/10) muestras de sangre positivas congeladas por más de un año mostraron bandas del tamaño esperado y las restantes fueron negativas. Mientras que las muestras de sangre congeladas por menos de 6 meses fueron todas positivas (6/6). Por otro lado, se obtuvieron bandas en todas las muestras tanto de los órganos congelados por más de un año como los congelados por menos de 6 meses.

##### Efecto de la putrefacción.

Las mismas muestras de sangre que no amplificaron poscongelación, tampoco lo hicieron cuando se sometieron a procesos de putrefacción en estufa. Mientras que, las muestras de sangre que sí lograron amplificar poscongelación también fueron positivas tras 24 y 48hs en estufa a 25°C.

La incubación en estufa a 25°C de los órganos por 24 y 48hs, no afectó la calidad del ADN, obteniéndose bandas en las 15 muestras.

#### 5.4.10 Sensibilidad y especificidad diagnóstica de las técnicas e Índice de Kappa de Cohen.

La sensibilidad y especificidad diagnóstica del frotis fueron de 73 y 98%, respectivamente. Por otro lado, la PCRm tuvo una sensibilidad diagnóstica de 99%, y una especificidad de 72,3% (Cuadro III)

**Cuadro III.** Cuadro de diagnósticos por técnicas.

Diagnóstico	PCRm			Diagnóstico	Frotis		
<b>Frotis</b>	Positivo	Negativo	Total	<b>PCRm</b>	Positivo	Negativo	Total
Positivo	199	3	202	Positivo	199	73	272
Negativo	73	192	265	Negativo	3	192	195
Total	272	195	467	Total	202	265	467

El índice de Kappa de Cohen (k) para el Frotis y el PCRm fue de  $k= 0.68$  ( $p<0.001$ ), lo que se considera como un acuerdo sustancial entre las técnicas de diagnóstico.

## 6. PARTE II: ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LOS BROTES DE TPB

### 6.1 HIPÓTESIS

La frecuencia de los agentes y estacionalidad de los brotes de TPB en el litoral noroeste del país es similar a lo reportado en estudios anteriores.

### 6.2 OBJETIVOS

6.2.1 Estudiar la frecuencia de brotes de TPB por agente.

6.2.2 Establecer estacionalidad de los brotes y lugares de ocurrencia.

6.2.3 Establecer prevalencia y frecuencia de categoría animal afectada y reportar valores de morbilidad/mortalidad/letalidad.

6.2.4. Evaluar asociación estadísticas en base a los signos clínicos/hallazgos de necropsia con TPB y factores de riesgo (garrapatas/inyectables).

6.2.5. Describir los diagnósticos diferenciales para TPB en la región noroeste del Uruguay.

### 6.3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 6.3.1 Estudio descriptivo de los brotes en base al muestreo realizado en la Parte I

En base a la información recolectada del muestreo (Parte I), se contabilizó el total de brotes estudiados y brotes positivos, calculando la frecuencia relativa del número de casos (animales con signos clínicos o hallazgos de necropsia compatibles a TPB) enviados por establecimiento. Se calcularon las frecuencias relativas de los brotes positivos por cada agente de TPB. Se definió como brote positivo, al establecimiento donde se remitieron muestras de animales con signos clínicos o hallazgos de necropsia compatibles a TPB, con al menos una muestra positiva al frotis o PCRm (Figura 8).

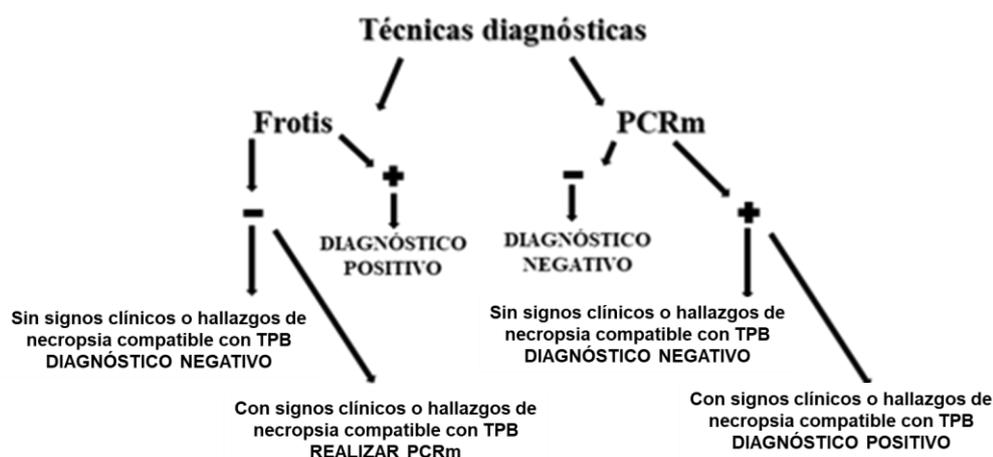


Figura 8. Ruta diagnóstica según resultados e interpretación de las técnicas.

### **6.3.1.1 Localización y dinámica estacional de los brotes**

Se diseñó un mapa por seccionales policiales utilizando programa QGIS 2.18, donde se indicaron los brotes de TPB con escala de colores según el número de brotes por seccional. Se generaron curvas epidémicas en base a los brotes positivos tanto de babesiosis como anaplasmosis con relación a los meses del año que ocurrieron.

### **6.3.1.2 Categorías afectadas, morbilidad, mortalidad y letalidad**

Se calculó la frecuencia de categorías afectadas por agente. Fueron analizadas las medidas de media, desvío estándar y límites (máximos y mínimos) de morbilidad, mortalidad y letalidad por brote según agente. Se expresó tasas epidemiológicas en base a 1000 animales para los valores de morbilidad, mortalidad y letalidad ajustado estadísticamente por categorías utilizando regresión de Poisson.

### **6.3.1.2 Signos clínicos, hallazgos de necropsia y asociaciones de riesgo**

Se estimó las chances de un resultado positivo según la presencia de signos clínicos o hallazgos de necropsia de los brotes positivos a TPB. Se analizó la asociación de riesgo (manejo sanitario (inyecciones) 25 días previos al brote y presencia de garrapata) con los resultados de diagnóstico positivo a babesiosis y anaplasmosis.

### **6.3.2 Análisis estadístico**

Para el estudio descriptivo de los brotes se utilizó medidas estadísticas de media y frecuencia relativa.

La asociación entre indicadores epidemiológicos de morbilidad, mortalidad y letalidad con los resultados positivos discriminado por parásito fue evaluada por medio de la regresión de Poisson (MLG - modelos lineales generalizados) y la unidad de análisis fue el brote (n=152 brotes). Fue utilizada la distribución “quasipoisson” para control de la dispersión. La estimativa de los modelos son las tasas (o riesgo relativo) a cada 1000 animales (o afectados) utilizando la variable “off set” [log (animales/1000)]. Se utilizó la edad de los animales afectados como variable de ajuste. Los modelos fueron hechos en el software R utilizando la función “glm”.

La asociación entre diagnóstico positivo a TPB y presencia de signos clínicos y/o hallazgos de necropsia ocurridos en el establecimiento reportados por los veterinarios fue testeada por medio de ecuaciones de estimación generalizadas (EEG) para análisis de mediciones repetidas con distribución binomial. La unidad de análisis fue la muestra enviada para diagnóstico (sangre y/o órganos, n=467) con repetición por brotes. Los exponentes de las estimativas del modelo son la Razón de Chances (RC). La variable respuesta (Y) es el resultado diagnóstico positivo (1 = positivo para al menos un parásito *Babesia* sp. o *Anaplasma marginale*; 0 = negativo) y las variables predictoras (o explicativas, X) fueran la presencia de signos o lesiones macroscópicas ocurridos en el establecimiento reportados por los veterinarios. Estos modelos fueron hechos en el software SAS Studio con el

procedimiento PROC GENMOD y para las medidas repetidas se utilizó el comando REPEATED SUBJECT con los identificadores del brote.

La asociación de riesgo (uso de inyectables y presencia de garrapata) con los resultados de diagnóstico positivo a TPB fue testada por medio de ecuaciones de estimación generalizadas (EEG) para análisis de mediciones repetidas con distribución de Poisson. La unidad de análisis fue la muestra enviada para diagnóstico (sangre y/o órganos, n=467) con repetición por brotes. Los exponentes de las estimativas del modelo es el Riesgo Relativo (RR). La variable respuestas (Y) es el resultado de diagnóstico positivo para *Anaplasma* (“variable dummy”: 1 = positivo para *A. marginale*; 0 = negativo) y *Babesia* spp. (“variable dummy”: 1 = positivo para *Babesia* spp.; 0 = negativo). Las variables predictoras (o explicativas, X) fueran el uso de inyectable aproximadamente 25 días antes del brote y presencia de garrapatas. Estos modelos fueran hechos en el software SAS Studio con el procedimiento PROC GENMOD y para las medidas repetidas se utilizó el comando REPEATED SUBJECT con los identificadores del brote.

## 6.4. RESULTADOS

### 6.4.1 Estudio descriptivo de los brotes de TPB

Se trabajó con 152 brotes presuntivos a TPB, de los cuales fueron diagnosticados 96 brotes positivos, correspondiendo al 63% de los brotes estudiados. Con un frecuencia relativa de 72,4% se trabajó con 2 casos por brote. Mientras que en la gran mayoría de los brotes, representado por una frecuencia acumulada del 87,5%, se trabajó con hasta 4 casos por brote. Lo cual indica que en la mayoría de los brotes, los veterinarios no remiten más de 4 casos.

Los diagnósticos positivos de brotes de TPB representados por frecuencia relativa por agente fue de 43,8% para *Babesia* spp., 42,7% *A. marginale* y 13,5% infecciones mixtas (Cuadro IV).

**Cuadro IV.** Frecuencias relativas de los brotes por cada agente de TPB

Agente	N° Brotes	Fr
<i>A. marginale</i>	41	42,7%
<i>B. bigemina</i>	21	21,9%
<i>B. bovis</i>	21	21,9%
<i>B. bigemina/A. marginale</i>	10	10,4%
<i>B. bovis/A. marginale</i>	3	3,1%
Total	96	

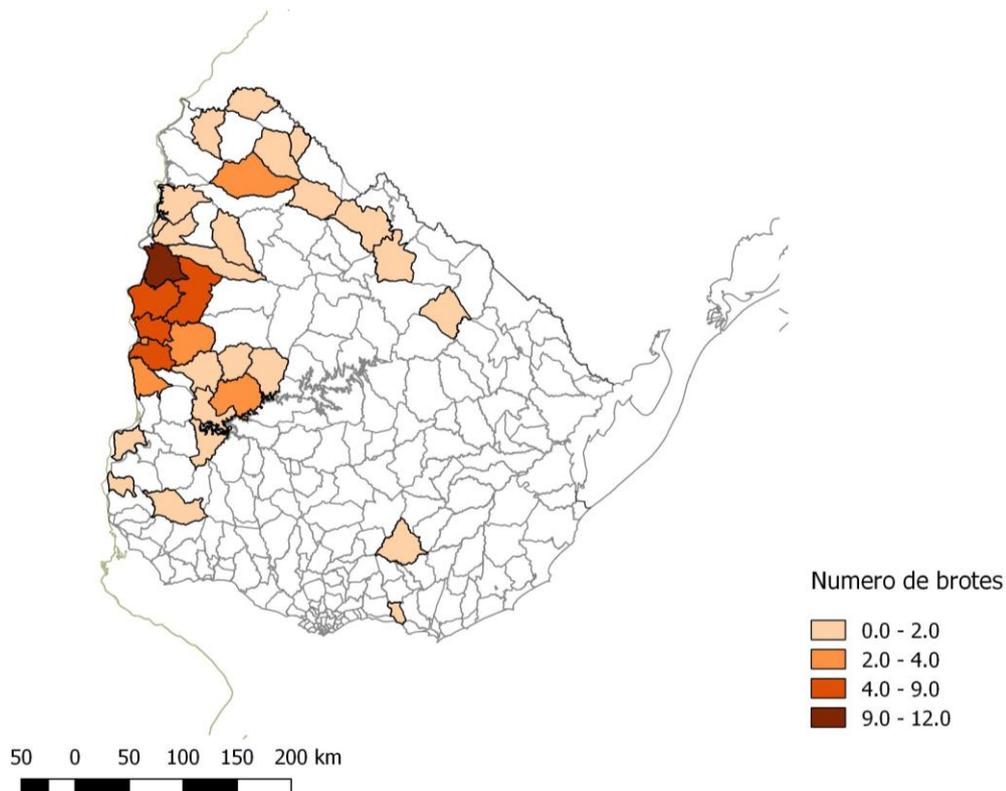
Fr: Frecuencia relativa

### 6.4.2 Lugares de presentación de los brotes de TPB y curvas epidémicas

Los brotes de TPB se localizaron en su gran mayoría en el litoral noroeste del Uruguay, zona de alta prevalencia de estas enfermedades (Figura 9). Como

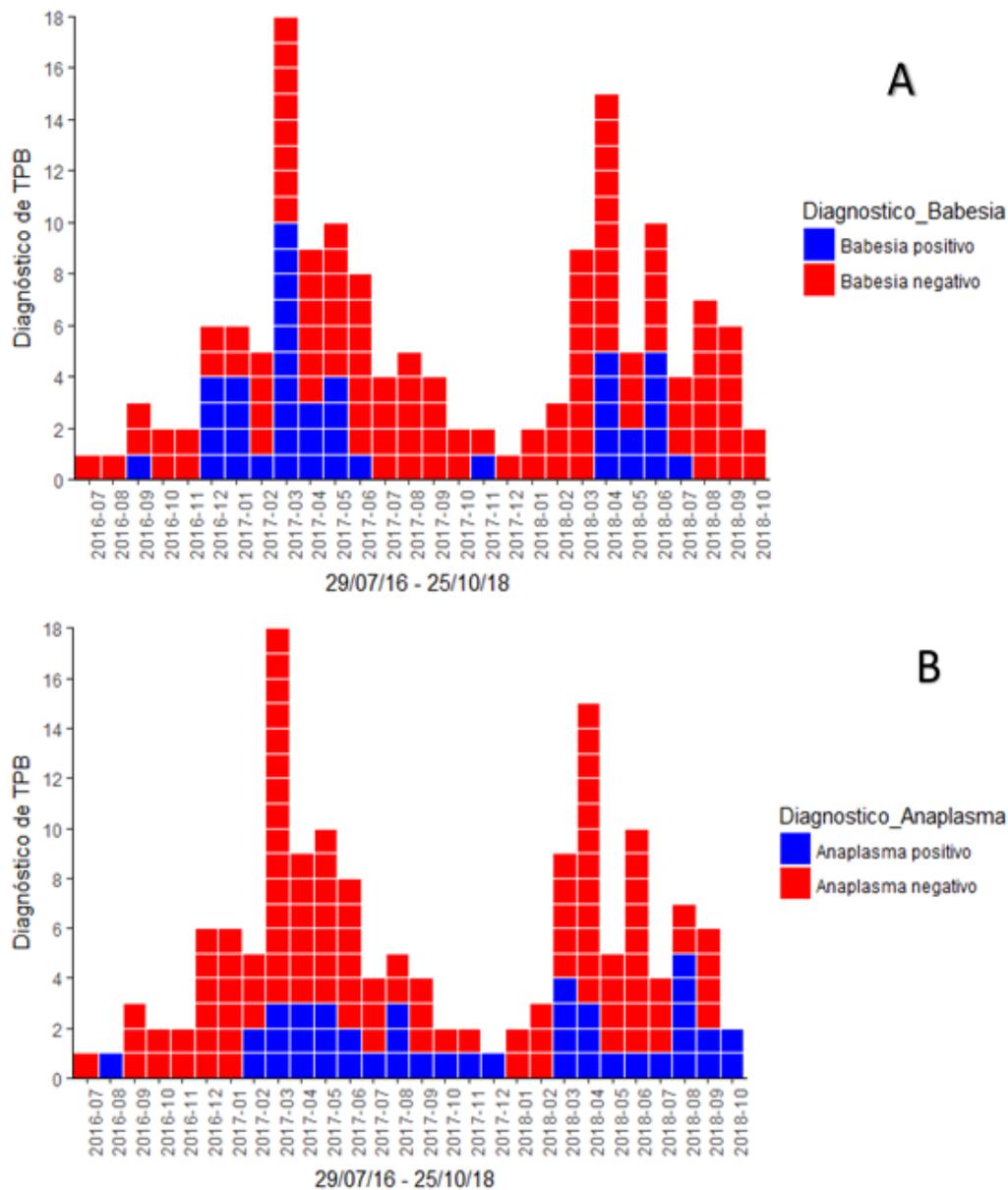
eventualidad, se reportaron brotes fuera de esta región, como son los diagnosticados en Rivera, Tacuarembó, sumado brotes en Soriano, Flores, Lavalleja y Maldonado. En anexo 6 muestran los brotes según agente de la TPB

### Tristeza Parasitaria Bovina



**Figura 9** Se indica en el mapa de Uruguay las seccionales policiales con escala de colores según número de brotes diagnosticados.

Las curvas epidemiológicas presentadas en la figura 10, muestran una marcada estacionalidad para los brotes de babesiosis a fines de enero y mayoritariamente en meses otoñales. Situación diferente muestra la dinámica de anaplasmosis, ya que no respetó un patrón estacional, presentando brotes durante la mayoría de los meses del año.



**Figura 10.** Se representan las curvas epidémicas en relación a los brotes negativos (cuadros rojos) y brotes positivos (cuadros azules). A) Curva epidémica de los brotes de babesiosis. B) Curva epidémica de los brotes de anaplasmosis.

### 6.4.3 Categorías afectadas

En el cuadro V, se observa que la categoría animal más afectada por todos los agentes de TPB fue la vaca, (70%, 68% y 94% para anaplasmosis, babesiosis y mixtas, respectivamente). Particularmente para anaplasmosis, les siguieron las categorías de novillos de 1 a 2 años y vaquillonas de 1, 2 y 3 años. Mientras que, para las babesiosis las categorías que siguieron a las vacas fueron vaquillona de 1 a 2 años y novillos de 1, 2 y 3 años.

**Cuadro V.** Frecuencia relativa categoría animal afectadas por agente de TPB

Categoría	<i>A. marginale</i>	<i>Babesia</i> sp	Infección mixta
Ternero/a	1%	2%	0%
Vaquillona 1 a 2 años	7%	9%	6%
Vaquillona 2 a 3 años	7%	3%	0%
Vaca	70%	68%	94%
Novillo 1 a 2 años	9%	5%	0%
Novillo 2 a 3 años	3%	5%	0%
Novillo más de 3 años	2%	5%	0%
Toro	1%	1%	0%

#### 6.4.4 Indicadores epidemiológicos

De los brotes estudiados, los ocasionados por *B. bovis* fueron lo que provocaron mayor porcentaje de muerte (3%), con una dispersión de morbilidad que se encontró entre el 1 al 32% y una letalidad del 45%. Para los brotes de *B. bigemina*, la morbilidad fue del 4,2%, una mortalidad del 2,1% y letalidad del 44%. Mientras que, los brotes de *A. marginale*, si bien tuvieron una morbilidad del 6%, la letalidad fue del 27% ocasionando un 2% de mortalidad. Para las infecciones mixtas la morbilidad fue de 6%, una mortalidad del 2% y letalidad de 45% (Cuadro VI).

**Cuadro VI.** Indicadores epidemiológicos según agente de TPB expresados en porcentajes

	<i>B. bovis</i>			<i>B. bigemina</i>			<i>A. marginale</i>			Mixtas		
	$\bar{X}$ %	S	Limite%	$\bar{X}$ %	S	Limite%	$\bar{X}$ %	S	Limite%	$\bar{X}$ %	S	Limite%
<b>Morbilidad</b>	6	1	1-32	4,2	0,5	1-14	6	1	1-20	6	1	2-20
<b>Mortalidad</b>	3	0,4	1-12	2,1	0,2	1-6	2	0,3	1-14	2	1	2-14
<b>Letalidad</b>	45	4	20-100	44	3,1	11-100	27	2	4-100	45	5	25-71

$\bar{X}$ : Media, S: Desvío estándar, Limites: Valores máximos y mínimos de los indicadores.

#### 6.4.5 Tasas epidemiológicas

Hubo asociación significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre la tasa de morbilidad e infecciones por *B. bovis*, *B. bigemina*, *A. marginale* e mixtas; todas las tasas de morbilidad son significativamente mayores que la tasa promedio estimada para los establecimientos con resultado de diagnóstico negativo (14 casos por 1000 animales en riesgo) (Cuadro VII).

**Cuadro VII. Tasas de morbilidad**

Morbilidad	Tasa estimada por 1000 animales	RR	IC 95%		p-valor
Intercepto	14	-	-	-	-
<i>Babesia bovis</i>	51	3,67	2,05	6,58	<0,001
<i>Babesia bigemina</i>	28	1,98	1,04	3,75	0,0381
<i>Anaplasma marginale</i>	37	2,62	1,59	4,33	<0,001
Infecciones mixtas	64	4,56	2,51	8,31	<0,001

Existió asociación significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre la tasa de mortalidad e infección por *B. bovis* e infección mixta. Considerando que la tasa promedio estimada para los establecimientos con resultado de diagnóstico negativo es de 15 muertes por 1000 animales (intercepto), la infección por *B. bovis* resultó en una tasa promedio de 39 animales por 1000 animales en riesgo (o 253% mayor que los establecimientos negativos) y los brotes con detección mixta tuvieron una tasa de mortalidad estimada de 43 muertes por 1000 animales (o 285% mayor que los establecimientos negativos) (Cuadro VIII).

**Cuadro VIII. Tasas de mortalidad**

Mortalidad	Tasa estimada por 1000 animales	RR	IC 95%		p-valor
Intercepto	15	-	-	-	-
<i>Babesia bovis</i>	39	2,53	1,35	4,73	0,004
<i>Babesia bigemina</i>	20	1,30	0,64	2,67	0,471
<i>Anaplasma marginale</i>	14	0,89	0,47	1,71	0,730
Infecciones mixtas	43	2,85	1,44	5,64	0,003

Todas las tasas de letalidad de los brotes positivos para cualquier de los parásitos fueron significativamente menores ( $p \leq 0,05$ ) que los brotes negativos. Por ejemplo, la tasa promedio de letalidad en los establecimientos negativos fue de 883 muertes para 1000 afectados, y la tasa estimada para *B. bovis*, la mayor de los parásitos, fue de 681 muertes para 1000 afectados (o 23% menor que en los establecimientos negativos) (Cuadro IX).

**Cuadro IX. Tasas de letalidad**

Letalidad	Tasa estimada por 1000 afectados	RR	IC 95%		p-valor
Intercepto	883	-	-	-	-
<i>Babesia bovis</i>	681	0,77	0,61	0,98	<0,001
<i>Babesia bigemina</i>	482	0,71	0,53	0,94	<0,001
<i>Anaplasma marginale</i>	176	0,36	0,28	0,47	<0,001
Infecciones mixtas	117	0,66	0,51	0,87	<0,001

#### 6.4.6 Signos clínicos y hallazgos de necropsia

Hubo asociaciones ( $p \leq 0,05$ ) entre diversos signos clínicos con el resultado de diagnóstico positivo a TPB. Por ejemplo, las chances del resultar positivo en el material enviado de establecimientos en que el veterinario reportó anemia fue 83,7 veces (o 82,7 veces mayor) las chances de los establecimientos sin relatos de anemia durante el brote. Los signos clínicos con asociación positiva se presentan en el cuadro X. Mientras que otros signos encontrados fueron: debilidad, agresividad, hiperexcitabilidad, abortos, hemoglobinuria (únicamente en babesiosis), temblores, depresión.

También se encontró asociaciones ( $p \leq 0,05$ ) entre diversos hallazgos de necropsia con el resultado diagnóstico positivo a TPB. Por ejemplo, las chances de un resultar positivo en el material enviado de establecimientos en que el veterinario reportó la ocurrencia de bazo muy grande fue 18,2 veces (o 17,2 veces mayor) las chances de los establecimientos con relatos de bazo de tamaño normal en el brote. Los demás hallazgos de necropsia con asociación positiva se presentan en el cuadro XI.

**Cuadro X.** Asociación de signos clínicos con resultados positivos de diagnóstico de TPB

Signos clínicos	RC	p-valor
Anemia *	83,7	<0,0001
Mucosas pálidas	4,8	<0,0001
Emaciación	3,9	<0,0001
Fiebre	2,9	<0,0001
Ictericia	1,7	0,0008
Ataxia	1,7	0,0019
Agresividad	1,7	0,0055

\*Anemia <26% microhematocrito

**Cuadro XI.** Asociación de hallazgos de necropsia con resultados positivos de diagnóstico de TPB

Hallazgos de necropsia	RC	p-valor
Bazo muy grande	18,23	<0,0001
Bazo grande	11,94	<0,0001
Anemia*	11,9	<0,0001
Palidez de la carcasa	3,33	<0,0001
Color del hígado anaranjado	3,01	<0,0001
Ictericia	1,72	0,0008
Líquido biliar espesa	1,54	0,01

\*Anemia: Mucosas pálidas

### 6.4.7 Asociación de riesgo

Se evaluaron dos factores de riesgo, presencia o ausencia de garrapata *R. microplus* en los brotes de anaplasmosis/babesiosis y el riesgo por el uso de algún inyectable (manejo sanitario) 25 días previos a los brotes de anaplasmosis/babesiosis (Cuadro XII).

Se observó una asociación estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre el uso de inyectable y detección de *Anaplasma marginale* y entre la presencia de garrapatas y detección de *Babesia* spp. El riesgo de tener diagnóstico positivo de *A. marginale* después del uso de inyectable fue de 3,96 veces (o 2,96 veces mayor; IC 95%: 1,82-8,65) el riesgo de los establecimientos que no reportaran el uso de inyectable y el riesgo de tener detección de *Babesia* spp. fue de 6,91 veces (o 5,91 veces mayor; IC 95%: 2,83-16,86) el riesgo de los establecimientos que no reportaran presencia de garrapata.

Por otro lado, el factor de riesgo presencia/ausencia de garrapata en los brotes de anaplasmosis obtuvieron un valor de riesgo = 0,85 lo cual indica que no se obtuvieron asociación entre las variables. Puede o no estar presente la garrapata para que se den los brotes de anaplasmosis.

**Cuadro XII.** Asociación de riesgo

Parásito	Factor de riesgo	RR	IC 95%	p-valor
<i>Anaplasma marginale</i>	Uso de inyectable (no vs. si)	3,97	1,82 – 8,65	0,0005
	Presencia de garrapata (no vs. si)	0,85	0,53-1,33	0,507
<i>Babesia</i> spp.	Uso de inyectable (no vs. si)	0,72	0,42-1,22	0,228
	Presencia de garrapata (no vs. si)	6,91	2,83-16,86	<,0001

## 7. DISCUSIÓN

El frotis (tanto de órganos como de sangre) es la técnica más antigua y utilizada de rutina para el diagnóstico de TPB. Tiene una buena sensibilidad y especificidad, cuando se trabaja con muestras en buen estado de conservación y en casos agudos. Sin embargo, la misma baja abruptamente su eficiencia cuando la calidad de las muestras se ve afectada, pudiendo llevar a falsos positivos o falsos negativos (Bose y cols., 1995).

En la práctica veterinaria, es una realidad que en varias ocasiones, las muestras tanto de sangre como de órganos remitidas a los laboratorios de diagnóstico llegan en un mal estado de conservación (congeladas, sin refrigeración, autolíticas, etc.) tornándose difícil realizar un correcto diagnóstico por frotis. En el caso de frotis de sangre y órganos autolíticos generalmente se observa gran proliferación bacteriana, en su mayoría bacilos, con destrucción de los eritrocitos. Así mismo, al momento de la coloración con Giemsa se pueden observar artefactos, estos son estructuras que se colorean con azul, lo cual para un laboratorista no experimentado en la visualización de láminas pueden ser confundidos con hemoparásitos, dando falsos positivos. Situación semejante se presenta cuando se envían materiales congelados, en el cual por el proceso de congelación hay formación de cristales intracitoplasmáticos que provocan ruptura de los eritrocitos (Rastogi y cols., 2013). Otra de las limitantes que

se presenta con el uso de frotis como método único de diagnóstico es la dificultad en la diferenciación de las especies de babésidos, ya que muchas veces, se torna imposible debido a la presencia de formas inmaduras (Canever y cols., 2014). Por estos motivos, uno de los objetivos del presente estudio fue desarrollar una técnica de diagnóstico para la TPB capaz de ser utilizada en conjunto con la técnica tradicional (frotis). Dicha técnica debía ser más sensible que el frotis, permitiendo diagnosticar inequívocamente la especie de patógeno actuante, así como, trabajar con cualquier tipo de muestra y en cualquier estado de conservación. Fue para ello que en este trabajo se desarrolló de una PCRm.

Las herramientas de biología molecular, como es la PCR, son muy utilizadas para el diagnóstico de patógenos y en muchos casos, son pruebas confirmatorias. Para el diagnóstico de TPB, se han diseñado varios protocolos para la detección de sus agentes ya sea en forma individual o en conjunto (Figuroa y cols., 1992, 1993; Torioni y cols., 1998; Canever y cols., 2014). En Uruguay, hasta ahora no se había implementado con éxito ninguna PCRm a tiempo final para diagnóstico de rutina, que permitiera identificar los 3 agentes causales de la TPB.

La principal ventaja de la PCRm a tiempo final es que permite en una sola corrida de PCR amplificar simultáneamente varios patógenos, siendo altamente sensible y específica. Para esto, en el presente estudio se seleccionaron primers específicos, previamente publicados por otros autores, para cada agente. En el caso de las *Babesia* spp. se utilizaron dos pares de primers que amplifican dos fragmentos independientes de la proteína asociada a las roptrias. Si bien, no se conoce con exactitud la función de dicha proteína, se sabe que es específica para los babésidos (Petrig y cols., 2008; Canever y cols., 2014; Figuroa y cols., 1992). Por otro lado, el par de primers utilizados para *A. marginale*, amplifica un fragmento de la proteína de superficie de membrana *mSP-5*, esta proteína es altamente conservada para este género (Torioni y cols., 1998). Para no opacar las bondades de la PCRm, se debe invertir tiempo en planificar el uso eficiente de los primers. Por lo tanto, los primers fueron seleccionados por tener características similares de ciclado (temperaturas de annealing cercanas), no ser complementarios y producir amplicones de diferentes tamaños (> 40 pb de diferencia). Es conveniente, cuando se desarrollan técnicas de PCRm realizar varias pruebas y diluciones, con primers individuales por género y luego combinar los primers, ya que en muchas ocasiones debido a que estos se deben ajustar a temperaturas de annealing “semejantes” a las óptimas, pueden formar dímeros, interfiriendo en la amplificación, o haber una competencia entre los mismos para la utilización de la polimerasa, por ende, bajando la sensibilidad de la técnica (Elnifro y cols., 2000; Bolívar y cols., 2013). Esta competencia entre los primers y disminución de la sensibilidad de la PCRm se demostró al comparar los resultados de las PCRs individuales para cada agente con la PCRm. Si bien la sensibilidad de los primers combinados en la PCRm descendió, los valores de ADN detectados son altamente satisfactorios, ya que fue capaz de detectar un mínimo de  $10^{-2}$  de las diluciones testeadas.

Para superar la limitante del estado de la calidad de las muestras, 30 muestras positivas de sangre y órganos (para los diferentes agentes) fueron sometidas a diferentes condiciones (congelación e incubación a 25°C por 24 y 48hs, para promover la autólisis). Este ensayo tuvo como cometido simular los diferentes tipos de muestras con las que se enfrentan a diario los laboratorios de diagnóstico. La PCRm reportó excelentes resultados cuando se trabajó con muestras congeladas y autolíticas logrando amplificar el ADN parasitario en sangre y órganos en todas las

muestras congeladas menos de 6 meses y en órganos por más de 1 año. Sin embargo, solo se pudo obtener resultados positivos en 3 de las 10 muestras de sangre, congeladas por más de 1 año. Esto puede ser debido a una baja en la eficiencia de la extracción de ADN. La congelación forma cristales que rompen la membrana celular, provocando cambios en el pH que desnaturalizan proteínas y degradan los ácidos nucleicos. Sumado a esto, el estrés oxidativo causado por la congelación/descongelación puede generar por diversos mecanismos daño molecular tanto del ADN, como de proteínas y componentes lipídicos (Chung y cols., 2017).

El frotis demostró tener menor sensibilidad diagnóstica (73%) que la PCRm (99%). Este resultado coincide con estudios de otros autores que reportan que las técnicas de PCR para el diagnóstico de TPB son más sensibles que el frotis (Figueroa y cols., 1993; Bose, 1995; Canever y cols., 2014). Con la PCRm se logró llegar con exactitud a la especie de babésido en el 100% de las muestras estudiadas, comparado con el frotis donde a partir de 82 de muestras positivas para babésidos solo 58 se pudo llegar a diagnosticar el género (69%). Por lo tanto, la PCRm es una excelente herramienta para estudios epidemiológicos discriminados por especies como se reportan en diversos trabajos (Amorim y cols., 2014; Canever y cols., 2014). La especificidad de la PCRm resultó ser inferior que la del frotis (72 vs 98%). Esta baja en la especificidad se debió a que el PCRm necesita cantidades ínfimas de ADN para amplificar y por lo tanto, se obtuvieron resultados positivos en animales no enfermos (portadores). Estos resultados están en concordancia con lo reportado por Oliveira-Sequeira y cols. (2005). Por consiguiente, es importante remarcar que, para la interpretación de los resultados de la PCRm siempre debe ser tomados en cuenta los signos clínicos y hallazgos de necropsias que sean compatibles con TPB.

El presente trabajo demostró que existe acuerdo ( $k=0.68$ ) sustancial (Landis y Koch, 1977) entre los métodos de diagnóstico directos frotis y PCRm aplicados en muestras obtenidas de rodeos con signos clínicos o hallazgos de necropsias compatible con tristeza parasitaria bovina de distintos departamentos de Uruguay.

Una buena herramienta orientativa que debe utilizarse junto con el frotis y PCRm es la medición del porcentaje de anemia realizando microhematocrito. Debido a que los parásitos de la TPB causan destrucción de los eritrocitos esto provoca un grado alto de anemia (Suarez y Noha, 2013; Kocan, 2000). Aunque, el estudio del porcentaje de anemia no demostró tener una correlación entre el grado de anemia y el parásito actuante, si se observó que para estar enfermo por el complejo de TPB el microhematocrito debe ser inferior a 26%.

Los datos históricos de la frecuencia de brotes para la región noreste del Uruguay eran de 69%, 27% y 4% para *Babesia* spp., *A. marginale* e infecciones mixtas, respectivamente (Buroni, 2014). En este estudio se demostró que estos valores han cambiado, y ahora se encuentran con una frecuencia de 43,8% 42,7% y 13,5% para *Babesia* spp., *A. marginale* e infecciones mixtas, respectivamente. Estos resultados marcan un claro aumento en los brotes de anaplasmosis. Si bien, una de las causas citadas para este aumento podría estar explicada por un incremento en los vectores biológicos como garrapatas (Miraballes y Riet-Correa, 2018), en este trabajo se comprobó que *R. microplus* no tuvo una interacción de riesgo ( $RR=0.85$ ) para los brotes de anaplasmosis. Por el contrario, la causa más probable podría estar de la mano de la utilización frecuente de zooterápicos inyectables, ya que, en este estudio, se observó que los animales en los que se utilizaron inyectables tuvieron 2,97 veces más probabilidad de enfermarse con respecto a los que no.

Los sitios donde ocurrieron los brotes se pueden explicar por dos factores. En primer lugar, el muestreo de este estudio fue sesgado, debido a que las ubicaciones donde ocurrieron los brotes son departamentos próximos al DILAVE Paysandú, que por su cercanía tienen cierta facilidad en remitir a este laboratorio. Mientras que, por otro lado, estas zonas del norte del país, son de alta prevalencia para estas enfermedades y sus vectores (Miraballes y Riet, 2018). Sumado a la posible inestabilidad enzoótica que pueden poseer estos animales, teniendo niveles de anticuerpos entre 20 a 79% (Smith y cols., 2000, Solari y cols. 2013).

Si se observan las curvas epidemiológicas (Figura 10) de los agentes causantes de la TPB, se ve una clara estacionalidad presentándose brotes de babesiosis en meses de verano pero, principalmente en otoño. Esto se debe a que los babesídeos necesitan la garrapata *R. microplus* para completar su ciclo biológico y poder ser transmitidas (Bock y cols., 2004) y es en estos meses (verano-otoño), donde hay mayor cantidad de garrapatas (Fiel y Nari, 2013). Por otro lado, en el análisis de las asociaciones de riesgo (Cuadro XII) se constató que hubo 5,91 veces más de probabilidad de tener babesiosis en animales con garrapata con respecto a los establecimientos negativos sin garrapata, lo cual se sobreentendible ya que sin el vector biológico no deberían presentarse casos (Bock y cols., 2004).

Los brotes de anaplasmosis (Figura 10) se comportaron con una dinámica diferente a la de las babesiosis. Esta no tuvo una estacionalidad claramente definida, sino que se reportaron brotes durante casi todo el año. Debido a que no se evidenció una asociación entre los brotes de anaplasmosis y la garrapata (RR: 0,85) es de importancia estudiar con más detalle el o los posibles vectores animados (dípteros hematófagos) ya que no se sabe con certeza la capacidad vectorial que estos tienen o vectores inanimados (como los inyectables), ya que, demostraron asociación de riesgo (RR: 3,97) para que se propague esta enfermedad.

La categoría animal más afectada fue la vaca. Esto se podría explicar principalmente porque esta categoría, si no obtuvo la adecuada inmunidad, no tendrá los suficientes niveles de anticuerpos para controlar los desafíos de la enfermedad. Sumado a que es la categoría que permanece más tiempo en los establecimientos. Los bovinos jóvenes responden más eficientemente frente a la infección, tanto con *Babesia* spp. como *A. marginale*, ya que desarrollan una respuesta inmunitaria rápida induciendo interleukinas-12, interferón gamma y expresión de los ARN mensajeros desencadenando la síntesis de Óxido nítrico (ON). En contrapartida, en bovinos adultos, estos procesos se desencadenan tardíamente (Goff y cols., 2003). El ON tiene un papel fundamental en incrementar la actividad de los macrófagos, monocitos, neutrófilos eliminando los parásitos del organismo (Mahoney, 1972; Jacobson y cols. 1993). También, es importante considerar que el manejo (entrada y salida de animales), el estado nutricional, la presencia de enfermedades intercurrentes y las condiciones del medio ambiente pueden contribuir a la ocurrencia de TPB (Guglielmone, 1995; Bock y de Vos, 2001).

Los indicadores epidemiológicos por agente (morbilidad, mortalidad y letalidad) estudiados no demostraron diferencias con lo reportado por Solari y cols. (2013). Pero existió una dispersión importante de estos valores intrabrotes (límites máximos y mínimos de los indicadores). A su vez, pueden existir diferentes factores externos en cada brote que estén incidiendo, entre ellos, la exposición entre los vectores/huésped, estado inmunitario del rodeo y por último, las variaciones

genéticas existentes entre las cepas actuantes en cada brote. Varios trabajos han reportado que gran parte de los rodeos uruguayos tienen interacción entre vector/huésped pero se encuentran en inestabilidad enzoótica (Miraballes y cols., 2018; Solari y cols., 2013; Smith y cols., 2000).

Las variaciones génicas entre las especies de babésidos han tomado gran importancia en los últimos años, ya que reportes indican que *B. bovis* tendría una mayor patogenicidad que *B. bigemina*. Esto podría deberse a que *B. bovis* tiene mayor capacidad de reorganizar su estructura de membrana haciendo expresar proteínas de superficie al eritrocito parasitado y así evadir el sistema inmune más efectivamente (Guan y cols., 2016; Allred y cols., 2000). En este trabajo se encontró que *B. bovis* tuvo mayor porcentaje de morbilidad y mortalidad que *B. bigemina*. Por otro lado, en el caso de *A. marginale* se han reportado a nivel mundial muchas variantes génicas. Esta diferenciación está basada en estudios realizados con los genes *m脾1a*, que son altamente variables entre las diferentes cepas. Estas variaciones génicas parecen ser muy importantes y estarían involucradas en la virulencia de cada cepa (Quiroz-Castañeda y cols., 2016). En Uruguay, se deberían realizar estudios sobre esta temática de variaciones génicas para saber cuáles son las cepas que circulan en el campo.

Los signos clínicos más frecuentes en los brotes de TPB fueron anemia, mucosas pálidas, emaciación, fiebre e ictericia. Otros signos clínicos descritos con menor frecuencia fueron anorexia, debilidad, agresividad, y abortos, los cuales coincidieron con signos reportados por otros autores (Kessler y cols., 1992). En este trabajo se observó que el 60% de los brotes presuntivos fueron positivos a TPB. La hemoglobinuria fue reportada en los casos de babesiosis, principalmente en *B. bigemina*, como lo reportado por Fiel y Nari (2013) esta es una de las diferencias clínicas importantes con anaplasmosis que se pueden realizar a campo (Solari y cols., 2013). Mientras que, en los brotes provocados por *B. bovis* los signos nerviosos fueron reportados en varias ocasiones (Bock y cols., 2004). Los hallazgos de necropsia observados en los casos de TPB fueron principalmente esplenomegalia, coloración anaranjada del hígado, palidez de la carcasa e ictericia. Otros hallazgos en menor frecuencia fueron: hemorragias subendocárdicas; riñones edematosos; congestión pulmonar y enrojecimiento del encéfalo en los casos de babesiosis por *B. bovis*, coincidiendo con hallazgos de necropsia reportado por varios autores (Rodríguez y cols., 2005, Silva y cols., 2018).

## 8. CONCLUSIONES

La PCRm desarrollada para el diagnóstico de TPB demostró ser una técnica confiable para ser utilizada en conjunto con las técnicas tradicionales. Es más sensible que el frotis y además por ser una herramienta robusta, permite detectar los hemoparásitos en base a materiales en mal estado de conservación, autolíticos o en muestras congeladas. Esto permitiría aumentar la capacidad de detección de animales infectados, mejorando la sensibilidad del diagnóstico confirmatorio y reducir el tiempo de saneamiento de un foco.

Con el estudio del porcentaje de anemia se observó que para estar enfermo por el complejo de TPB el animal debería de tener un porcentaje de microhematocrito inferior a 26%.

La categoría animal más afectada por el complejo de TPB en este estudio fue la vaca, siendo anemia el principal componente de diagnóstico clínico, asociado a mucosas pálidas, emaciación, fiebre, ictericia, ataxia, y agresividad.

Se constató el incremento de la frecuencia de los brotes de anaplasmosis y la asociación positiva con los inyectables, no siguiendo un patrón estacional marcado. Por lo cual, sería necesario determinar en Uruguay cuales son las principales formas de transmisión de esta enfermedad y realizar análisis genéticos de las cepas circulantes para implementar medidas de control.

El estudio epidemiológico demostró la clara estacionalidad para los brotes de babesiosis asociados a su vector *R. microplus*. Para avanzar en el control y epidemiología de la TPB, son necesarios más estudios sobre factores de riesgo y de epidemiología molecular en búsqueda de divergencias génicas entre cepas de los distintos agentes, así como, establecer curvas epidémicas según los agentes causales de TPB.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguirre D H, Neumann R D, Torioni de Echaide S y Mangold A .J.(2011). Perdidas económicas directas por un brote de anaplasmosis bovina en un rodeo de cría del noroeste argentino. Comunicación. Rev Arg Prod An 31 (2): 145-153
2. Ahmed J S. (2002). The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of pirolasmoses. Parasitol Res 88:48–50.
3. Allred D R, Carlton J M, Satcher R L, Long J A , Brown WC, Patterson P E, O'Connor R M y Stroup S E. (2000). The vesmultigene family of *B. bovis* encodes components of rapid antigenic variation at the infected erythrocyte surface. Mol. Cell, 5:153–162.
4. Almeida M B, Tortelli F P, Riet-Correa B, Montiel J L, Soares M P, Farias N A, Riet-Correa F, Schild A L. (2006). Tristeza parasitaria bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-20051. Pesq Vet Bras. 26: 237-242.
5. 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 from Bahia, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 23(3): 328–336.
6. Angus B. (1996). The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. Int J Parasitol 26: 1341–1355
7. Babes V. (1888). Sur l'hémoglobulinurie bacterienne du boeuf. Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des Sciences, Paris 107, 692–694.
8. Barros C S L, Driemeier D, Dutra I S y Lemos R A. (2006). Babesiosis bovina. Ee: Doença do Sistema nervoso de bovinos no Brasil: Coleção Valée. AGNS, Sao Paulo, cap. 16, pp. 87-94.
9. Bock R E y de Vos A J. (2001). Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. Aust. Vet. J. 79, 832–839.
10. Bock R, Jackson L, de Vos A, Jorgensen W. (2004). Babesiosis of cattle. Parasitol 129:247–269.

11. Bolivar A M, Rojas A y Garcia-Lugo P. (2013). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. Avances en biomedicina. Instituto de inmunología clínica. 3(1): 25-33. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4796903.pdf>. Visitado. 20/2/2019.
12. Bose R, Jorgensen W K, Dalglish R J, Friedhoff K T, De Vos A J. (1995). Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. Vet Parasitol 57(1-3): 61-74.
13. Brito L G, Oliveira M C, Moura M M, Silva Netto F G, Cavalcante F A, Marim A D (2006). Extração de DNA a partir de coágulos sanguíneos bovinos. Brasília: EMBRAPA [online] [http://www.cpafr.embrapa.br/publicacoes/2006/bpd43\\_dnabovinos.pdf](http://www.cpafr.embrapa.br/publicacoes/2006/bpd43_dnabovinos.pdf) Visitado 5/2/2019.
14. Buroni F. (2014). Caracterización de la demanda de diagnóstico en bovinos y ovinos en el período 1993-2013, utilizando una base de datos relacional en el litoral oeste del Uruguay. Tesis de grado Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. 64 pp.
15. Callow L L, Mc Gavin M D. (1963). Cerebral babesiosis due to *Babesia argentin*. Aust Vet J. 39:15-21
16. Canever M F, Vieira L L, Reck C, Richter C, Miletti L C. (2014). First Evaluation of an Outbreak of Bovine Babesiosis and Anaplasmosis in Southern Brazil Using Multiplex PCR. Korean J Parasitol 52 (5): 507-511
17. Cardozo H, Nari A, Franchi M, Lopez A y Donatti N. (1984). Estudios sobre la ecología del *Boophilus microplus* en tres áreas enzoóticas del Uruguay. Veterinaria (Montevideo) 20 (86/87): 4-10.
18. Cardozo H, Solari M S y Etchebarne J. (1992). Evaluation of an indirect ELISA for diagnosis of *Babesia bovis* and its use in Sanitari Campign against the *Boophilus microplus* in Uruguay. En: Proceedings of final Research Coordination Meetin of an FAO/IAEA/SIDA, Costa Rica, 185-191.
19. Carelli G, Decaro N, Lorusso A, Elia G, Lorusso E, Mari V, Ceci y Buonavoglia C. (2007). Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. Vet. Microbiol. 124:107–114.
20. Castro R E y Trenchi H. (1955). Fauna Parasitológica comprobada en el Uruguay. Bibliografía Parasitológica Nacional. M.G.A. Uruguay, pp 79.
21. Center for Food Security and Public Health (2008). Babesiosis bovina. Institute for international cooperation in animal biology. Iowa State University College of Veterinary Medicine. [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/babesiosis\\_bovina.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/babesiosis_bovina.pdf). Visitado 5/2/2019.
22. Chung W J, Cui Y, Chen C S, Wei W H, Chang R S, Shu W Y y Hsu I C. (2017). Freezing shortens the lifetime of DNA molecules under tension. Journal of Biological Physics, 43(4): 511–524.
23. Correa W M, Correa G N M, Gottschalik .A. (1978). Bovine abortion associated with *Anaplasma marginale*. Can J Comp Med. 42: 227-228.

24. Coetzee J F, Apley M D, Kocan K M, Rurangirwa F R, Van Donkersgoed J. (2005). Comparison of three oxytetracycline regimes for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. *Vet Parasitol.* 127: 61–73.
25. Costa V M, Ribeiro M F, Duarte A L, Mangueira J M, Pessoa A F, Azevedo S S. (2013). Seroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis, and trypanosomiasis in a Brazilian semiarid region. *Rev Bras Parasitol Vet* 22(2): 207-213.
26. Decaro N, Carelli G, Lorusso E, Lucente M S, Greco G, Lorusso A, Radogna A, Ceci L y Buonavoglia C. (2008). Duplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection and quantification of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20:606–611.
27. Dumler J S, Barbet A F, Bekker C P, Dasch G A, Palmer G H, Ray S C, Rikihisa Y y Rurangirwa F R. (2001). Reorganization of genera in the Families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia, and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of five new species combinations and designation of Ehrlichia equi and „HGE agent“ as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51:2145–2165.
28. Elnifro E M, Ashshi A D, Cooper R J y Klapper P E. (2000). Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clinical microbiology review.* 13 (4): 559-570.
29. Farias N A. (2007). Tristeza parasitaria bovina. En *Doença de Ruminantes e Equideos*. Riet-Correa F, Schild A L, Lemos R A y Borges J R. (Eds). 3a, ed Palloti, Santa María, Vol. 1, Cap. 7, pp. 524-532.
30. Farias N A. (1995) *Diagnóstico e Controle da Tristeza Parasitária Bovina*. Guaíba: Agropecuária. RS, pp80.
31. Fiel C, Nari A. (2013). Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en ruminantes. Ed Hemisferio sur. Pp 665-670.
32. Figueroa J V, Chieves L P, Johnson G S, Buening G M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet Parasitol* 50: 69-81
33. Figueroa J V, Chieves L P, Johnson G S y Buening G M. (1992). Detection of *Babesia bigemina* infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *J. Clin. Microbiol* 30: 2576-2582.
34. Fry M M y Mc Gavin M D. (2007) Bone marrow, blood cells and lymphatic system. En: McGavin M D y Zachary J F. *Pathologic basic of veterinary diseases.* (Eds). 4a ed. Mosby Elsevier, Inc St. Louis, Missouri, Cap. 13: 743-832.
35. Gan S D y Patel K R. (2013). Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9): 1–3.
36. Gayo V, Pison I y Solari M A. (1996). Practicidad en el envío y conservación de muestras de ADN de *Babesia bovis* para su diagnóstico. VI Congreso Nacional de Veterinaria Montevideo Uruguay

37. Goff W L, McEl Wain T F, Suarez C E, Johnson W C, Brown W C, Normine J y Knowles D. P. (2003). Competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on a rhoptry-associated protein 1 epitope specifically identifies *Babesia bovis*-infected cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*10: 38–43.
38. Guan G, Korhonen P K, Young N D, Koehler A V, Wang T, Li Y y Gasser R B. (2016). Genomic resources for a unique, low-virulence *Babesia* taxon from China. *Parasites & Vectors*, 9(1): 2-8
39. Guglielmone A A. (1995). Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.* 57:109–119.
40. Humble R J. (1954). Blood Types Cattle. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, 18(11): 379-89.
41. Jacobson R H, Parrodi F, Wright I G, Fitzgerald C J y Dobson C. (1993). *Babesia bovis*: in vitro phagocytosis promoted by immune serum and by antibodies produced against protective antigens. *Parasitology Research* 79, 221–226
42. Kessler R H, Schenk M A, Madruga C R, Sacco A M y Miquita M. (1992). Tristeza Parasitária dos Bovinos En: Charles T.P. & Furlong J. (ed.) *Doenças Parasitárias dos Bovinos de Leite*. Embrapa-CNPGL, Juiz de Fora, MG. pp: 1-30
43. Kocan K M, de la Fuente J, Blouin E F, Coetzee J F y Ewing S A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol* 167(2-4), 95–107.
44. Laha R, Das M y Sen A. (2015). Morphology, epidemiology, and phylogeny of *Babesia*: An overview. *Trop parasitol* 5(2), 94-100.
45. Landis JR, Koch GG. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159-174.
46. Lequin R M. (2005). Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 51(12): 2415–2418.
47. Lignieres J. (1903). Bovine babesiosis. New investigations and observations on the multiplicity, the evolution and natural transmission of the parasites involved in the disease and on vaccination. *Archives de Parasitologie* 7: 398–407.
48. Mahoney D F. (1972). Immune responses to hemoprotozoa II. *Babesia* spp. En: *Immunity to Animal Parasites* (ed. Soulsby, E. J. L.) New York, Academic Press , pp. 301–341.
49. Mahoney D F y Mirre G B. (1971). Bovine babesiosis: Estimation of infection rate in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Annals Trop Med Parasitol.* 65 (3): 309-317
50. Mangold A J. (2003). El diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis. Exóticas en la región. Sitio Argentino de Producción Animal. Disponible en: [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/parasitarias/Bovinos\\_garrapatas\\_tristeza/42-diagnostico\\_babesiosis\\_y\\_anaplasmosis.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/Bovinos_garrapatas_tristeza/42-diagnostico_babesiosis_y_anaplasmosis.pdf). Visitada 19/2/2019
51. MGAP (2008) Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Ley 18268 para la lucha contra la garrapata *Boophilus microplus* (garrapata común del bovino) del 25 de abril del 2008. *Diario Oficial*. N° 27471, Montevideo

52. Miraballes C, Lara S, Lorenzelli E, Lemos E, Riet-Correa F (2018). Eficacia de dos vacunas, congelada y refrigerada, contra la tristeza parasitaria bovina. *Veterinaria (Montevideo)* 209 (2): 9-13.
53. Miraballes C y Riet-Correa F. (2018). A review of the history of research and control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, babesiosis and anaplasmosis in Uruguay. *Experimental and Applied Acarology*. doi:10.1007/s10493-018-0278-3
54. Mosqueda J, McElwain T F, Palmer G H. (2002a). *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 proteins are expressed on the merozoite and sporozoite surface, and specific antibodies inhibit attachment and invasion of erythrocytes. *Infect. Immun.* 70: 6448–6455.
55. Mosqueda J, McElwain T F, Stiller D, Palmer G H. (2002b). *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infect. Immun.* 70: 1599–1603.
56. Nari A, Cardozo H, Berdie J, Canabaz F y Bawden R. (1979). Estudio preliminar sobre ecología de *Boophilus microplus* (Can) en Uruguay. Ciclo no parasitario en un área considerada poco apta para su desarrollo. *Veterinaria (Montevideo)*. 15 (69): 25-31.
57. OIE. (2014). Manual terrestre de la OIE 2014, Capítulo 2.4.2. Babesiosis bovina. P p. 1-18.
58. OIE. (2015). Manual terrestre de la OIE 2015, Capítulo 2.4.1 Anaplasmosis bovina. Pp. 1-16.
59. Oliveira-Sequeira T C, Oliveira M C, Araujo J P y Amarante A F. (2005). PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *Int J Parasitol.* 35(1): 105–111.
60. Parola P, Roux V, Camicas J L, Baradji I, Brouqui P, Raoult D. (2000). Detection of ehrlichiae in Africa ticks by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 94: 707-708.
61. Petrih R, Ruybal P, Thompson C, Neumann R, Moretta R, Wilkowsky S, Draghi G, Echaide I, Torioni S y Farbera M.(2008). Improved Molecular tools for Detection of *Babesia bigemina*. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1149: 155–157
62. Quiroz-Castañeda R E, Amaro-Estrada I y Rodríguez-Camarillo S D. (2016). *Anaplasma marginale*: Diversity, Virulence, and Vaccine Landscape through a Genomics Approach. *BioMed Research International* 1-18.
63. Radostits O M, Gay C C, Blood D C, Hinchcliff KW. (2002). *Medicina veterinaria: tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. 9a. ed. Madrid, McGraw-Hill . pp: 1495-1501
64. Reinbold J B, Coetzee J F, Hollis L C, Nickell J S, Riegel C, Olson K C y Ganta R R. (2010). The efficacy of three chlortetracycline regimens in the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infection. *Vet. Microbiol.* 145: 69–75.

65. Richey E J. (1981). Bovine anaplasmosis. En: Howard R.J. (Ed.), Current Veterinary Therapy Food Animal Practice. The W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 767–772.
66. Ristic M, (1977). Bovine anaplasmosis. En: Kreier J. (Ed.), Parasitic Protozoa, vol. 4. Academic Press, New York, pp. 235–249.
67. Rodrigues A, Rech R R., Barros R R., Figuera R A. y Barros C S L. (2005). Babesiose cerebral em bovinos: 20 casos. Ciência Rural, Santa Maria, 35(1):121-135.
68. Rodriguez R I, Trees A J. (1996). In vitro responsiveness of *Babesia bovis* to imidocarb dipropionate and the selection of a drug-adapted line. Vet. Parasitol. 62: 35–41.
69. Rastogi V, Puri N, Arora S, Kaur G, Yadav L, SHARMA R. (2013). Artefacts: A Diagnostic Dilemma – A Review. J Clin Diag Res 7(10):2408-2413
70. Rubino M. C. (1964). Compilación de trabajos científicos del Dr. Miguel C. Rubino, M.G.A. Uruguay, pp 772.
71. Sanchis J, Cuore U, Gayo V, Silvestre D, Invernizzi F, Trelles A y Solari M A. (2008). Estudio sobre la ecología del *Boophilus microplus* en tres áreas del Uruguay. XXXVI Jornadas de Buiatría, Paysandú Uruguay.
72. Sevilla R G, Corchero E, Peña J, Habela M A. (2002). Anaplasmosis y borreliosis bovina. Bovis 108: 77–84.
73. Shimada M K, Yamamura M H, Kawasaki P M, Tamekuni K, Igarashi M, Vidotto O, Vidotto M C. (2004). Detection of Anaplasma marginale DNA in Larvae of Boophilus microplus ticks by Polymerase Chain Reaction. Ann N Y Acad Sci 1026: 95-102.
74. Silva T M, Areco W V, Faccin T C, Melo S M P, Figuera R A y Kommers G D. (2018). Caracterização histoquímica no diagnóstico da babesiose bovina por Babesia bovis. Pesquisa Veterinária Brasileira, 38(4):649–658.
75. Smith R D, Evans D E, Martins J R, Ceresér V H, Correa, B L , Petraccia C, Cardozo H, Solari M A y Nari A. (2000). Babesiosis (*Babesia bovis*) stability in unstable environments. Ann. N. Y. Acad. Sci. 916:510–520.
76. Smith T y Kilborne F L. (1893). En: Investigations into the nature, causation and prevention of Southern cattle fever. En Ninth Annual Report of the Bureau of Animal Industry for the Year 1892, Washington, Government Printing Office. pp. 177–304.
77. Soares J, Giroto A, Brandão P, Da Silva A, Franca R, Lopes S, Labruna M. (2011). Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. Vet Parasitol. 180: 203-208.
78. Solari M A, Quintana S. (1994). Epidemiología y prevención de los hemoparásitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en el Uruguay. En: Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Nari A y Fiel C (Eds.)Montevideo: Hemisferio Sur, Cap 24, 481-505.
79. Solari M A, Dutra F y Quintana S. (2013). Epidemiología y prevención de los hemoparásitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en el Uruguay. En: Fiel, C.; Nari, A.

- (2013). Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Ed Hemisferio sur. Cap 28, pp. 657-688.
80. Suarez C E, Noh S (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Vet Parasitol*; 180: 109-125.
  81. Suarez C E, Palmer C H, Jasmer D P, Hines S A, Perryman L E, McElwain T F. (1991). Characterization of the gene encoding a 60- kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46: 45-52.
  82. Swift B L, Settlemire J, Thomas G M. (1978). Inoculation of pregnant heifers at mid gestation with *Anaplasma marginale*. *Theriogenology.* 10: 481-485.
  83. Theiler A. (1910). *Anaplasma marginale* (gen. spec. nov.) The marginale points in the blood of cattle suffering from a specific disease. *Rep Gov Vet Bacteriol* 1908/1909: 7-64.
  84. Theiler A. (1911). Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. First report of the Director of Veterinary Research, Union of South Africa, 7-46.
  85. Todorovic R A. (1974). Bovine babesiosis; its diagnosis and control. *Am. J. Vet. Res.*, 35: 1045-1052.
  86. Torioni S, Knowles D P, McGuire T C, Palmer G H, Suarez C E, McElwain T F(1998). Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *J Clin Microbiol* 36(3): 777-782.
  87. Tortelli F P, Riet-Correa B, Ferreira J L M, Soares M P, Schild A L. (2005). Babesiose cerebral na área de influência do Laboratório Regional de Diagnóstico. *Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico, Pelotas.* 25: 28-35.
  88. Trueman K F, Blight GW. (1978). The effect of age on resistance of cattle to *Babesia bovis*. *Aust. Vet. J.* 54: 301-305.
  89. Vally T y Gentry P A. (2007). Hematopoietic system. En: Jubb, Kennedy and Palmer's. *Pathology of domestic animals.* M Grant Maxie (5a ed).WB Saunders, Edinburgh, Scotland, vol, 3, pp. 239-247.
  90. Vanzini V R y Ramirez L M. (1994). Esterilización de bovinos portadores crónicos de *Anaplasma marginale* con Oxitetraciclina de larga acción. *Memorias del VII Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias.* Buenos Aires. 8-11 de Noviembre de 1991. Pp352
  91. Wright I G, Goodger, B V, Buffington G D, Clark I A, Parrodi F y Waltishbush D J. (1989). Immunopathophysiology of babesial infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83: 11-13.
  92. Yokoyama N, Okamura M, Igarashi I. (2006). Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Vet. Parasitol.* 138:22-32.

93. Zaugg J L, Goff W L, Foreyt W, Hunter D L. (1996). Susceptibility of elk (*Cervus elaphus*) to experimental infection with *Anaplasma marginale* and *A. ovis*. *J. Wildlife Dis.* 32: 63–66.
94. Zintl A., Gray J S, Skerrett H E, Mulcahy G. (2005). Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. *Parasite Immunol.* 27: 115–120.

## 10. ANEXOS

### Anexo I. Planilla de ingreso de muestras y datos epidemiológicos

Fecha Brote:	N° Ficha:	
DR.:	Fax:	
Email:	Tel.:	
Propietario:	Dpto.:	
DICOSE:	Localidad:	
Categoría:	Edad:	
N° de afectados	N° de muertos	Total de animales en riesgo
Diagnóstico presuntivo	<b>TPB</b>	
Material remitido	Sangre	Órganos
		Riñón/Bazo/Corazón/Hígado/SNC
Presencia de garrapata	Si	No
Manejo sanitario 25 días previo al brote (inyectables)	Si	No

### Anexo II. Planilla de síntomas clínicos

<b>Signos clínicos</b>		
Anemia	Si	No
Mucosas pálidas	Si	No
Emaciación	Si	No
Fiebre (> 39.9°C)	Si	No
Depresión	Si	No
Ictericia	Si	No
Muerte súbita	Si	No
Agresividad	Si	No
Hiperexitabilidad	Si	No
Debilidad	Si	No
Ataxia	Si	No
Aborto	Si	No
Hemoglobinuria	Si	No
Temblores	Si	No
Ceguera	Si	No

### Anexo III. Planilla de hallazgos de necropsia.

Hallazgos de necropsia			
Estado corporal*	Flaco (1-3)	Bueno (4-6)	Gordo (7-8)
Palidez	Si		No
Ictericia	Si		No
Hepatomegalia	Si		No
Color hígado	Marrón**	Anaranjado	Rojizo
Tamaño vesícula biliar	Normal	Chica	Grande
Característica líquido biliar	Normal	Líquida	Espesa
Tamaño bazo	Normal	Grande (entre 2 y 3 cm de espesor)	Muy grande (más de 3cm de espesor)
Consistencia bazo	Normal	Compato	Barroso
Riñón agrandado	Si		No
Congestión edema pulmonar	Si		No
Hemorragias subendocárdicas	Si		No
Color orina	Normal	Oscura	Rojiza
Color encéfalo	Normal	Cereza	Blanco
Color músculo	Normal	Pálido	Amarillento

\*Escala de estado corporal del 1 al 8

\*\* Color normal del hígado

### Anexo IV. Límite de detección PCRm.

Fotografías de corridas electroforéticas en gel de agar 1,5%, de diluciones de muestras realizadas por PCR individual por género y PCRm

#### PCR para *B. bovis*, para diluciones de *B. bovis*



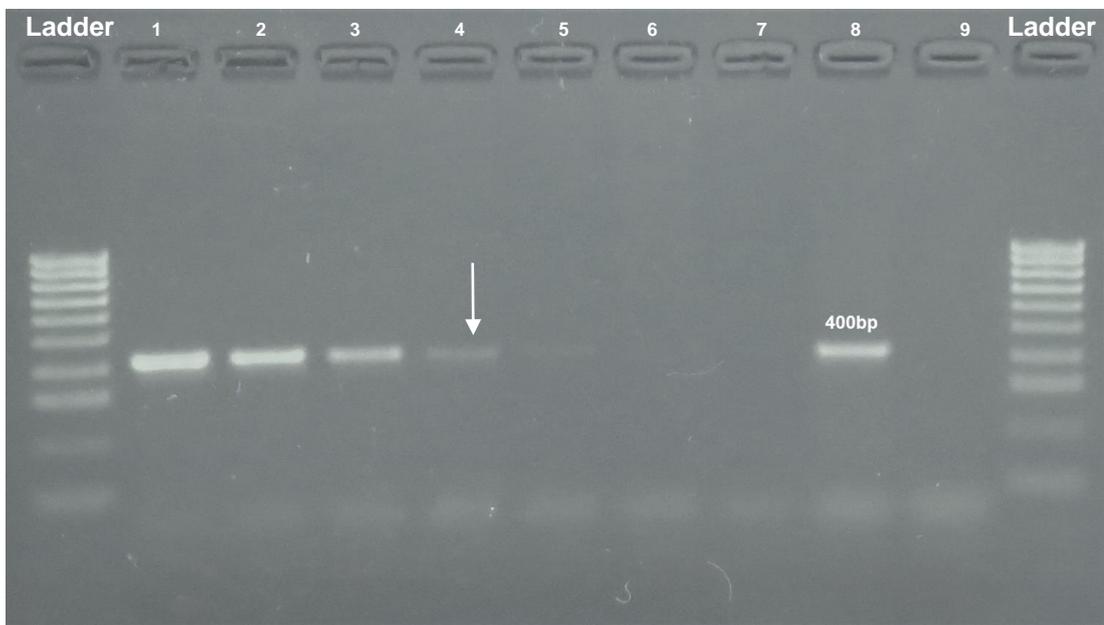
Línea 1 a la 7, diluciones 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100.000, 1/100.000 y 1/1.000.000 respectivamente, Línea 8 control positivo a *B. bovis*, Línea 9 control negativo. Flecha indica límite de amplificación 1/1000 ( $10^{-3}$ )

### PCRm, para diluciones de *B. bovis*



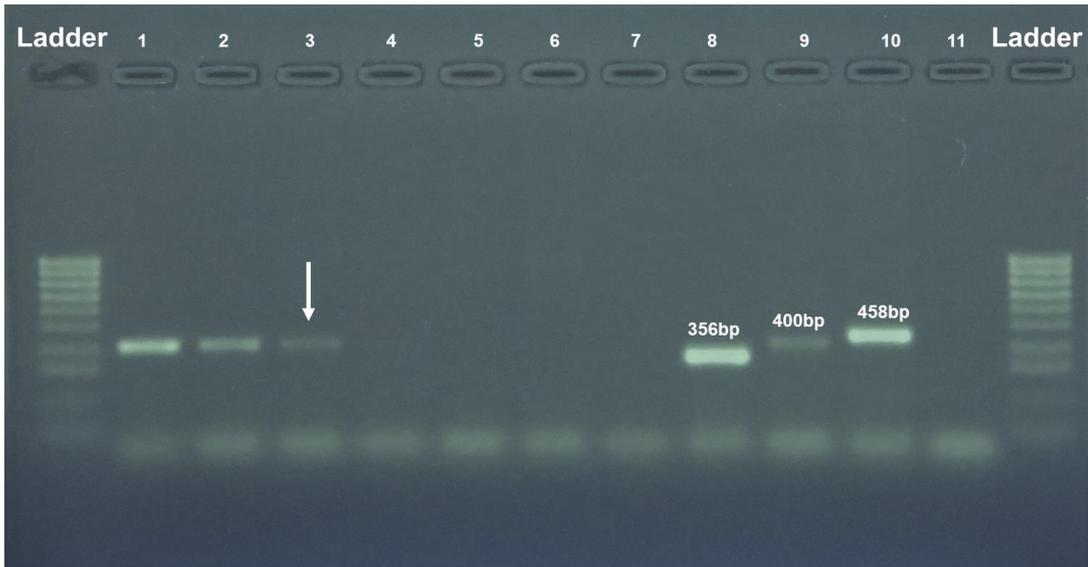
Línea 1 a la 7, diluciones 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/1000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000 respectivamente, Línea 8 control positivo a *B. bovis*, Línea 9 control positivo *B. bigemina*. Línea 10 control positivo de *A. marginale*. Línea 11 control negativo. Flecha indica límite de amplificación 1/100 ( $10^{-2}$ )

### PCR para *B. bigemina*, para diluciones de *B. bigemina*



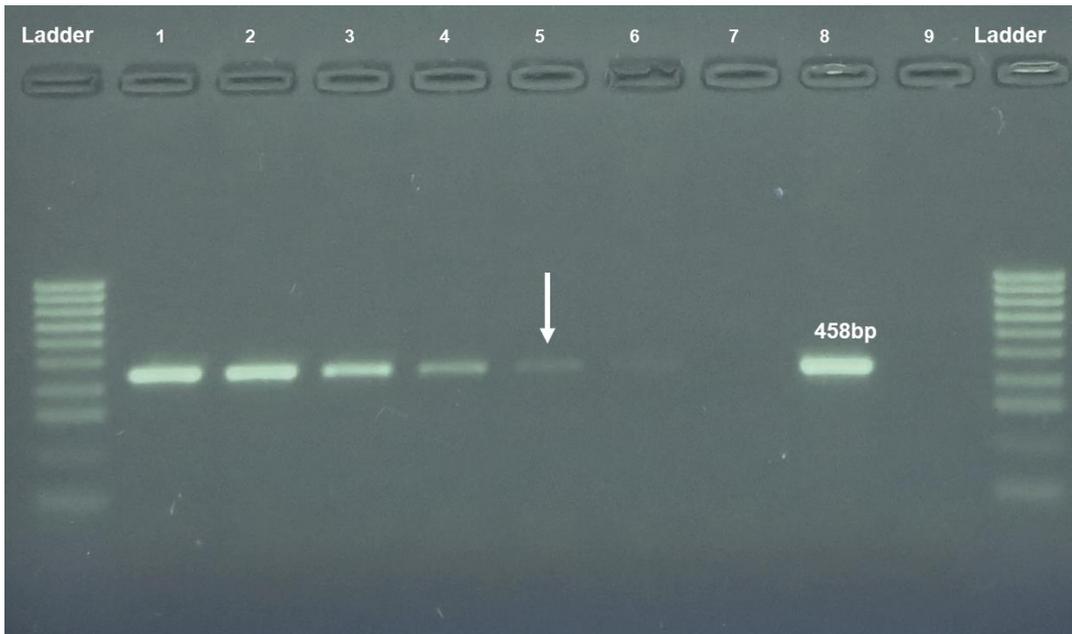
Línea 1 a la 7, diluciones 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/1000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000 respectivamente, Línea 8 control positivo a *B. bigemina*, Línea 9 control negativo. Flecha indica límite de amplificación 1/1000 ( $10^{-3}$ )

### PCRm, para diluciones de *B. bigemina*



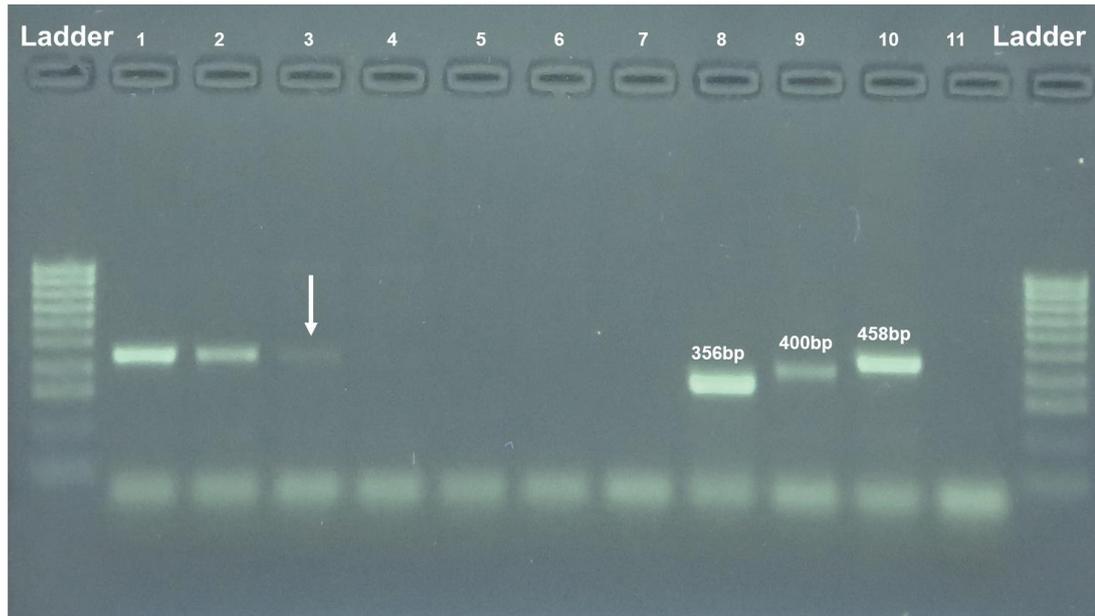
Línea 1 a la 7, diluciones 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/1000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000 respectivamente, Línea 8 control positivo a *B. bovis*, Línea 9 control positivo *B. bigemina*. Línea 10 control positivo de *A. marginale*. Línea 11 control negativo. Flecha indica límite de amplificación 1/100 ( $10^{-2}$ )

### PCR para *A. marginale*, para diluciones de *A. marginale*



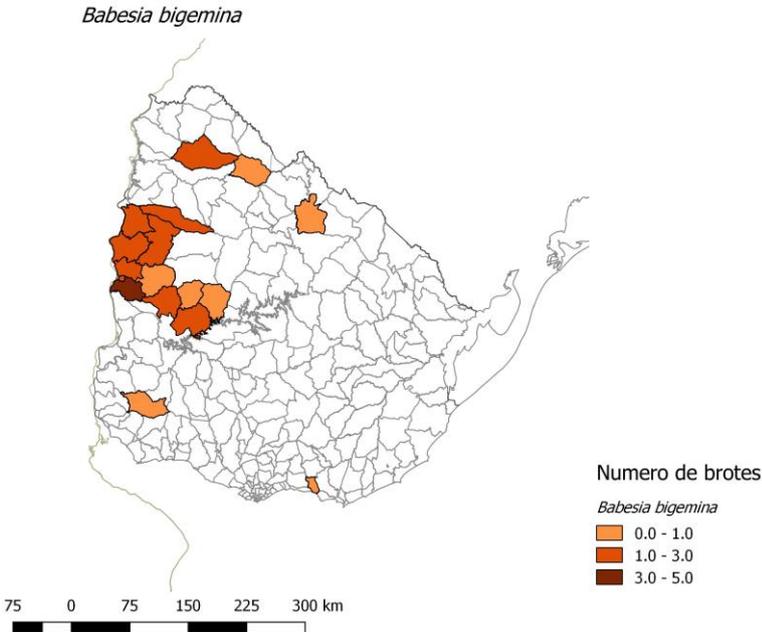
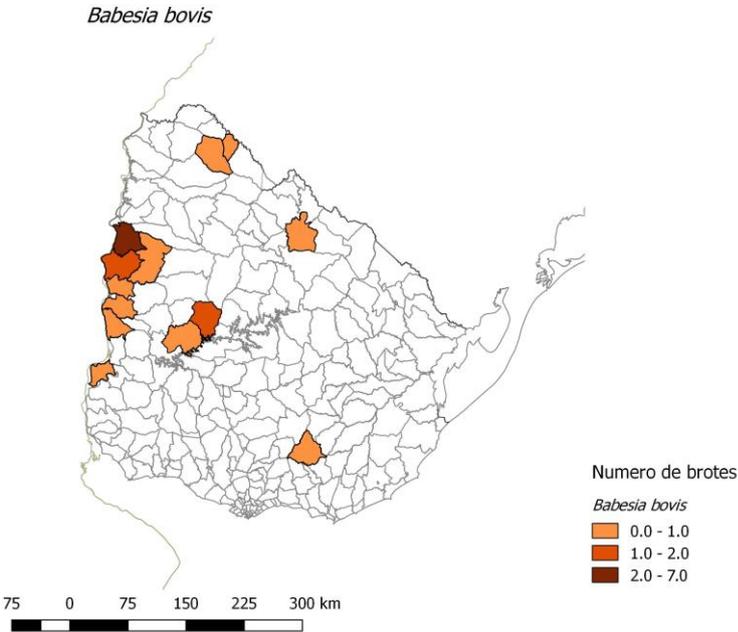
Línea 1 a la 7, diluciones 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/1000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000 respectivamente, Línea 8 control positivo a *A. marginale*, Línea 9 control negativo. Flecha indica límite de amplificación 1/1000 ( $10^{-3}$ )

### PCRm, para diluciones de *A. marginale*

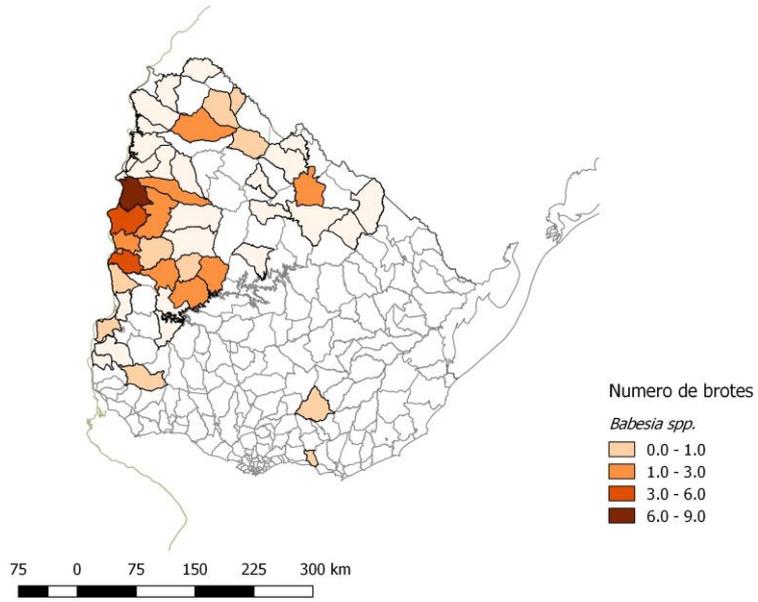


Línea 1 a la 7, diluciones 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/1000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000 respectivamente, Línea 8 control positivo a *B. bovis*, Línea 9 control positivo *B. bigemina*. Línea 10 control positivo de *A. marginale*. Línea 11 control negativo. Flecha indica límite de amplificación 1/100 ( $10^{-2}$ )

**Anexo V. Distribución de brotes de TPB según agente.**



*Babesia spp.*



*Anaplasma marginale*

