

**EVALUACION EPIDEMIOLOGICA DE
ANAPLASMOSIS EN RODEOS BOVINOS DE LA
REGION NOROESTE DE LA PROVINCIA DE
CORRIENTES**

María Fabiana Cipolini Galarza

Tesis presentada como requisito para optar al grado de
**DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL
NORDESTE EN CIENCIAS VETERINARIAS**

Facultad de Ciencias Veterinarias

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

Corrientes, agosto de 2008

**EVALUACION EPIDEMIOLOGICA DE
ANAPLASMOSIS EN RODEOS BOVINOS DE LA
REGION NOROESTE DE LA PROVINCIA DE
CORRIENTES**

María Fabiana Cipolini Galarza

Director:

PhD MV Ernesto J. A. Späth, Grupo de Sanidad Animal
Unidad Integrada de Balcarce (EEA INTA) Buenos Aires

Co-Directora:

MSc. Susana Torioni de Echaide, Laboratorio de Inmunología
Unidad Integrada de Rafaela (EEA INTA) Santa Fe

DEDICATORIA

A mi querido papá, Carlos, que aunque hoy no esté a mi lado físicamente, siempre se encuentra presente en mi corazón dándome el aliento necesario en los momentos difíciles. El fue y seguirá siendo ejemplo de tenacidad y fortaleza en todos los aspectos de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Especialmente a mi esposo por su apoyo incondicional, su acompañamiento y su comprensión en todo momento.

A mis hijos, Luciana, Juan Carlos y Sol, por todo su amor y tolerancia por el tiempo-mamá que supimos resignar para estudiar y viajar.

A mi Codirectora, Susana Torioni de Echaide, por permitirme conocerla y valorarla tanto por su calidez humana como profesional y por su constante apoyo en todo el proceso que demandó la elaboración de esta tesis. Gracias por la permanente enseñanza a través de su ejemplo.

A mi Director, Ernesto Späth, porque me permitió acceder a trabajar en este tema, sin conocerme, y confió en llegar al resultado final a pesar de las distancias.

Al titular de la cátedra, Roberto Jacobo, por su apoyo constante y por permitirme investigar en este tema.

Al Doctor Juan Pedro Resoagli por insistirme.

A la Dra Antonia Santa Cruz, porque me abrió las puertas del INTA Rafaela y me apoyó en el tema elegido. Al Dr. Oscar Racioppi, por ser mi guía espiritual en este maravilloso mundo de los hemoparásitos.

A mi abuelo Félix, que me permitió conocer y disfrutar desde muy niña la vida de campo, y proponerme estudiar porque se morían los toros de una enfermedad llamada “tristeza”.

A las Dras. Graciela Draghi, Bibiana Cetrá, Elbi Alcaraz, y la técnica Chela por su ayuda en la elaboración de las técnicas de laboratorio de INTA Mercedes.

A las Dras. Cecilia Lugaresi y Nerina Aguirre, por su ayuda en la elaboración de las técnicas de laboratorio de INTA Rafaela.

A los Dres. José Bechara y José Pochon, por su aporte de estadística.

A Diana, amiga y compañera de trabajo por su apoyo permanente.

Al grupo de trabajo de Enfermedades Infecciosas, Carlos, Bily, Irina. A mis ayudantes, a Magalí, por su ayuda en las traducciones.

Al Dr. Roberto Martín por permitirme trabajar en el establecimiento que asesora.

A mi amigo Dr. Fabio Clebañer, por permitirme realizar las actividades de campo en su establecimiento.

A Rosario.

A mi mamá y hermanas, por su apoyo constante. A Lorena, por su ayuda con lo relacionado a computación en la confección del trabajo de tesis.

A Dios, por la oportunidad de conocer durante estos años a muchos colegas, compañeros de cursos y alumnos en este proceso de aprendizaje y sobre todo por la felicidad de estar haciendo lo que realmente me gusta, ser VETERINARIA.

INDICE

	Páginas
Capítulo I. INTRODUCCIÓN	1 a 8
Fundamentos de elección del tema	2 a 7
Objetivos	8
Hipótesis	8
Capítulo II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9 a 25
1. De <i>Anaplasma spp.</i>	9 a 12
1.1. Biología general.	9
1.2. Biología molecular.	10 a 12
2. De la enfermedad	12 a 15
2.1. Patogenia	12
2.2. Patología de la anemia.	13 a 15
3. De la respuesta inmune.	15 a 18
3.1. Resistencia natural	15
3.2. Mecanismos de inmunidad adquirida	16
4. Del diagnóstico	18 a 20
5. De la Epidemiología	20 a 25
5.1. Transmisión	22
5.2. Tasa de inoculación.	23
5.3. Tasa de infección.	24
5.4. Valoración del estado epidemiológico.	24
Capítulo III. METODOLOGÍA	26 a 37
1. Selección del área geográfica.	26
1.1. Selección de los rodeos.	26

2. Diseño experimental.	27 a 32
2.1. Tipo de estudio.	27
2.1.1. Estudio longitudinal.	28
2.1.2. Estudio transversal.	29
3. Metodología del diagnóstico.	32 a 33
3.1. Prueba de aglutinación en placa.	32
3.2. Prueba de ELISA de competición.	32
3.3. Reacción en cadena de la polimerasa.	33
4. Análisis de datos.	33 a 37
4.1. De la situación epidemiológica.	33
4.2. De la encuesta epidemiológica.	34
4.3. Concordancia de los test diagnósticos.	34
4.4. Estadística de la información.	35
4.4.1. Estudio longitudinal.	35
4.4.2. Estudio transversal.	36
 Capítulo IV. RESULTADOS	 38 a 57
1. Resultados	38
1.1. Estudio longitudinal.	38 a 47
1.1.1. Resultados del diagnóstico serológico mediante aglutinación en placa (AP)	38
1.1.2. Resultados del diagnóstico serológico mediante C-ELISA.	38 a 41
1.1.3. Comparación de los resultados de las técnicas serológicas: AP y C-ELISA.	41 a 43
1.1.4. Dinámica de anticuerpos evaluados por C-ELISA.	43 a 45
1.1.5.1. Diagnóstico serológico y molecular de Anaplasmosis en el segundo año de estudio en el	

Establecimiento La ELISA (cohorte 3).	45
1.1.5.2. Identificación de una secuencia del gen <i>msp5</i> de <i>A. marginale</i> por PCR.	46 a 47
1.2. Estudio transversal.	47
1.2.1. Resultados del diagnóstico serológico por AP.	47
2. Análisis de datos.	49 a 57
2.1. De la situación epidemiológica.	49
2.1.1 Estudio transversal.	49 a 50
2.1.2. Estudio longitudinal.	51
2.2. De la concordancia de las técnicas.	51
2.3. De la encuesta epidemiológica.	52
2.3.1. Estudio longitudinal.	52
2.3.2. Estudio transversal.	52 a 54
2.4 De la estadística de la información.	54
2.4.1. Estudio longitudinal.	54 a 56
2.4.2. Estudio transversal.	56 a 57
 CAPÍTULO V. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.	 58 a 75
1. Estudio longitudinal.	58 a 65
2. Técnicas diagnósticas.	65 a 67
3. Estudio transversal.	67 a 72
 CAPITULO VI. CONCLUSIONES.	 74
 CAPITULO VII. PROPUESTAS.	 75
 CAPITULO VIII. BIBLIOGRAFÍA.	 76 a 93

APENDICE	xcix - cxxvii
1. Mapa N° 1	xcix
2. Mapa N° 2	c
3. Cromatograma de <i>A.marginale</i>	ci - cii
4. Gráfico N° 9	ciii
5. Gráfico n° 10	civ
5. Gráfico N° 11	cv
6. Gráfico N° 12.	cv
7. Tabla N° 11 (h y variables)	cvi
8. Técnicas diagnósticas	cvii
8.1. Aglutinación en placa (AP)	cvii - cxi
8.2. C-ELISA	cxii - cxviii
8.3. PCR	cxix - cxxiii
9. Encuesta	cxxiv

RESUMEN

La anaplasmosis es una enfermedad infecciosa de los bovinos y otros rumiantes, que se encuentra distribuida mundialmente siendo sus áreas de presentación los climas tropicales y subtropicales por la presencia de los vectores que la transmiten, como garrapatas y tábanos, siendo también importante la transmisión iatrogénica. El *A. marginale* es una rickettsia endocelular que se ubica dentro de los glóbulos rojos. El síntoma principal es la anemia y desmejoramiento progresivo del animal.

El objetivo de la tesis fue la caracterización epidemiológica de la anaplasmosis bovina para evaluar la situación de riesgo en un área endémica, para lo cual se realizó un estudio longitudinal con dos cohortes de terneros menores de 1 año, y un estudio transversal en 20 establecimientos.

Los hallazgos del estudio transversal indicaron una prevalencia real del 92% de animales con anticuerpos contra *A. marginale*. En el estudio longitudinal se evaluó la presencia de anticuerpos calostrales en terneros, evidenciándose, durante los tres primeros meses de vida, la mayor cantidad de inmunoglobulinas en una de las cohortes, para luego, hacia el cuarto mes, volverse similar en ambas cohortes. Mediante la caracterización molecular por PCR de las secuencias encontradas en tres animales, se encontró coincidencia de la cepa de campo con la cepa de *A. marginale* de referencia del GeneBank.

Las conclusiones a las que se arriba son: que los rodeos de la zona endémica se encontraban en estabilidad enzoótica, exceptuando a tres de ellos, en los que se identificó como factores de riesgo la raza y el manejo de los tratamientos ectoparasiticidas. En cuanto a la dinámica de anticuerpos se

comprobó que hubo presencia de anticuerpos calostrales, que una cohorte contaba con esos anticuerpos antes que la otra, y que lo determinante en esas diferencias fue la raza y el manejo de los tratamientos.

Se halló una relación directa entre la tasa de infección, el nivel de anticuerpos calostrales y la persistencia de estos anticuerpos calostrales. Estos anticuerpos muestran un efecto de resistencia ante las infecciones naturales.

Palabras claves: anaplasmosis bovina, *A. marginale*, estabilidad enzoótica anticuerpos calostrales.

ABSTRACT

Anaplasmosis is a bovine and other ruminants infectious disease with a worldwide distribution in both temperatures tropical and subtropical zones because of the presence of vectors that transmit such as ticks and biting flies, being also important iatrogenic transmission. *A. marginale* is an intraerythrocytic rickettsia, which is characterized for producing hemolytic anemia and icterus in acute periods.

The objective of this thesis was the epidemiologic characterization of bovine anaplasmosis to evaluate the risk situation in an endemic area; with this aim it has been done a longitudinal assay with two groups of calves under one year, and a transversal assay in 20 different places.

The findings of the transversal assay indicated a real prevalence of 92% of animals with antibodies against *A. marginale*. In the longitudinal assay it has been evaluated the calostric antibodies presence in calves, demonstrating during the three first months of live, the higher quantity of immunoglobulins in one of the groups, becoming later, towards the fourth month, similar in both groups. Through the molecular characterization of the sequences found in three animals, it has been set up coincidence between the *A. marginale* field stem and the Genbank reference stem.

The reached conclusions are: rodeos from the endemic zone were in enzootic stability, unless three of them, where there were identified, as risk factors, breeds and ectoparasiticide treatments handling. It also has been demonstrated the presence of calostric antibodies, that they were found at first

in one only group, and the determinant factors in that differences were breeds and treatment handling.

It has been found a direct relation between the infection rate, the calostrat antibodies level and their permanence. This antibodies show a resistance effect for natural infections.

Key words: bovine anaplamosis, *A. marginale*, calostrat antibodies enzootic stability.

1 CAPITULO I. INTRODUCCION

Las garrapatas de los bovinos y las enfermedades transmitidas por ellas, son consideradas como uno de los mayores problemas sanitarios para el desarrollo de la producción ganadera en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Payne, & Scott, 1982; Späth, 1986).

La distribución de la anaplasmosis estaba restringida a las regiones tropicales y subtropicales del mundo, entre los paralelos 30° N y S. A partir de 1984, la FAO incluye además zonas templadas de Europa y Asia. En América, se reconoce su presencia al norte del paralelo 45° N (Zaugg *et al.*, 1986). El límite sur de la distribución de *A. marginale* podría ser el extremo meridional de Sudáfrica (34° latitud S), aunque se detectaron brotes en Argentina y Chile aún más al sur (Guglielmone, inédito; Descaseaux, 1924).

En cuanto a la seroprevalencia, los informes de Rogers & Shiels (1979) señalan que en Australia está comprendida entre el 46 y el 90 %. En la India, Gautam & Singh (1971), reconocen un 60% de bovinos infectados con *A. marginale*.

En Latinoamérica la tasa de prevalencia fue superior al 90% (Losos, 1986). En Colombia los resultados serológicos revelaron que éste valor asciende a un 90% en bovinos (Kuttler *et al.*, 1970; Patarroyo *et al.*, 1978; Benavides *et al.*, 2000). En Bolivia, fue del 80 al 90%, demostrado por el test de inmunofluorescencia indirecta (IFA) (Nicholls *et al.*, 1980). Estudios serológicos similares en bovinos demostraron una prevalencia del 78,5% de infección con *A. marginale* en San Salvador (Payne & Scott, 1982), 25% en Santa Lucía (Knowles *et al.*, 1982) y 80 a 90 % en Jamaica (Bundy *et al.*, 1983). En México, Cossio *et al.*, (1997), demostraron que el 69% del ganado estaba infectado en el norte de Veracruz.

En aquellas regiones donde la presentación de la enfermedad es endémica, causa pérdidas considerables. En Estados Unidos, se reportó una mortalidad anual entre 50.000 a 100.000 animales, con un costo de hasta 300 millones de dólares (Losos, 1986). Argentina posee una superficie de aproximadamente 1.000.000 de km², el área endémica señalada se

extiende al norte del paralelo 33° latitud sur con 22.600.000 de bovinos expuestos, los que representan el 35% del stock nacional (Vanzini & Ramirez, 1994; Draghi, *et al.*, 1997).

A través de la campaña de control y erradicación de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* implementada en 1939 como optativa y a partir de 1963 obligatoria, se liberaron 29,14 millones de ha, al sur del paralelo 30° S. Sin embargo *A. marginale* continúa ampliamente distribuida en esa región debido a la acción de otros transmisores y fomites (Anziani, 1979; Signorini *et al.*, 1987; Guglielmone, 1995).

Las pérdidas económicas anuales ocasionadas en Argentina por la garrapata *R. (B) microplus* y las enfermedades por éstas transmitidas en bovinos, han sido estimadas en u\$s 154.637.873 para el año 1992. El 83,2% de las perdidas se adjudicó a los efectos físicos del complejo garrapatas-enfermedades y el 16,7% (31.164.400 u\$s) al control de *R. (B) microplus* y de los hemoparásitos de los vacunos (Späth *et al.*, 1994) (mapa 1).

Los problemas ocasionados por esta garrapata y los agentes que transmite por (*Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*), son conocidos por los productores ganaderos por su efecto adverso sobre la rentabilidad de sus empresas rurales (Späth *et al.*, 1994).

En zonas donde la presentación de esta enfermedad es endémica, se constituyen en una gran limitante para la incorporación de reproductores con alto potencial genético a los efectos de aumentar la producción de los establecimientos del norte Argentino (Vanzini & Ramírez, 1994).

Fundamentos de la elección del tema

En Argentina los datos de reactores serológicos se refieren a campos de cría del norte de Salta y el sur de Tucumán, donde se detectó que la mayoría de los establecimientos tenían más del 70% de sus bovinos infectados con *A. marginale* (*). En la cuenca del Valle Lerma se encontró un 70% de reactores, mientras que un 12% en establecimientos lecheros de la cuenca de Trancas en Tucumán (Habich *et al.*, 1982). En el norte de Santa Fe la seroprevalencia de bovinos con anticuerpos contra *A. marginale* en ganado de cría fue del 17% mientras que para la cuenca lechera del centro de esa provincia la seroprevalencia fue aún menor 7% (Anziani, 1990).

La anaplasmosis es una enfermedad endémica en la provincia de Corrientes: en 1964 Schiffo y Lombardero describieron la presentación de casos clínicos en animales nacidos y criados en la zona. Además, se observó que podía producir alta mortalidad en los bovinos introducidos, como mejoradores de rodeo, desde áreas libres de la enfermedad.

Ante dicha situación, es notorio que no se haya difundido o implementado un sistema de prevención y control por las autoridades sanitarias para subsanar este problema, aún vigente.

La epidemiología de esta enfermedad es más compleja que la babesiosis, ya que intervienen otros transmisores, además de la garrapata, como los dípteros hematófagos de los géneros *Tabanus*, *Stomoxys*, *Chrysops*, *Siphona* y los mosquitos del género *Psorophora* (Ristic, 1968, Siefert, 1998), difundidos ampliamente en el NEA.

La transmisión *A. marginale* en *R. (B) microplus*, especie presente en la Argentina, es transestadial, (Potgieter *et al.*, 1981; Samish *et al.*, 1986; Dalglish & Stewart, 1982) e intraestadial (Potgieter, 1979) no así para las otras especies de garrapatas (Kocan *et al.*, 1992). Los demás transmisores nombrados son vectores principalmente mecánicos, que actúan llevando sangre infectada de un animal enfermo a otro susceptible (Ristic, 1968).

(*) Ríos L. G. de, no publicado.

Es importante agregar que la transmisión por fomites (todo objeto que puede llevar *A. marginale* e infectar a otro animal pasivamente en forma indirecta), además de la iatrogénica, (toda enfermedad transmitida por el veterinario o el hombre en general) por el contacto con sangre en las maniobras comunes de manejo, tienen un rol sustancial en la ocurrencia de brotes de esta enfermedad (Dikmans, 1950; Abdala *et al.*, 1992).

También se demostró la transmisión transplacentaria, la cual ocurre en el último tercio de la gestación (Swift & Paumer, 1978).

Para comprender la epidemiología de la anaplasmosis, es importante destacar que la mayoría de los bovinos son naturalmente resistentes a las infecciones primarias por *A. marginale* hasta los siete a los nueve meses de edad (De Vos *et al.*, 1987; Guglielmone *et al.*, 1992). Pasado ese período la resistencia natural se desvanece paulatinamente y las infecciones primarias tienen la capacidad de inducir la enfermedad clínica; por lo tanto, la gravedad de la enfermedad está en relación directa con la edad de ocurrencia de la primoinfección y la probabilidad de ocurrencia de un brote de anaplasmosis se encuentra en relación directa con la proporción de vacunos que no se infectaron naturalmente hasta los nueve meses de edad y al número de garrapatas y/o transmisores en un establecimiento en particular (Vanzini & Ramírez, 1994). En cuanto al aspecto epidemiológico y la evaluación de riesgo de ocurrencia de brotes, se puede utilizar el criterio sugerido por Mahoney y Ross (1972) desarrollado para babesiosis, que establece como valor crítico para considerar que hay estabilidad enzoótica, la presencia de al menos un 75% de reactores serológicos en el rodeo, en terneros a los 9 meses de edad.

La inestabilidad enzoótica se produce por la variación en la población de los transmisores de *A. marginale* (garrapatas, insectos, etc), entre años o estaciones que trae como consecuencia que una proporción de los terneros no se infecte con *A. marginale*, durante el período de mayor resistencia natural. Por lo tanto, cuando se infectan con la bacteria como adultos (luego que perdieron la resistencia natural), en forma natural o

iatrogénica existe riesgo de ocurrencia de casos de enfermedad clínica aislados o de brotes (Vanzini & Ramírez, 1994).

Sin embargo, es de destacar que Cetra *et al.*, (2000) observaron casos clínicos en terneros al pie de la madre. Vanzini *et al.*, (1999), describieron las circunstancias que inducían a la ocurrencia de brotes de anaplasmosis en la ganadería de cría de Corrientes, debido al reemplazo de los acaricidas órgano-fosforados por los acaricidas a base de piretroides sintéticos, con mayor período residual, como alternativa a la generalizada resistencia de las garrapatas a los órgano-fosforados. Esta situación determinaba que los bovinos no tomaran contacto con el agente durante el período de resistencia (Mangold *et al.*, 1986; Vuotto *et al.*, 1991). Otro de los motivos era la resistencia a las infestaciones con el *R. (B) microplus* debido al alto grado de incorporación de ganado *Bos indicus* (puro o sus cruza con diferentes razas *Bos taurus*), reconocida por Lombardero y Schiffo, (1968); Lombardero *et al.*, (1972); Guglielmone *et al.*, (1990, 1992). Ello induce a una depresión marcada de la población de esta especie de garrapata y por ende, una disminución de la inoculación de los agentes causales de las enfermedades que *R. (B) microplus* transmite a los vacunos.

Cabe considerar que aproximadamente 1.500.000 ha de la región infestada con *R. (B) microplus* en la provincia de Corrientes se encuentra en áreas que permanecen bajo agua la mayor parte del año. Estas áreas son de escasa aptitud para el desarrollo *R. (B) microplus* (Guglielmone *et al.*, 1992). La infección temprana con *A. marginale* es menos probable en los terneros nacidos y criados en estas áreas, los cuales se expondrían a dicho agente cuando se los traslade a zonas no inundadas de un mismo establecimiento (Vanzini *et al.*, 1999). Además de la utilización de superficies destinadas a la agricultura, como arroceras que luego son utilizadas como rastrojo para los bovinos. La combinación del uso de piretroides sintéticos como acaricidas, introducción de ganado cruza *Bos indicus* y campos inundados resultaron en la ocurrencia de brotes de enfermedad.

Antecedentes recabados por el grupo de trabajo Sanidad Animal del INTA Mercedes, Corrientes, (1990 -1999) a través de informes de casuísticas de brotes de babesiosis y anaplasmosis y seguimiento epidemiológico en dos establecimientos ubicados en el departamento de Bella Vista durante 10 años en áreas endémicas de la región, mostraron una baja proporción de reactores positivos contra *A. marginale* (33%) en terneros menores de un año, con un alto riesgo de aparición de brotes. Esto llevó a implementar la vacunación anual a las terneras de reposición, como herramienta de control, con lo que se logró reducir las muertes y casos clínicos. En el otro establecimiento la proporción de terneros con anticuerpos contra *A. marginale* en dos grupos de bovinos evaluados fue 27,7% y 10%, por lo cual se aplicó la misma medida y se logró la estabilidad enzoótica al cabo de 10 años (Cetrá *et al.*, 2000) .

Según datos obtenidos por el mismo grupo de trabajo durante los años 2000 al 2004, sobre 434 muestras de sangre con diagnósticos presuntivos de anaplamosis, 324 (74,65%) resultaron positivas. Este estudio incluyó varios establecimientos de 9 departamentos de la provincia de Corrientes y permitió confirmar la ocurrencia de casos clínicos (Zimmer, 2005).

Los modelos epidemiológicos tienen como fin entender el funcionamiento de una enfermedad compleja y hacer predicciones a partir de la incidencia y/o prevalencia de una determinada enfermedad, sobre las medidas de manejo que se deberían tomar en el futuro. Guglielmone (1991), destacó la importancia de la interacción entre los factores epidemiológicos más importantes para poder formular modelos matemáticos de simulación, como se realizó para babesiosis (Ross & Mahoney, 1974; Smith, 1982; Estrada Peña, 1985).

El modelo matemático de Mahoney y Ross (1972), se fundamenta en el concepto de la tasa de inoculación (h), definida como la probabilidad diaria de que cada uno de los animales del establecimiento pueda recibir la infección y en el hecho de que los terneros son naturalmente resistentes hasta los 9 meses de edad. Originalmente utilizado para

malaria y luego adaptado para babesiosis, no parece haber restricciones, hasta el momento, para su uso en anaplasmosis (Vanzini & Ramírez, 1994); Las limitaciones del modelo se tendrían en cuenta cuando se realizan predicciones de brotes en los casos donde la seroprevalencia a los 9 meses indica inestabilidad, debido a la transmisión iatrogénica de anaplasmosis, por lo cual esa inestabilidad se convertiría en una crítica situación de riesgo.

Cuellar Rivera *et al.*, (2000) lo utilizaron en un estudio sobre babesiosis y anaplasmosis en terneros lecheros del oriente boliviano. Späth *et al.*, (1987), aportaron datos del NOA, mientras que en el NEA no se han hecho estudios diseñados con este fin.

Es necesario disponer de información actualizada sobre la epidemiología de esta enfermedad para Corrientes, para comprender los hechos que ocurren y poder prevenirlos adecuadamente.

El uso de vacunas como medidas preventivas es una herramienta de gran utilidad, sin embargo, antes de iniciar un programa de control mediante la inmunización de los animales susceptibles, conviene que se evalúe la necesidad de su implementación. Hasta el momento, la inmunización se restringe a situaciones puntuales, por ejemplo, para brindar protección a animales susceptibles que van a ser trasladados a zonas donde la enfermedad es enzoótica y cuando los animales susceptibles se encuentran en zonas de inestabilidad enzoótica (Guglielmone, 1991).

Basándose en la problemática de esta afección y la permanente inquietud de las Sociedades Rurales y productores de prevenirla y tratarla adecuadamente, es necesario continuar con los estudios epidemiológicos a escala regional, como así también investigar la respuesta inmunológica de los animales nacidos y criados en la región, a fin de mantener un control efectivo para la anaplasmosis bovina (Anziani *et al.*, 1992)

Objetivos

Objetivo general

Caracterización epidemiológica de la anaplasmosis bovina para evaluar la situación de riesgo de los rodeos en un área endémica.

Objetivos específicos

- 1) Estimar la prevalencia serológica en terneros de un área endémica de la provincia de Corrientes.
- 2) Evaluar la dinámica de la infección natural durante el período de resistencia a la anaplasmosis.
- 3) Identificar factores de riesgo asociados a la ocurrencia de brotes de anaplasmosis.

Hipótesis

Las variaciones constantes del ecosistema modifican dinámicamente el status epidemiológico de la anaplasmosis en rodeos bovinos de áreas endémicas.

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. *Anaplasma sp.*

1.1. Biología General

1.2 Biología molecular

2. La enfermedad

2.2. Patogenia

2.2. Patología de la anemia.

3. Respuesta inmune

4. Diagnóstico

5. Epidemiología

5.1. Transmisión

5.2. Tasa de inoculación

5.3. Tasa de infección.

5.4. Valoración del estado epidemiológico

1. *Anaplasma spp.*

1.1 Biología general.

Anaplasma marginale fue descrito por primera vez por Theiler (1910), quien lo reporta como un parásito intraeritrocítico obligado que se ubica en la periferia de los glóbulos rojos. Se distingue como un corpúsculo esférico de 0,2 a 1,0 μm de diámetro, sin citoplasma, de allí su nombre genérico *Anaplasma*, en tanto que el nombre de la especie, *marginale*, responde a la posición que toma dentro de la célula que infecta (Ristic, 1968; Ristic & McIntyre, 1981). Se caracteriza, como todas las bacterias, por no tener su cromatina rodeada por membrana limitante y por carecer de retículo endoplásmico. Contiene agregados granulares densos en un protoplasma electró-lucido, todo encerrado en una membrana doble de 40 a 50 nm de grosor (Kocan *et al.*, 1978). *A. marginale* fue inicialmente clasificado por sus características fenotípicas junto con organismos del orden

Rickettsiales dentro de la familia *Anaplasmataceae* (Rivera, 1996). En los últimos años, las técnicas de microscopía electrónica, su susceptibilidad a antibióticos y el análisis de las secuencias de ARN ribosomal 16S han permitido modificar su clasificación, colocándola junto con los microorganismos del género *Ehrlichia*, dentro del orden *Rickettsiales* (Inokuma *et al.*, 2001; Drauncourt & Raoult, 1994).

1.2. Biología molecular

Se ha estimado el tamaño del genoma de *A. marginale* entre 1200 y 1260 kpb gracias a la electroforesis de pulso de los fragmentos de restricción obtenidos después de la digestión completa con Sfi I, asimismo se ha determinado la cantidad de G + C en 56 mol %. Filogenéticamente se ha confirmado que este género se encuentra muy relacionado con los géneros *Ehrlichia* y *Cowdria* (Barbet, 1995) y se han incluido en la familia *Anaplasmataceae* a *Anaplasma (Ehrlichia) phagocitophila* que a su vez incluye a *Anaplasma (Ehrlichia) equi* y al agente de la ehrlichiosis granulocítica en humanos *Anaplasma (Ehrlichia) bovis* y *Anaplasma (Ehrlichia) platys* dentro del género, compren de además *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis* (Dumber *et al.*, 2001).

A. marginale es una de las rickettsias mejor estudiadas hasta la fecha. Actualmente se conocen cinco proteínas localizadas en su membrana celular, que se denominan proteínas principales de superficie (*major surface proteins*, *MSP*) con números consecutivos del 1 al 5.

MSP1 es un heterodímero, es decir la proteína está compuesta de dos polipéptidos heterogéneos no relacionados, *MSP1a*, que esta codificada por el gen *msp1 β 1* y *msp 1 β 2* (Barbet *et al.*, 1987; Viseshakul *et al.*, 2000; De la Fuente *et al.*, 2001). El peso molecular aparente de *MSP1a* es de 105kDa pero varía de acuerdo con un número variable de secuencias repetidas cada una de 28 a 29 aminoácidos, ubicadas en la parte variable de la proteína (Palmer *et al.*, 1988).

MSP2 es una proteína de aproximadamente 36kDa (Tebele *et al.*, 1991) y en su estado nativo, es decir cuando se aísla de extractos crudos de la rickettsia, es capaz de inducir una respuesta parcialmente protectora contra aislados homólogos y en menor grado contra aislados heterólogos, cuando se inocula a animales menores de un año (Palmer *et al.*, 1988). Esta proteína está codificada por una familia multigénica que permite la presentación de variantes durante los diferentes ciclos de rickettsemia presentes en un solo animal (French *et al.*, 1998). Este polimorfismo está íntimamente relacionado con la permanencia de *A. marginale* en los animales portadores ya que aún cuando se recuperan de una primo-infección, si la rickettsia no es eliminada, surgen variantes de la misma (variantes de *MSP2*). Este mecanismo genera una nueva respuesta de anticuerpos capaz de reconocer y eliminar las nuevas variantes (Kieser *et al.*, 1990), de esta forma se han determinado que surgen de 3 a 6 variantes de *MSP2* cada 6 a 8 semanas en animales portadores, es decir en cada ciclo de rickettsemia.

MSP3, es una proteína de aproximadamente 86 kDa, que se presenta en forma polimórfica dentro de una misma infección y entre aislados.

MSP4, es una proteína de aproximadamente 31 kDa, está codificada por un solo gen y los anticuerpos monoclonales reconocen el homólogo de aquélla en aislados de diferentes regiones geográficas distantes.

MSP5 es una proteína de bajo peso molecular, aproximadamente 19kDa, que se ubica en la superficie de la rickettsia, está codificada por un solo gen, lo que indica que debe tener una función de importancia en la conservación de la especie; se ha reconocido su homólogo en todos los aislados geográficos hasta ahora probados. Estructuralmente se presenta en forma multimérica unida por puentes disulfuro, que la ayudan a mantener su conformación terciaria (Visser *et al.*, 1992), necesaria para su reconocimiento por anticuerpos de bovinos expuestos. También se expresa en las provenientes de garrapatas infectadas.

2. La enfermedad

2.1. Patogenia

En el huésped vertebrado, *Anaplasma* infecta eritrocitos maduros formándose una vacuola alrededor del parásito (Francis *et al.*, 1979). Dentro del eritrocito, la rickettsia se replica por fisión binaria pudiendo contener hasta 8 organismos individuales dentro de una sola vacuola (Ristic *et al.*, 1968). Los anaplasmas salen del eritrocito utilizando un mecanismo no bien definido, pero aparentemente no lítico, e infectan eritrocitos adicionales (Figueroa *et al.*, 1993). Después de la introducción en un huésped rumiante, el número de eritrocitos infectados se incrementa aparentemente al doble cada 24 a 48 horas. La infección se hace patente microscópicamente (alrededor del 2% de parasitemia) de dos a seis semanas después de la transmisión, dependiendo del número y virulencia de organismos transmitidos. A partir de allí la parasitemia crece rápidamente en animales sensibles, y alcanza valores entre 5 y 15 % en animales mantenidos en corrales, mientras que puede llegar a 70% en animales experimentales esplenectomizados. (Ristic & McIntyre, 1981). Se desarrolla una anemia severa que persiste durante una a dos semanas. Los animales susceptibles pierden peso significativamente y pueden abortar si están preñados. Se ha informado de hasta 36% de mortalidad en ganado con infección aguda (Alderink & Dietrich, 1982). Los eritrocitos infectados con *Anaplasma* son rápidamente eliminados de la sangre conforme se desarrolla la inmunidad. Después de recuperarse de la infección aguda, los animales permanecen infectados con un bajo número, microscópicamente no visible, de *Anaplasma* en la sangre (Kreier *et al.*, 1964). El número de eritrocitos infectados en esta infección persistente, denominado estado de portador, varía dramáticamente de ($>0,000025\%$ a $<0,0025\%$) tanto entre animales portadores como dentro de un mismo individuo, a lo largo del tiempo (Eriks *et al.*, 1989, 1993). Esta variación puede influenciar significativamente la eficiencia de la transmisión por artrópodos a partir de animales individuales (Garfias Bautista, 1996).

2.2. Patología de la anemia

El mecanismo por el cual se produce una severa anemia en bovinos con anaplasmosis se debe a un incremento de la destrucción de los glóbulos rojos. Baker *et al.*, (1961) demostraron que la anemia se debe a un aumento de la destrucción de los glóbulos rojos. Utilizando eritrocitos marcados con Cr 51 determinaron que la supervivencia de los mismos durante la crisis hemolítica en terneros esplenectomizados e infectados experimentalmente con *A. marginale* era 10 veces menor que el valor normal; ello se debería a un incremento de similar magnitud en el catabolismo de los eritrocitos por el sistema reticuloendotelial (S.R.E.). Por lo tanto la anemia se debía a una aguda hemólisis extravascular, fundamentalmente por la acción catabólica del S.R.E. sobre los eritrocitos físicos o químicamente alterados por *A. marginale* y sobre aquellos glóbulos rojos parasitados o no previamente sensibilizados por auto anticuerpos. Se descarta una lisis intravascular por la ausencia de hemoglobinuria en esta enfermedad (Siefert, 1998).

Otras alteraciones orgánicas que se producen durante este período están relacionadas con la hiperactividad e hiperplasia del S.R.E. (Ristic, 1960; Trueman & Wilson, 1980; Poncet, 1987). Si bien las células de este sistema están presentes en todos los órganos, son más abundantes en el bazo y en el hígado; esto resulta en hepato y esplenomegalia con aumento de la friabilidad del bazo, que predispone a su ruptura (Anziani *et al.*, 1981).

Acompañado a estos procesos patológicos se observó también leucocitosis, aparte de un aumento de los neutrófilos juveniles; mientras que Otin *et al.*, (1980) señalaron una disminución de monocitos, eosinófilos y basófilos durante el pico de la anemia; estando los linfocitos aumentados en forma absoluta y relativa durante la convalecencia de la enfermedad.

Como consecuencia de la elevada destrucción de los glóbulos rojos, disminuyen los valores de hemoglobina. El aumento del catabolismo de la hemoglobina produce un aumento de la bilirrubina circulante, que supera la capacidad de conjugación por parte del hígado para su excreción como ácidos y sales biliares. Cuanto mayor es la destrucción de

glóbulos rojos mayor es la cantidad de bilirrubina sérica total y de bilirrubina conjugada en los líquidos corporales, resultando el color amarillo característico de los distintos tejidos (ictericia). También son muy elevados los valores de urobilinógeno fecal (Jones & Brock, 1966).

Sharma & Bansal (1986) demostraron otras alteraciones orgánicas como aumentos significativos en los niveles de histamina, serotonina y cortisol, así como un marcado descenso del número de plaquetas. La histamina y la serotonina serían las responsables de la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad capilar y el éstasis vascular que se observa en algunos casos clínicos de anaplasmosis, similar a lo observado por Wright (1978) en la babesiosis bovina.

Los niveles de las proteínas plasmáticas sufren modificaciones cuali-cuantitativas. Allen *et al.*, (1981) observaron un descenso de las albúminas y aumento de las α y δ globulinas en vacas infectadas experimentalmente. El descenso de las albúminas es una respuesta común a muchas enfermedades infecciosas y se debería a un balance de nitrógeno negativo, facilitado por la anorexia que se produce en la anaplasmosis. El aumento de la α globulinas tendría relación con la participación en los procesos inflamatorios con destrucción de los tejidos, en tanto que la fracción δ obedecería a la respuesta inmunitaria contra la bacteria.

El normal funcionamiento de los ovarios se ve afectado durante el período máximo de anemia. Swift *et al.*, (1984) observaron anestro en vaquillonas inoculadas experimentalmente, juntamente con una caída de los niveles de 17β estradiol y progesterona. La disminución de la síntesis hormonal sería una consecuencia de la falta de oxígeno debida a la anemia.

En vaquillonas infectadas experimentalmente con *A. marginale* en el último tercio de preñez se observó una disminución de la tensión de oxígeno en los fetos, lo cual ocasionaría la muerte por anoxia y el consecuente aborto (Fowler & Swift, 1975; Swift, & Paumer, 1978).

Swift *et al.*, (1979) determinaron también que la enfermedad produce infertilidad temporaria en toros infectados experimentalmente. El estudio histopatológico reveló diferentes grados de degeneración testicular. En la evaluación del semen se comprobaron anomalías morfológicas que variaban entre el 44 al 79%, con respecto a exámenes efectuados antes de la inoculación. Todos estos cambios fueron acompañados con pérdida total de la libido. Estas alteraciones temporarias se deberían a la oxigenación deficiente y a la pirexia que se observa durante el período de máxima anemia.

Al final de este período se define el curso de la enfermedad, ya que el animal se recupera o sobreviene la muerte. Ésta se produce en animales adultos generalmente y se debe a falla cardíaca como consecuencia de la intensa anoxia tisular que acompaña a la anemia (Jones & Brock 1966).

3. La respuesta Inmune del huésped

Los mecanismos de respuesta inmune, determinan que ésta sea innata o natural y adquirida.

3.1. Resistencia natural

La resistencia natural de los animales a la anaplasmosis, depende de las características genéticas del individuo, así como de la edad o la raza. Se comprobó que la anaplasmosis generalmente es moderada en terneros de hasta una año de edad; aguda pero raramente fatal en animales de hasta dos años de edad; aguda y ocasionalmente fatal en bovinos de hasta tres años de edad e hiperaguda y frecuentemente fatal en animales de más de tres años de edad. Cabe señalar que la crisis aguda comúnmente se manifiesta de manera inesperada, sin haber existido una evidencia previa de la enfermedad (Ristic & Carson, 1977).

Con respecto de los fenómenos de resistencia relativos a la raza de los animales *Bos taurus* (bovinos tipo europeo) o *Bos indicus* (tipo cebuino), tradicionalmente se ha considerado que animales cebuinos puros y sus cruces hasta en $\frac{3}{4}$ partes sangre cebú, son

más resistentes a la infección por anaplasmosis (Parker *et al.*, 1985). Se ha confirmado que los bovinos *Bos indicus* son más resistentes a la infestación por garrapata, lo que podría simular una resistencia a anaplasmosis (Lombardero & Schiffo, 1968). La resistencia en relación al sexo se ha reportado más en virtud del daño que la enfermedad ocasiona en sementales, los cuales pierden temporariamente su capacidad para reproducirse, que en términos de verdadera resistencia de un sexo sobre otro a la anaplasmosis.

3.2. Mecanismos de inmunidad adquirida

Para entender los mecanismos de inmunidad que intervienen en la resolución de la anaplasmosis, habría que analizar los eventos que ocurren durante el proceso inicial de la primoinfección y los eventos que ocurren en la resolución de exposiciones subsecuentes como las que suceden en animales que habitan zonas endémicas.

El proceso de infección por *A. marginale* en el bovino, comienza cuando los cuerpos iniciales de rickettsia son inyectados por la garrapata u otro transmisor a partir de formas que se alojan en las glándulas salivales (Kocan *et al.*, 1988). Estas formas infectan al eritrocito sano, célula que carece de núcleo y de receptores correspondientes al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), hecho que las hace inmunes a la acción de linfocitos citotóxicos de clase I o clase II.

El proceso de invasión del cuerpo inicial es mediado por las proteínas de superficie MSP1 a y MSP1 b, que se unen como adhesinas (McGarey & Allred, 1994; Barbet, 1995; De la Fuente *et al.*, 2001). De estas dos proteínas, la primera parece tener también un papel importante en la adherencia de los cuerpos iniciales en la garrapata, en contraste con la segunda que parece tener afinidad exclusivamente por el eritrocito, más aún, esta misma proteína parece tener un papel relevante en la transmisión de ciertos aislados de la rickettsia a través de garrapatas. Estos estudios fueron desarrollados sobre garrapatas del género *Dermacentor* (Barbet *et al.*, 1999).

Una vez fagocitado el eritrocito se inicia el procesamiento antigénico, el cual incluye la desnaturalización y la digestión parcial de las proteínas de *Anaplasma* (Brown *et*

al., 1998), de tal manera que se rompen en péptidos cortos. Posteriormente un número limitado de péptidos se relaciona de modo no covalente con las proteínas del CMH de clase II, los cuales se transportan a la superficie del macrófago donde pueden ser detectados por células T cooperadoras CD4 + (HT CD4+). La activación de la célula HT CD4+ induce la producción de la interleucina 2 (IL 2) (Valdez *et al.*, 2002).

Las células T cooperadoras que participan en la respuesta inmune incluyen células HT 1, especializadas en la producción de IL 2 e interferón gamma, que estimulan la síntesis de Ig M e Ig G2 por las células B y activan a los macrófagos (DeFranco, 1993), sin embargo también se presenta una respuesta de células Th2 que secretan IL 4, IL 6, e IL10, citocinas que estimulan también células B pero hacia la producción de Ig. G 1. Las células B se pueden activar al reconocer a un inmunógeno en su forma libre y no transformada, este reconocimiento lo realizan a través de sus receptores de antígeno o anticuerpos de superficie (Brown *et al.*, 1998).

Estudios acerca de las diferentes capacidades de los isótopos de las inmunoglobulinas G del bovino indican que Ig G2 a diferencia de IgG 1, está relacionada con la resolución de procesos infecciosos (McGuire *et al.*, 1979; McGuire & Musoke, 1981), capacidad que se ha confirmado en el caso de anaplasmosis bovina ya que estos anticuerpos de animales inmunes son capaces de opsonizar eritrocitos infectados y ser más rápidamente fagocitados (Cantor *et al.*, 1993), a diferencia de Ig G 1 que no es capaz de mediar la fagocitosis por neutrófilos o monocitos (McGuire & Musoke, 1981). La importancia de la Ig G2 en los procesos de inmunidad contra anaplasmosis se ha comprobado recientemente, ya que animales vacunados con extractos de membranas de rickettsia, presentan una respuesta de Ig G2 pero no de Ig G1 en los animales protegidos contra el desafío homólogo (Brown *et al.*, 1998), lo que también sucede al vacunar animales con cuerpos iniciales purificados de rickettsia y desafiados en forma heteróloga (*).

* Rodríguez *et al.*, datos no publicados

Los antígenos responsables de esta estimulación han sido parcialmente definidos y entre ellos se encuentra principalmente la MSP2, la MSP3 (que comparte secuencias con MSP2) y otros antígenos no especificados (Brown *et al.*, 1998).

4. Diagnóstico:

4.1. El diagnóstico clínico se realiza por identificación de los signos más comunes: anemia, ictericia, taquicardia, taquipnea, hipertermia, constipación, abortos. Éstas son compartidas con varias enfermedades, por lo que su valor absoluto es escaso si no se considera la historia clínica del rebaño, el ecosistema, sus noxas predominantes y el traslado de vacunos de un lugar a otro.

Conjuntamente la presencia de las alteraciones macro y microscópicas a través de la necropsia e histopatología ayudan al diagnóstico (Siefer, 1998). Los hallazgos más notorios a la primera apreciación visual, son la anemia e ictericia generalizada. La esplenomegalia es evidente y en los casos de muerte por ruptura esplénica se nota un coágulo abdominal de grandes proporciones. La hepatomegalia también es frecuente, el hígado presenta los bordes redondeados, el parénquima de color amarillo oscuro; la vesícula biliar está generalmente repleta de bilis (Losos, 1986).

La sangre constituye el único material de valor para confirmar el diagnóstico, tanto del animal vivo como muerto.

4.2. El diagnóstico de laboratorio consta de dos partes: a) la identificación del agente causal por microscopía (frotis sanguíneo) junto a los análisis complementarios de diagnóstico; b) el diagnóstico inmunológico por pruebas serológicas (Torioni de Echaide *et al.*, 1998; Luis De la Rue *et al.*, 1992) y por la detección de antígenos por sondas de ácido desoxirribonucleico.

Se han desarrollado pruebas *ELISA* para identificar anticuerpos contra *A. marginale* en suero bovino (Duzgum *et al.*, 1988; Ndung'u *et al.*, 1995; Knowles *et al.*, 1996). *ELISA* es una prueba sensible y específica y brinda la posibilidad de una mejor interpretación de

los resultados (Duzgum *et al.*, 1988). En 1986, Palmer *et al.*, realizaron un *ELISA* utilizando la proteína MSP3, pero actualmente se ha comprobado que ésta presenta epitopes comunes con *A. ovis* y no se encuentra conservada entre los diferentes aislamientos de *A. marginale* por lo que el uso, en el diagnóstico en general, de la proteína nativa o recombinante no es recomendado (Allegan & Barbet, 1996). El uso de la proteína MSP5 como antígeno ha mostrado buenos resultados en la detección de diferentes especies del género *Anaplasma* (Ndung'u *et al.*, 1995).

Para mejorar los parámetros de sensibilidad y especificidad se han desarrollado técnicas de diagnóstico utilizando anticuerpos monoclonales (Trueblood *et al.*, 1991) y antígenos recombinantes (Knowles *et al.*, 1996; Torioni de Echaide *et al.*, 1998). El establecimiento de un ensayo de *ELISA* competitivo (*c-ELISA*) utilizando la proteína recombinante MSP5, permitió el incremento de la sensibilidad a un 96% y la especificidad de un 95%, pudiendo detectar las infecciones persistentes del parásito (Torioni de Echaide *et al.*, 1998).

El *c-ELISA*, es de competición e inhibición para la detección de anticuerpos bovinos contra MSP5. Fue desarrollado por el uso de la fusión de una proteína purificada recombinante MSP5 y el anticuerpo monoclonal MAb ANAF16C1 (Torioni de Echaide *et al.*, 1998).

Una proteína, el epitope MSP5, proteína de superficie, definido por anticuerpos monoclonales (MAb) ANAF16C1, es conservado entre las especies de *Anaplasma* y es expresado en las glándulas salivales de garrapatas infectadas. Detecta anticuerpos anti-proteína de superficie MSP5, la cual está conservada en todas las especies de *Anaplasma* (Torioni de Echaide *et al.*, 1998).

Torioni de Echaide *et al.*, (1998), optimizaron un *PCR "nested"* acoplado con análisis de secuencia e hibridación para identificar el gen *msp5* de *A. marginale*, siendo capaz de detectar hasta 30 eritrocitos infectados por mililitro de sangre, lo cual hace de 10-100 veces

más sensible que los *PCR* descritos por Eriks *et al.*, (1989); French *et al.*, (1998); Gale *et al.*, (1996); Ge *et al.*, (1997).

5. Epidemiología:

La existencia de inmunidad previa, la velocidad de transmisión y la edad a la que ocurre el primer contacto con la rickettsia (primoinfección), determinan el efecto clínico que causará el mismo en el huésped. Por ejemplo, el cuadro clínico típico de la infección aguda por *Babesia* y *Anaplasma* únicamente se observaron en animales adultos susceptibles; en condiciones naturales esto sólo ocurre en regiones marginales para la garrapata o cuando se transportan animales adultos susceptibles a regiones endémicas. En los sitios donde las garrapatas son abundantes, la epidemiología de estas enfermedades se caracteriza por la estabilidad enzoótica, concepto que implica la presencia de un alto porcentaje de ganado infectado, pero la rara ocurrencia de enfermedad clínica (Benavides, 1985). Esta relación se mantiene debido a la inmunidad pasiva (anticuerpos) provista por el calostro y la temprana infección de los terneros, los que según se ha demostrado, poseen resistencia innata (aún en ausencia de anticuerpos) hasta cerca de los nueve meses de edad. Durante esta edad, los animales adquieren la infección sin presentar signos aparentes de enfermedad; la inmunidad resultante, una vez establecida, es mantenida en ganado adulto mediante reinfecciones, las que son inaparentes clínicamente (Cetra *et al.*, 2000).

En regiones donde las condiciones ambientales no son favorables para la reproducción de la garrapata y en sitios donde la población se reduce artificialmente por un intenso control, se rompe el equilibrio entre agente, huésped y ambiente, pues no todos los terneros se infectan antes de los nueve meses de edad, creando así un segmento de ganado susceptible dentro del rodeo. Estos animales muy posiblemente desarrollarán enfermedad clínica aguda (con alta probabilidad de morir) cuando adquieran contacto con el hemoparásito, meses más tarde. Esta situación es conocida como inestabilidad enzoótica,

en la cual la enfermedad se vuelve periódicamente aparente, coincidiendo con períodos de tiempo favorables para la reproducción de la garrapata (Benavides, 1985).

La epidemiología de las enfermedades asociadas a garrapatas indica que la estabilidad se logra cuando toda la población de ganado vacuno es inmune, como consecuencia de la exposición natural a ella; no hay casos clínicos, pero el microorganismo se halla ampliamente extendido. Se presenta la inestabilidad cuando una proporción de la población queda sin exponer durante algún tiempo y la enfermedad se presenta en estos animales conforme envejecen.

El ganado bovino joven muestra fuerte resistencia a la mayoría de las enfermedades transmitidas por garrapatas durante un período variable después de su nacimiento. Debe determinarse la extensión aproximada de este período para cada enfermedad, puesto que para alcanzar la estabilidad los terneros deben recibir al menos una infección durante él mismo.

Este modelo hipotético debe considerarse principalmente en términos didácticos. Bajo las condiciones de los establecimientos la situación es más compleja, ya que los niveles de infección de las garrapatas con el parásito varían y los números de garrapatas en los animales no se mantienen constantes, debido a los patrones de movimiento de los animales entre los potreros, a factores estacionales y a las aplicaciones de acaricidas (Perry *et al.*, 1985). Sin embargo, el modelo sirve para ilustrar el hecho de que la mejor protección contra la aparición de enfermedad hemoparasitaria en los establecimientos es permitir que los animales jóvenes posean un nivel de garrapatas, el suficiente para asegurar la infección de todos los animales antes de los nueve meses de edad (Mahoney & Ross 1972).

El riesgo de ocurrencia de anaplasmosis depende, entre otros, de los siguientes factores: sistema de explotación (intensivo, extensivo), raza, flujo zootécnico o tecnología de producción para leche o carne, tasa de inoculación, grado de infestación de garrapatas y nivel y eficacia del control químico y ecológico contra los distintos vectores (Cordoves & Oliver, 1989), citado por Guglielmone, (1991).

5.1. Transmisión

Las vías más importantes de transmisión de la enfermedad son: la mecánica, en la que se introducen directamente los eritrocitos infectados, ya sea por inoculación a través de picaduras de artrópodos hematófagos parasitados o con objetos punzantes contaminados (Richey & Palmer, 1990). La transmisión vertical de tipo placenta-feto, se da cuando la madre sufre anaplasmosis aguda (Zaugg, 1990). Este autor demostró que *A. marginale*, podía, en el segundo y tercer trimestre de gestación, atravesar la barrera placentaria e infectar al feto y que probablemente esto no sucedía dentro de los eritrocitos, sino que era una fase extraeritrocitaria del parásito. Según Rey *et al.*, (2003), la vía de transmisión trasplacentaria debe ser tomada en cuenta como factor de riesgo en zonas donde la anaplasmosis es endémica.

La transmisión trasplacentaria ha sido notificada con cierta frecuencia (Brinton *et al.*, 1976; Swift & Paumer, 1978; Paine & Miller, 1977; Norton *et al.*, 1983; Zaugg & Kuttler, 1984; Zaugg, 1985; Potgieter & Van Rensburg, 1987; Ribeiro *et al.*, 1995). La mayoría de los fetos fueron contagiados cuando la vaca había sido infectada durante el período de gestación. Entretanto, los casos reportados por Norton *et al.*, (1983), Potgieter & Van Rensburg, (1987), Ribeiro *et al.*, (1995) sugieren que la transmisión intra-uterina o trasplacentaria puede ocurrir en vacas portadoras crónicas.

Basados en resultados experimentales ya citados, se considera que las garrapatas de los bovinos son transmisores biológicos de *A. marginale* y responsables por la situación endémica de anaplasmosis. La transmisión por estos ectoparásitos ocurre transestadial e intraestadialmente. En regiones en que la garrapata es endémica la situación con relación a los hemoparásitos (babesiosis y anaplasmosis) es de estabilidad endémica. Esto no ocurre en regiones libres de garrapatas o aquéllas marginales donde este ectoparásito no tiene presencia constante. La transmisión trasplacentaria sucede con cierta frecuencia, y su significado, con relación a la epidemiología, merece ser mejor estudiado. La capacidad de transmisión de *A. marginale* por insectos hematófagos debe ser objeto de más estudios,

antes de considerarlos como vectores epidemiológicamente importantes (Wiesenhutter, 1975).

5.2. Tasa de inoculación (h)

El modelo hipotético antes mencionado fue originalmente adoptado para malaria por McDonald (1950^a), quien definió la tasa de inoculación (h) como la proporción de la población humana que recibió un inóculo infectivo en una unidad de tiempo determinado. En consecuencia puede estimarse el riesgo de ocurrencia de la enfermedad calculando (h) a partir de la prevalencia de la infección. Si bien este modelo fue desarrollado para *Babesia sp.* originalmente, no existen restricciones para utilizarlo en *Anaplasma sp.* En tal sentido existen experiencias realizadas en el exterior (Teclaw *et al.*, 1985) y otra realizadas en el país (Habich *et al.*, 1982; Vanzini *et al.*, 1993). Considerando que para el caso de anaplasmosis existen otros transmisores, además de *R. (B) microplus*, la probabilidad riesgo de brotes es elevada.

La tasa de inoculación (h) es la probabilidad diaria de que cada uno de los animales del rodeo pueda recibir la infección. h es el producto del promedio de picaduras por día que recibe el animal por la proporción de larvas infectadas que logran parasitar al animal (en el caso de que el transmisor fuera la garrapata).

Debe tenerse en cuenta que los títulos de los anticuerpos calostrales persisten aproximadamente 3 meses, pudiendo interferir con la interpretación de h en ese período por lo que se recomienda obtenerlo entre los 4 y 9 meses de edad.

El conocimiento de este parámetro es esencial para la evaluación del nivel epidemiológico del rodeo y predecir la probabilidad de ocurrencia de brotes (Mahoney & Ross 1972).

5.3. Tasa de Infección (I)

En el modelo desarrollado por Mahoney & Ross (1972) también se prevé el cálculo de la tasa de infección en el bovino por medio de pruebas serológicas.

La estabilidad se logra cuando I se aproxima al 100%, por lo tanto todos los animales del rodeo fueron infectados con el agente, *A. marginale*.

5.4. Valoración del estado epidemiológico.

Los datos de h, I, edad, se representan de la siguiente manera, teniendo en cuenta los parámetros consecutivos:

- a) El valor observado de h a una edad determinada.
- b) El valor crítico de h para lograr la estabilidad de la enfermedad a los 9 meses.

Cuando el valor de (a) es mayor al de (b), el rodeo estaría en estabilidad, mientras que cuando el valor de (a) es menor que el de (b), estaría en inestabilidad.

El cálculo de tasas de inoculación para hemoparásitos debería hacerse en toda zona en la que estas enfermedades constituyan una amenaza, con el fin de adaptar el control de las garrapatas y de los hemoparásitos a cada situación.

Determinar la correlación entre el número de garrapatas en los animales y h para calcular teóricamente el número de garrapatas mínimo necesario para obtener estabilidad endémica para babesiosis y anaplasmosis, es de gran importancia para la formulación de un adecuado programa de control contra las garrapatas, manteniendo la estabilidad endémica.

Sólo se toman en cuenta para el cálculo de h los resultados serológicos de las cohortes de animales a partir de la edad de cuatro meses (120 días), a fin de evitar la inclusión de animales seropositivos por efectos de la inmunidad pasiva calostrual. Tampoco es posible el cálculo de h en los casos en el que 100% de los animales alcanzan la seropositividad (Cuellar Ribera *et al.*, 2000).

Para hallar h requerida para la estabilidad de la enfermedad, es necesario lograr una alta proporción de animales infectados (I) durante el período de resistencia neonatal. El modelo matemático desarrollado por este autor determina que h crítica para lograr la estabilidad enzoótica es de 0,01, correspondiente a una I del 95% a los 9 meses. Sin embargo, para evaluar situaciones epidemiológicas de las enfermedades asociadas a garrapatas de campo, Mahoney & Ross (1972) sugirieron que la estabilidad estaría asociada a una tasa de inoculación promedio por encima de 0,005 con una estimación máxima detectada de 0,05 y que con una I del 100% a los 9 meses de edad o antes, la estimación de h podría no ser requerida, porque tales condiciones indicarían estabilidad enzoótica.

CAPITULO III. METODOLOGÍA

1. Selección del área geográfica

El estudio se llevó a cabo en los departamentos de Empedrado y Bella Vista situados entre los paralelos 27° y 28° de latitud sur y 58 ° y 59° de longitud oeste, de la provincia de Corrientes (Apéndice, Mapa 2). La selección de los departamentos se realizó tomando en cuenta los resultados obtenidos por Schiffo y Lombardero (1964) y Cetrá *et al.*, (2000), que indicaban dos situaciones epidemiológicas de anaplasmosis diferentes, con estabilidad enzoótica en el departamento de Empedrado e inestabilidad en el departamento de Bella Vista (mapa 2). Los dos departamentos se encuentran en una misma área ecológica y los registros climatológicos promedios para los períodos de estudio fueron 21,5° C de temperatura y 127,4 mm de precipitaciones y la humedad relativa del 72,63 %. Se registraron además los datos climatológicos mensuales (Apéndice, Gráfico 8).

2. Selección de los rodeos

Se aplicó el criterio de trabajo descrito por Späth y Mangold, (1986), que se fundamenta en la necesidad de la caracterización de una zona desde el punto de vista de la sanidad y de la producción, para obtener información sobre algunos factores que puedan determinar la aparición y distribución de la enfermedad.

Se determinó la proporción de productores y establecimientos para cada uno de los departamentos seleccionados (Apéndice, Gráfico 9) y se realizó una estratificación de establecimientos ganaderos según la población bovina (Apéndice, Gráfico 10). El 75% de ellos poseía más de 100 bovinos que representaban el 20% de la población total, por lo que para este estudio se seleccionaron rodeos incluidos en este estrato.

2. Diseño experimental

2.1 Tipo de estudio

Se realizaron estudios observacionales para evaluar la asociación entre la enfermedad y un posible factor de riesgo para anaplasmosis. Se llevaron a cabo dos estudios epidemiológicos, uno longitudinal que incluyó el seguimiento de bovinos en dos establecimientos durante 12 meses y otro transversal en donde se evaluó el estatus epidemiológico de anaplasmosis y el riesgo de ocurrencia de la enfermedad en 20 rodeos del departamento de Bella Vista. Las actividades se realizaron entre diciembre de 2002 y febrero de 2004, y entre mayo y agosto de 2003 respectivamente.

Basado en el modelo de Mahoney & Ross, (1972) descrito anteriormente, se consideró estabilidad enzoótica cuando el 75% de los animales a los 9 meses evidenciaban anticuerpos contra *Anaplasma sp.*

En cada establecimiento se efectuó una encuesta. Las preguntas fueron referidas esencialmente a las características de producción general del establecimiento, composición genética y estructura del rodeo, carga animal, alimentación, uso de acaricidas y ocurrencia de anaplasmosis (Apéndice, 9. Encuesta).

Diseño del muestreo:

Se determinó el número de animales a muestrear para estimar la seroprevalencia, utilizando la fórmula descrita por Thrusfield, (1995) para variables dicotómicas, en este caso “resultado serológico positivo” o “negativo”. La distribución que se aplica para las variables de este tipo es la binomial. El “n” obtenido para una población infinita fue ajustado a la población real teniendo en cuenta los tamaños de las poblaciones registradas en el trabajo preliminar (Apéndice, Gráfico 10). La fórmula antes mencionada es la siguiente:

$$n = p \cdot (1-p) \cdot Z^2 / d^2$$

Donde

p: es la prevalencia esperada para una zona endémica

Z: es el grado de confianza deseado, usualmente del 95% ($z=1,96$)

d: es el error admitido (entre 5-20%)

El tamaño de la muestra “n” se ajustó a una población finita (n’).

$$n' = n / 1 + (n/N)$$

Donde

N: es el tamaño de la población a estudiar

2.1.1. Estudio longitudinal

Se determinó la dinámica de la infección con *A. marginale* durante el primer año de vida a través de un seguimiento serológico en terneros de dos establecimientos de la provincia de Corrientes, La Elisa, (cohorte 1) y Santa Elvira, (cohorte 2).

Para la determinación del n se utilizó, la fórmula descripta por Thrusfield, (1995). Se siguió el mismo criterio para los estudios longitudinal y transversal. Se calculó un n para tener un 95 % de confianza de detectar un positivo, considerando que la prevalencia fuera del 4 % con un tamaño promedio de 50 terneros (datos del departamento).

$$n = \{1 - (1 - \xi)^{1/d}\} \{N - n/2\} + 1$$

Donde

n: tamaño de la muestra requerido

N: tamaño del rebaño

d: números de animales enfermos

ξ: nivel de confianza, estimado 0.95

Con este criterio se seleccionaron, una cohorte de 40 terneros de raza Bradford, el período estuvo comprendido entre febrero 2003 a 2004 para La ELISA (Empedrado) y otra de 40 terneros de raza Hereford, el período comprendido entre diciembre del 2002 a 2003 para Santa Elvira (Empedrado).

Adicionalmente se seleccionó una tercera cohorte de 42 terneros de raza Braford nacidos en febrero del 2004 en La ELISA.

De cada ternero de las dos primeras cohortes se tomaron mensualmente muestras de sangre desde el primer mes de vida hasta los 12 meses, con un total de 480 muestras para cada establecimiento para análisis serológicos. Los terneros habían ingerido calostro, antes de la primera toma de muestra.

En las dos primeras cohortes, se determinó la presencia de anticuerpos calostrales específicos para *A. marginale* en los terneros de un mes de vida y se evaluó su persistencia a través del tiempo (Rios *et al.*, 1990). Se determinó el tiempo en que ocurrieron las seroconversiones positivas como respuesta a las primo-infecciones naturales.

Se utilizó la prueba de aglutinación en placa (AP) para analizar las muestras de suero obtenidas durante los 12 meses de estudio y *c-ELISA* para las de los 6 primeros meses de estudio.

De los 42 terneros menores a veinticinco días (promedio de 20 días) correspondientes a la tercera cohorte seleccionada, se tomaron por única vez muestras de sangre con 10 % de citrato de sodio como anticoagulante para obtener ADN y se mantuvieron a - 20° C. Se determinó la proporción de terneros portadores de *A. marginale* durante el primer mes de vida mediante la prueba de *PCR* diseñada para amplificar un gen específico para *A. marginale*.

2.1.2 Estudio transversal

Se evaluó el estatus epidemiológico de anaplasmosis y el riesgo de ocurrencia de enfermedad en rodeos bovinos del departamento de Bella Vista, mediante la estimación de la tasa de reactores serológicos en terneros menores de un año utilizando el mismo modelo desarrollado para babesiosis por Mahoney & Ross, (1972).

La determinación del tamaño de la muestra a tomar en el departamento, se calculó en base a la fórmula descripta previamente con los datos de prevalencia encontrados

previamente en establecimientos de Bella Vista (Cetra *et al.*, 2000) $p = 12 \%$, $d = 20\%$ de p (2,4%), $Z = 1,96$ (95% C); $N = 94.574$ (bovinos del departamento de Bella Vista). EL 'n' calculado fue de 705.

Para determinar el número de terneros a muestrear en cada establecimiento del Dpto. Bella Vista se utilizó el criterio de número mínimo de muestras necesarias para detectar de la presencia de una enfermedad (Thrusfield, 1995) mencionado.

Estos rodeos tenían un promedio de 221 cabezas con aproximadamente 50 terneros cada uno (Apéndice, gráfico 12).

Se consideró razonable calcular un n para detectar la presencia de reactores con una seroprevalencia mínima del 4%. Para tener una alta probabilidad (95%) de detectar por lo menos un ternero positivo con una prevalencia esperada del 4 %, se requieren muestrear 39 terneros por establecimiento (Thrusfield, 1995)

Para mejorar la estimación de la prevalencia se decidió tomar muestras de 800 terneros en el departamento, 40 animales terneros cada establecimientos, 20 establecimientos (800/40).

Las muestras se analizaron mediante AP.

Se determinó la prevalencia aparente (PA), y prevalencia real (PR), según las siguientes fórmulas: (Thrusfield, 1995)

$PA: \text{animales positivos al test diagnóstico} * 100 \% / \text{Animales evaluados por el test}$

$PR: PA + Sp - 1 / Se + Sp - 1$

Se: sensibilidad de la técnica diagnóstica empleada (AP), 98%.

Sp: especificidad de la técnica diagnóstica empleada (AP), 99%.

El intervalo de confianza (I.C.), de la prevalencia se calculó de la siguiente manera (Thrusfield, 1995)

$$ee = \sqrt{p \cdot q / n}$$

Donde

ee: error estándar

p: prevalencia

q: 1-p

n: animales evaluados

I.C con un 95% = e.e * 1,96

rango inferior = PA - I.C

rango superior = PA + I.C

2.2.3. Toma de muestras.

2.2.3.1. Obtención de suero

Las muestras de sangre fueron tomadas con material descartable, mediante jeringas de 5 y 10 ml con agujas 40/12 o 25/8. De acuerdo con las instalaciones de cada establecimiento las muestras se obtuvieron de arteria/vena caudal o yugular. Los sueros se obtuvieron por centrifugación a 5.000 rpm, se colocaron en tubos Eppendorf® y se mantuvieron a - 20° C, hasta su procesamiento.

Para la obtención de ADN, 800 µl de cada muestra de sangre se lisaron y lavaron con 1000 µl de solución estabilizadora (SE) para lisis de glóbulos rojos (155 mM NH₄Cl; 10 mM NaHCO₃; 100 mM EDTA disódico, pH 7.4), a 37°C y centrifugación a 20.800 xg., hasta que el sedimento quedó transparente. La digestión celular se realizó con 400 µl de SE para lisis celular (0,1 M Tris-CLH pH 7,5; 0,3 M NaCl - 0,025 mM EDTA) y 5 µl de proteinasa K (20 mg/ml, Gibco®) a 58°C, 1 hora. La precipitación proteica se realizó con 200 µl de 7,5 M de cloruro de sodio y 400 µl de fenol cloroformo seguido de centrifugación a 20.800 xg a 4°C, 15 min. El ADN contenido en el sobrenadante se transfirió a otros tubos y se precipitó con 400 µl de alcohol isopropílico. Las muestras se lavaron con 400 µl de etanol 75 % a -20

°C., y se dejaron secar. Luego se resuspendieron con 100 µl de SE de 10mM Tris-CLH; 1Mm EDTA (TE), pH 8 y se mantuvieron refrigerados hasta su procesamiento.

3. Metodología del diagnóstico

3.1 Prueba de Aglutinación en placa

Se utilizó la prueba de aglutinación en placa (AP) descrita por Amerault & Roby (1968), considerada adecuada para estudios epidemiológicos (Berdie *et al.*, 1979). Es una reacción cualitativa entre el antígeno (Ag), los anticuerpos (Ac) y un suero de un bovino normal denominado factor sérico bovino (FSB). El antígeno derivado de la multiplicación *in-vivo* de *A. marginale* se obtuvo a través de pasajes rápidos en terneros esplenectomizados, hasta lograr el 70% de eritrocitos parasitados. El FSB fuente de conglutinina y complemento necesarios para que se produzca la aglutinación o conglutinación propiamente dicha, fue obtenido de un bovino normal. La prueba se realizó bajo condiciones de laboratorio controladas en agitación continua 4000 rpm, ambiente húmedo y entre los 23 y 28°C, durante 4 min. La presencia de grumos se consideró una reacción positiva (Apéndice, 8.1).

3.2 Prueba de ELISA de competición

La prueba de ELISA de competición (*c-ELISA*) se realizó según Torioni de Echaide *et al.*, (1998). Utilizando como antígeno la proteína mayor de superficie de *A. marginale* obtenida por recombinación del ADN (rMSP5) y un anticuerpo monoclonal (AnaF16C1) específico para un epítipo de la rMSA2C, conjugada con peroxidasa, que en presencia del sustrato (H₂O₂ y cromógeno) genera color. La unión entre los anticuerpos policlonales del suero de bovinos con anaplasmosis y el antígeno (primera fase) inhibe la unión entre el AC monoclonal-peroxidasa y su respectivo epítipo (segunda fase) que se traduce en una falta de reacción enzima-sustrato, sin desarrollo de color.

Para la prueba se utilizó como cromógeno 0.04 M ABTS (2,2-Azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico] y la lectura se realizó a 450 nm en un lector de *ELISA*. Los resultados obtenidos en densidad óptica (DO) se expresaron en porcentaje de inhibición (%I), en relación a un control que mide el grado de unión máximo entre el Ac monoclonal-peroxidasa y la proteína rMSP5, que en presencia del sustrato representa el 100% de desarrollo de color, sin inhibición alguna (0% I). Esta reacción conocida como control de conjugado (CC) constituye el valor de referencia del % I para los sueros problema, según la siguiente fórmula: $100 - DO \text{ suero problema} \times 100 / DO \text{ CC}$. Se consideró como punto de corte para diferenciar positivos y negativos un valor $\geq 28\%$ Inhibición (Torioni de Echaide *et al.*, 1998), (Apéndice, 8.2).

3.3 Reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador Perkin Elmer techne TC 412® y consistió en 40 ciclos repetitivos de **desnaturalización** a 92° C en el cual las cadenas de ADN se separan; de **hibridación** a 60° C, en el cual los *primers* hibridan las cadena complementaria de la secuencia de ADN y **extensión** a 72 ° C en el cual la DNA polimerasa sintetiza la hebra de ADN complementaria. Se utilizaron los *primers msp5* INT For y *msp5* ext Rev, para amplificar una secuencia de 345 pb del gen *msp5* de *A. marginale* (Torioni de Echaide *et al.*, 1998) y la enzima Taq Polimerasa (Invitrogen), (Apéndice, 8.3).

Las pruebas diagnósticas, (*c-ELISA*, *PCR*) se realizaron en el laboratorio del INTA, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Laboratorio de Inmunología. Mientras que AP en el INTA Mercedes, Corrientes.

4. Análisis de datos:

4.1. De la situación epidemiológica

Para evaluar el riesgo de ocurrencia de brotes de anaplasmosis se aplicó el modelo matemático de Mahoney & Ross (1972) desarrollado para babesiosis, teniendo en cuenta las

restricciones que tiene su extrapolación a esta enfermedad. Con los datos de la tasa de infección (I) de anaplasmosis y la edad promedio de los terneros muestreados (t) en cada establecimiento se calculó la tasa de inoculación (h) de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$h = -\ln (1-I)/t$$

Donde

ln= base del logaritmo natural (2,7182)

I =tasa de infección (seroprevalencia)

t=edad promedio de los terneros

El h calculado para los 20 establecimientos, fue indicativo de estabilidad, por lo cual se realizó una clasificación alternativa de tres niveles, que se detallan a continuación.

Se clasificaron los rodeos según h en tres niveles alto, medio y bajo

(1º (h < 0,005), 2º (h > 0,005 < 0,01) y 3º (h > 0,01).

En la Tabla 6 se encuentra, el valor hipotético o calculado de cuánto llegaría la tasa de Infección con h a los 270 días.

4.2. Encuesta epidemiológica:

En el estudio observacional se identificaron algunos de los posibles factores de riesgo, definidos como toda característica del individuo, población, ambiente y manejo que pueda incrementar el riesgo de ocurrencia de una enfermedad. Los factores de riesgo analizados fueron: proporción de *Bos indicus*, cantidad de baños y productos utilizados (Graat & Casals, 1994).

4.3. Concordancia de los test Diagnósticos

Se evaluó la concordancia entre AP y *c-ELISA*, considerada como la proporción de resultados coincidentes positivos y negativos en las dos pruebas. Se estimó el grado de acuerdo mediante el valor Kappa, definido como el cociente entre la proporción observada

de concordancia descontando el azar y la máxima proporción de conformidad no debida al azar. Kappa= 0 no hay concordancia, 1 concordancia perfecta (Graat & Casals, 1994).

Se utilizó el programa de Win Episcopo 2.0 para calcular el valor Kappa. Para la interpretación de kappa, se recurrió a la escala sugerida por Altman, (1991) citada por de López de Ullibarri & Pita Fernandez, (2001), la cual se detalla a continuación.

Valor de K	Fuerza de la concordancia
<0,20	Pobre
0,21 - 0,40	Débil
0,41 - 0,60	Moderada
0,61 - 0,80	Buena
0,81 - 1,00	Muy buena

4.4. Estadística de la información

4.4.1. Estudio longitudinal

Con respecto al estudio longitudinal se utilizó un modelo lineal *Mixed* (PROC MIXED) para medidas repetidas, del programa SAS (Littell *et al.*, 1998).

Las variables comparadas fueron el nivel de anticuerpo en ambas cohortes y el efecto tiempo, en los 6 primeros meses de vida, con el programa *STATISTICA*. Con el programa SAS se comparó mes a mes el nivel de anticuerpo en cada cohorte. El grado de significación para las variables ($p > 0,05$).

4.4.2. Estudio transversal

La tasa de inoculación (h), indicativo de riesgo de ocurrencia de brotes, fue alta en los 20 establecimientos estudiados ($p > 0,005$). Para evaluar la posible relación entre h y los factores de riesgo registrados se realizó un análisis de regresión múltiple.

Para el análisis se consideró h como variable dependiente, el valor de h cuantitativo, se transformó en cualitativo categorizándola en tres niveles (alto, medio y bajo) según se detalla a continuación

$$B1 = h < 0,005$$

$$M2 = h > 0,005 < 0,01$$

$$A3 = h > 0,009$$

Dado que el estudio incluye una variable dependiente y diversas variables interválicas independientes, se utilizó el test estadístico de regresión múltiple para analizarlas.

La regresión múltiple se define como una generalización sencilla de la regresión simple al caso de múltiples variables. Se utilizó el programa Statistic 6.0.

En relación a las otras variables como la proporción de *B. indicus*, la carga bovina (ha^{-1}), el sistema alimentario, el número de tratamientos acaricidas anuales, el tipo de acaricidas, forma de aplicación y la ocurrencia de anaplasmosis (incidencia clínica anual), fueron consideradas como variables independientes (Ezequiel & Fox, 1970).

Dichas variables se catalogaron en cualitativas nominales y cuantitativas según se detalla a continuación.

Variables nominales	Variables cuantitativas
Proporción <i>Bos indicus</i>	Carga animal
Tipo de acaricida	Nº tratamientos anuales
Tipo de explotación	Ocurrencia de casos clínicos
Cría de otro ganado	
Uso de acaricidas	

A su vez, algunas variables fueron subclasificadas. La proporción de sangre cebuina determinó que los animales se clasifiquen en “tipo *Bos taurus*” o “tipo *Bos indicus*”.

El tipo de acaricida se consideró como “drogas combinadas” o “monodroga”. Hubo dos categorías para los establecimientos considerando la carga animal y éstas fueron: “más de 0,5 EV/ha” y “menos de 0,5 EV/ha”. Con respecto al número de tratamientos anuales, se tomó en cuenta si éste fue “mayor de 5 baños anuales” o “menor de 5 baños anuales”. Para la clasificación según la cantidad de casos clínicos se tomó como límite “más de 5 casos anuales” y “menos de 5 casos anuales”. En lo atinente a las demás variables, los establecimientos se comportaron de manera homogénea.

Se utilizó el test estadístico de *Fisher*, para el cual se clasificó a la variables dependiente (h) en alta ($h > 0,009$) y baja ($h < 0,009$) según *STATISTIX*, para observar si se encontraban diferencias significativas o no significativas.

Dentro de la estadística descriptiva para las variables independientes continuas, se estimaron la media poblacional y el desvío estándar.

CAPITULO IV. RESULTADOS

1. Resultados

1.1. Estudio longitudinal

1.1.1. Resultados del diagnóstico serológico mediante aglutinación en placa (AP)

Los resultados serológicos obtenidos mediante AP indican que durante el primer mes de vida el 50% y el 68% (Gráfico N° 1) de los terneros de la cohorte 1 (n=40) y 2 (n= 40) respectivamente tenían anticuerpos contra *Anaplasma* spp.

La proporción de terneros positivos fue superior al 75% a los 3 meses de edad para la cohorte 1 y a los 2 meses para la cohorte 2. EL 100% de los terneros analizados tenían Ac a los 8 y 2 meses de edad promedio para cada cohorte respectivamente (Gráfico 1).

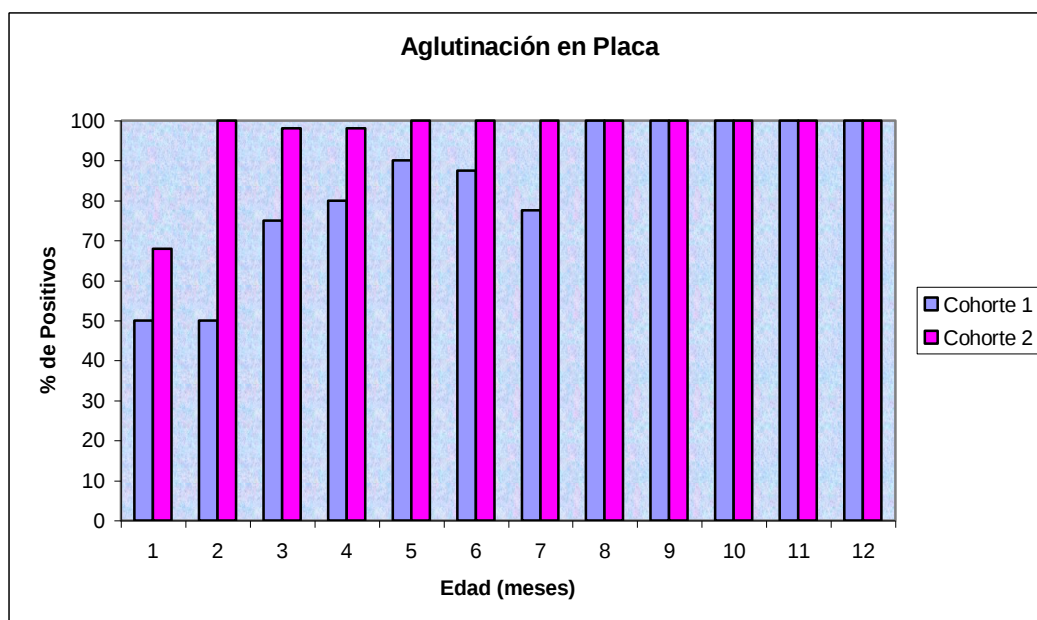


Gráfico 1. Proporción de terneros positivos para *A. marginale* mediante la prueba de aglutinación en placa en las cohortes 1 (n=40) y 2 (n=40) durante los 12 meses de estudio.

1.1.2. Resultados del diagnóstico serológico mediante c-ELISA

El 25% de los terneros de la cohorte 1 y un 58% de la cohorte 2 presentaban Ac específicos al mes de vida y a partir de los 4 meses de edad se observó una seroprevalencia mayor 75 % indicativo de estabilidad enzoótica en las dos cohortes (Gráfico 2).

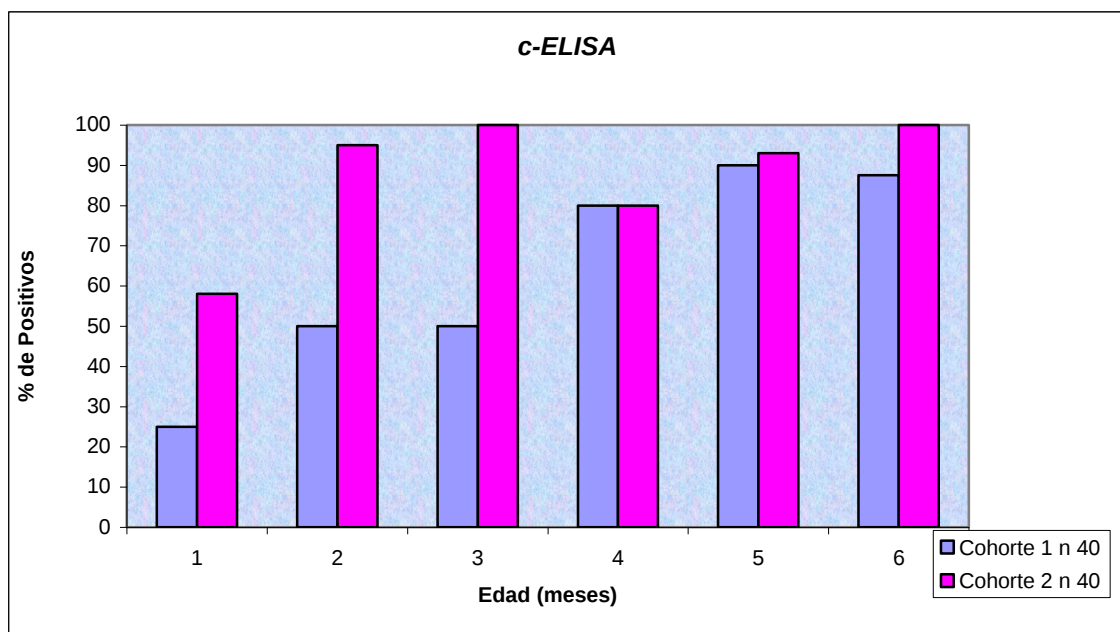


Gráfico 2: Proporción de terneros positivos para *A. marginale* mediante la prueba de *c-ELISA* en las dos cohortes, durante 6 meses.

Los niveles promedios de Ac (expresados como % de inhibición) detectados en los terneros *c-ELISA* positivos para la cohorte 1 y 2 durante los primeros 6 meses de edad variaron entre el 69 y el 64 %. Mientras que para los terneros negativos, los promedios de los niveles de Ac fluctuaron entre 6 y 17 (% I), (tablas 1 y 2).

Tabla 1: Variaciones en los niveles de Ac detectadas mediante *c-ELISA*, durante los 6 primeros meses de vida en la Cohorte 1

A	Cohorte 1 (n= 40)	Edad promedio en meses					
		1	2	3	4	5	6
	Positivos						
	Proporción de terneros positivos, (%)	25	50	50	80	95	87,5
	Promedio del nivel de Ac. <i>c-ELISA</i> (% I)	67,10	74,70	66,00	75,00	65,00	65,00
	DS	19,20	10,48	20,7	12,71	21,9	16,99
	Rango	35-92	52-88	31-92	49-89	32-96	33-92
	Negativos						
	Proporción de terneros negativos, (%)	75	50	50	20	5	12,5
	Promedio del nivel de Ac. <i>c-ELISA</i> (%I)	6,6	3,85	5	7	16	7
	DS	8,27	7,19	6,92	7,13	4,24	4,55
	Rango	0-25	0-27	0-20	0-24	13-19	0-11

Tabla 2: Variaciones en los niveles de Ac detectadas mediante *c-ELISA*, durante 6 primeros meses de vida en la Cohorte 2

B	Cohorte 2 (n= 40)	Edad promedio en meses					
		1	2	3	4	5	6
	Positivos						
	Proporción de terneros positivos, (%)	58	95	100	80	93	100
	Promedio del nivel de Ac. <i>c-ELISA</i> (% I)	59,6	67,97	61,70	58,94	63,68	67,25
	DS	16,3	18,20	19,89	19,34	20,68	17,04
	Rango	34-82	33-94	33-94	37-89	28-94	40-93
	Negativos						
	Proporción de terneros negativos, (%)	42	5	0	20	7	0
	Promedio del nivel de Ac. <i>c-ELISA</i> (%I)	13,4	16,00	0	24,43	23,67	0
	DS	8,24	4,24	0	1,62	4,93	0
	Rango	0-26	13-19	0	3-27	18-27	0

Los anticuerpos calostrales fueron detectados por *c-ELISA* (% I), desde el primer mes de vida con un 67% I para la cohorte 1 y un 60% para la cohorte 2, estos niveles tuvieron una persistencia máxima de tres meses. Se observó que aumentó el título de Ac. (promedio del % I) en la cohorte 1 entre el 3º y 4º mes y en la cohorte 2 entre el 4º y 5º mes (Gráfico 3 a, b). La seroconversión positiva ocurrió en ambas cohortes, a partir 3º a 4º mes de vida en la cohorte 1, y 4º a 5º mes de vida en la cohorte 2, es decir que junto a la seroconversión se incrementó el título de Ac. (% I) en los terneros (tabla 1 y 2).

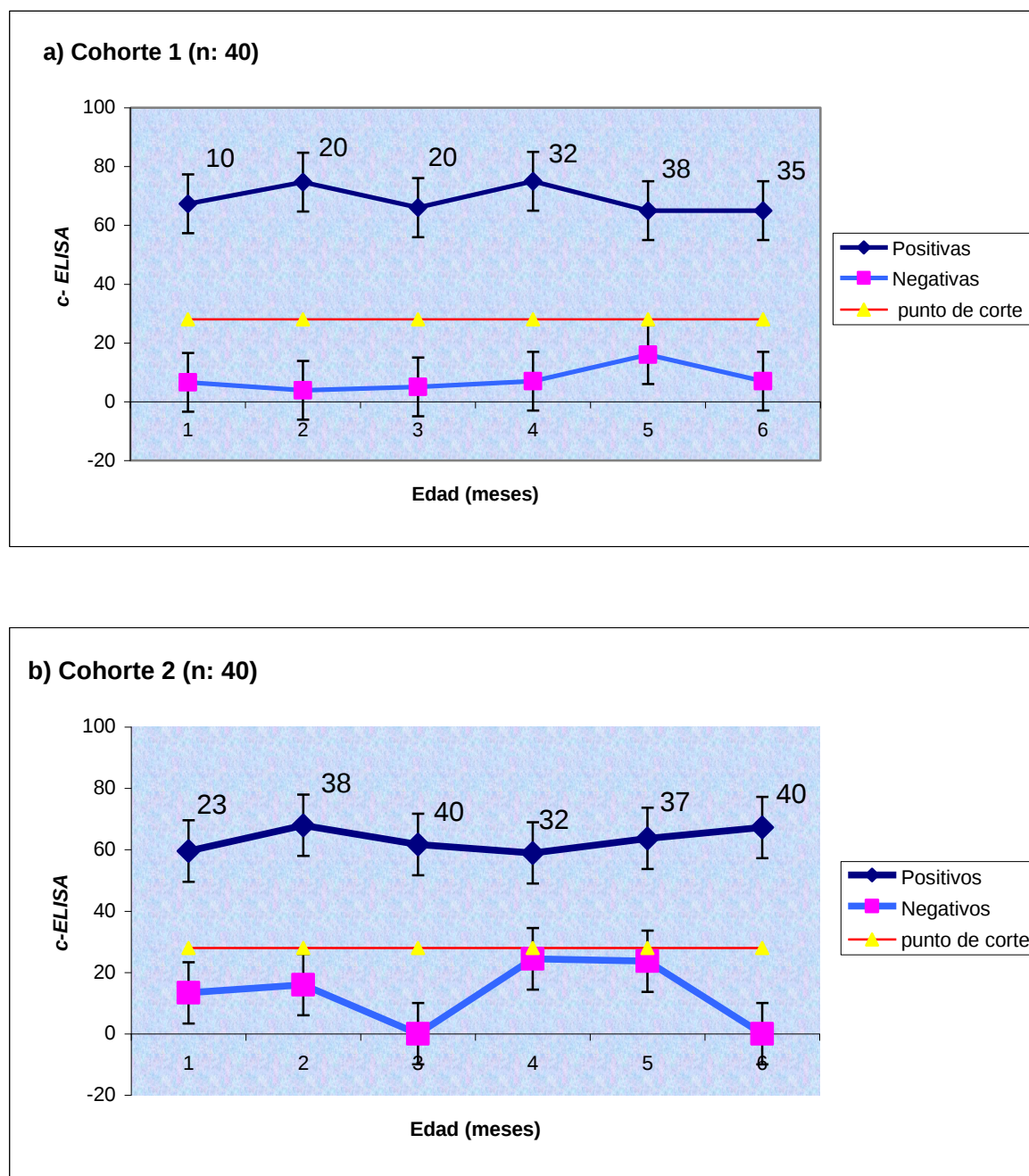


Gráfico 3: Promedios y desvíos estándar del porcentaje de Inhibición observado en *c-ELISA* en los sueros de los terneros positivos y negativos de la cohorte 1 (a) y cohorte 2 (b), durante los 6 primeros meses de vida.

1.1.3. Comparación de los resultados de las técnicas serológicas: AP y *c-ELISA*.

Se compararon los resultados de AP y *c-ELISA*, para las dos cohortes. En la cohorte 1, se observó que al mes de vida AP detectó un 50% de positivos, mientras que *c-ELISA* un 25 % de ellos. Fue observada una seroprevalencia mayor al 75% a partir de los 3 y 4 meses de edad de los terneros, tanto para AP como para *c-ELISA*.

En la cohorte 2, en el primer mes de vida se detectó un 68% de positivos por AP y un 58% por *c-ELISA* y a partir del segundo mes ambas técnicas indicaron más del 90% de positivos. (Gráfico 4 a y b).

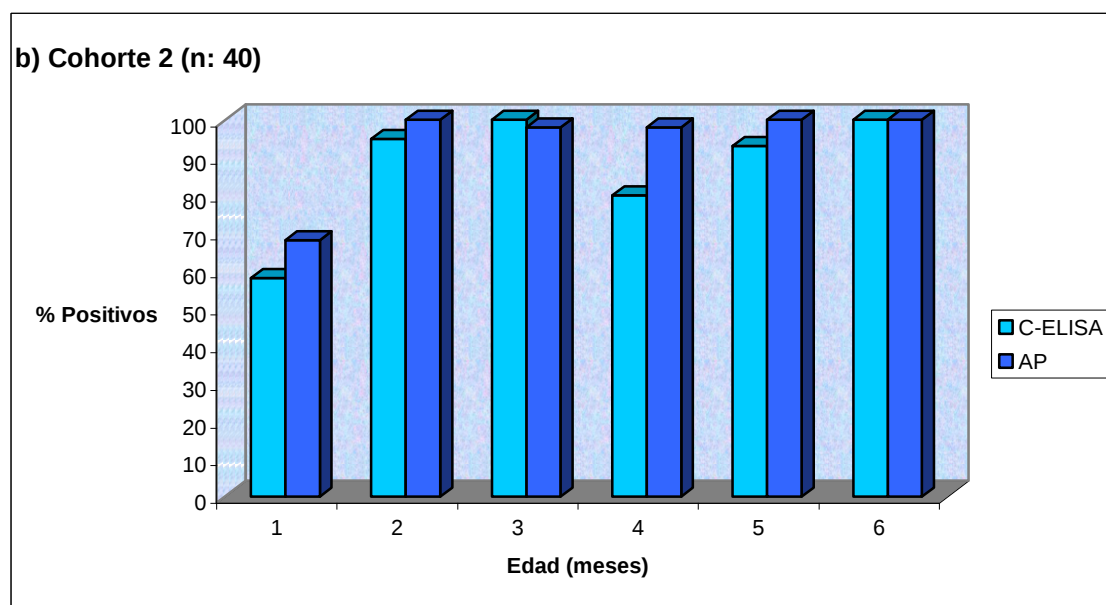
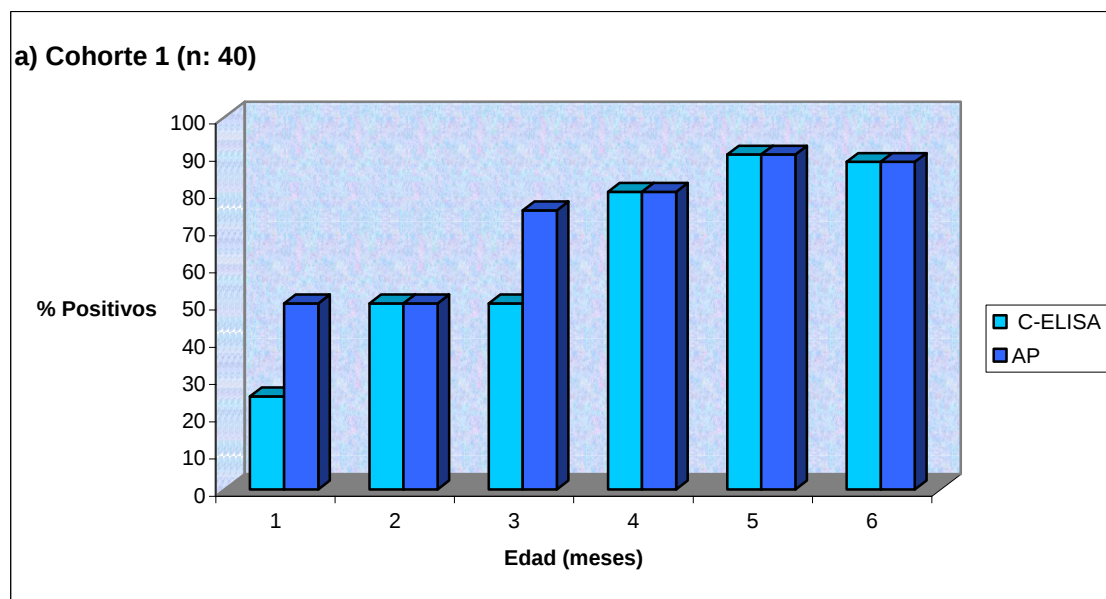


Gráfico 4: Proporción de terneros positivos detectados mediante (AP) y *c-ELISA* para *A. marginale* para la cohorte 1 (a) y para la cohorte 2 (b), durante los primeros 6 meses de vida.

1.1.4. Dinámica de anticuerpos evaluada por *c-ELISA*

Para ejemplificar, la dinámica de anticuerpos evaluada por *c-ELISA*, se analizaron los títulos de Ac. de 5 terneros positivos y 5 negativos, desde el primer mes de vida y hasta los 6 meses en ambas cohortes.

La inmunidad pasiva fue evidenciada en las dos cohortes mediante la detección de Ac. calostrales medidos al mes de vida. Se observó que una mayor proporción de terneros de la cohorte 2, presentaban Ac. específicos contra *A. marginale* a través del calostro (Gráfico 4 a y b).

La evolución de los Ac. en 5 terneros positivos desde el primer mes de vida en cada cohorte mostró que la caída del % I de los Ac. calostrales ocurrió entre el 1º y 2º mes en dos terneros y entre los 2º y 3º meses de vida, en otros tres terneros en la cohorte 1; y entre 1º y 2º mes en tres terneros y entre 2º y 3º mes en dos terneros, en la cohorte 2. (Gráfico 5 a y b).

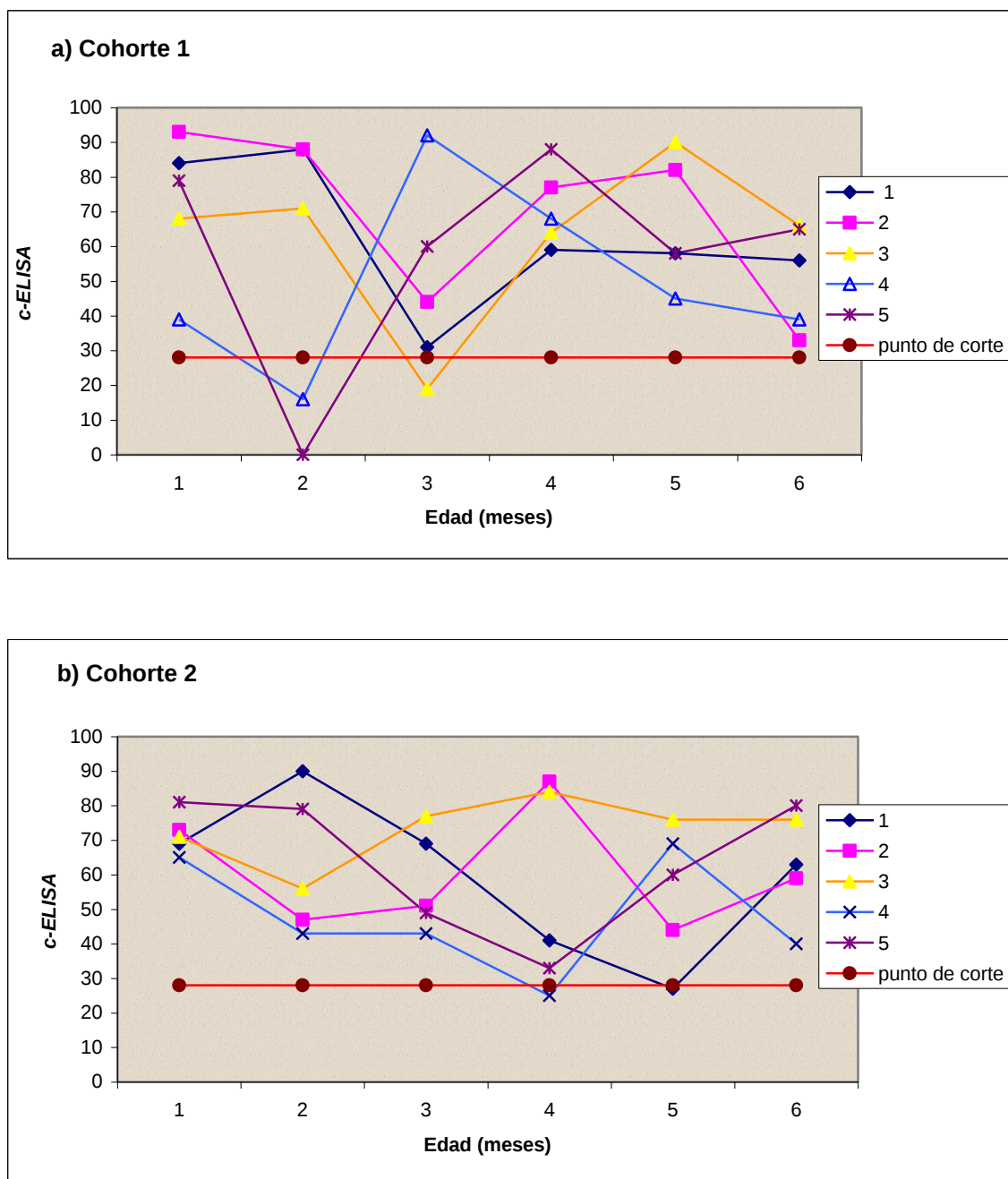


Gráfico 5: Dinámica de los anticuerpos calostrales e inducidos (por primoinfecciones o vía iatrogénica) de *A. marginale* en cinco terneros de la cohorte 1 (a) y cinco de la cohorte 2 (b).

Las seroconversiones más tempranas (Infección natural o iatrogénica) determinadas en terneros negativos que no evidenciaron Ac calostrales al primer muestro (cinco de cada cohorte), ocurrieron entre el 1º y 2º mes en 4 de 5 terneros, en la cohorte 1 y antes del segundo mes de vida en los 5 terneros, en la cohorte 2 (Gráficos 6 a, b).

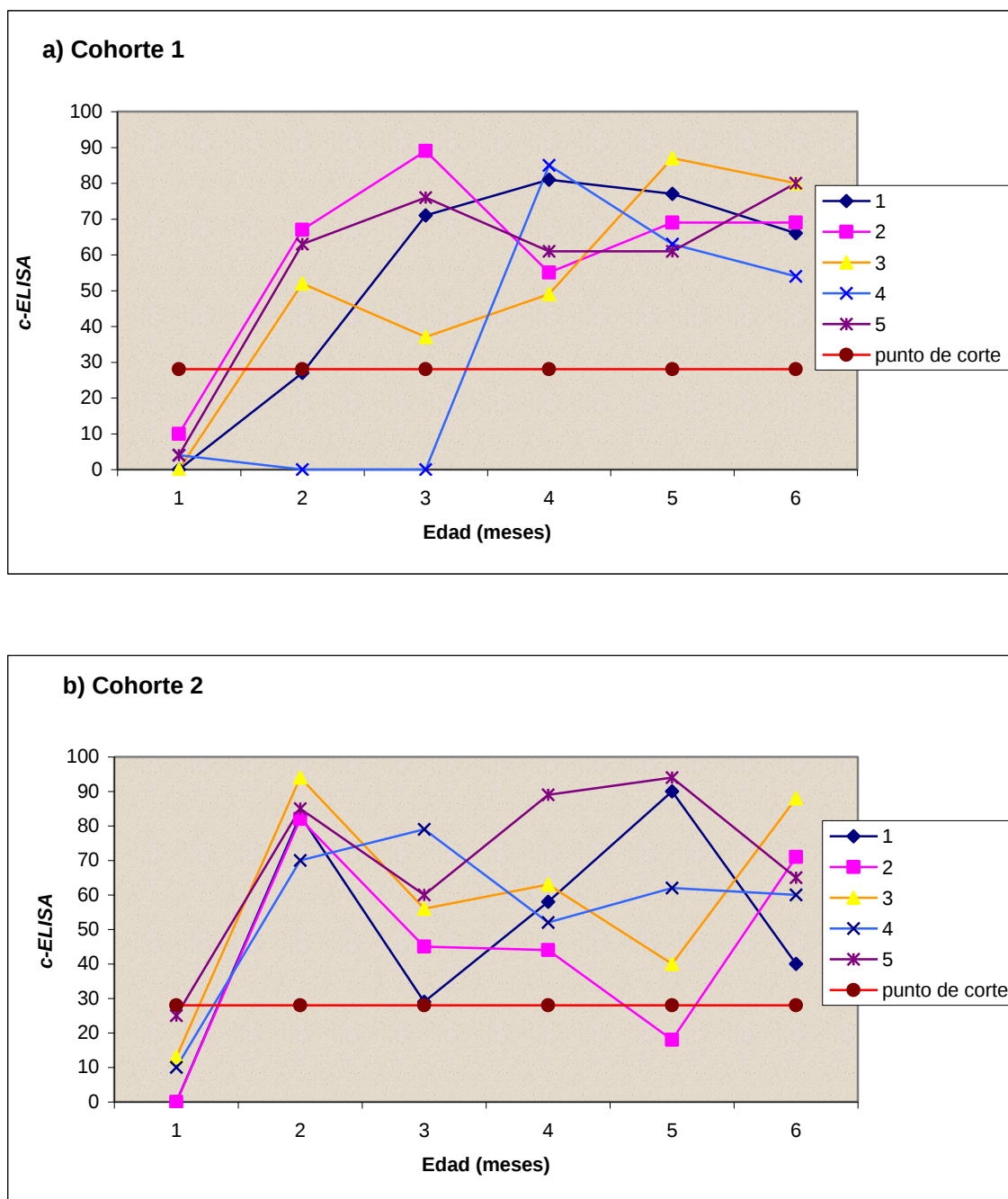


Gráfico 6: Dinámica de anticuerpos en cinco terneros que resultaron negativos en el primer mes de vida, en la cohorte 1 (a) y en la cohorte 2 (b) mediante *c - ELISA* durante los 6 primeros meses de vida.

1.1.5.1. Diagnóstico serológico y molecular de anaplasmosis en el segundo año de estudio en el establecimiento La ELISA (cohorte 3)

El estatus de infección para *Anaplasma* spp, fue evaluado en un segundo grupo de terneros (n=42) menores a 1 mes de edad en el establecimiento La ELISA (cohorte 3). Los resultados mostraron una prevalencia serológica aparente del 17%, y real del 12,86%. La comparación de estos resultados respecto del año anterior se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Prevalencia de anticuerpos contra *A. marginale*, hallada mediante *c-ELISA* en terneros menores a 25 días durante 2004 respecto de la encontrada en 2003 en terneros de 30 días de edad, en La Elisa.

Establecimiento LA ELISA	Terneros analizados (n)	Edad (días)	Terneros positivos (n)	Prevalencia aparente (%)	Prevalencia real (%)
Año 1 (cohorte 1)	40	30	10	25	21,9
Año 2 (cohorte 3)	42	< 25	7	16,6	12,86

$\chi^2 = 0,86$; $p = 0,35$ NS

1.1.5. 2. Identificación de una secuencia del gen *msp5* de *A. marginale* por PCR

Mediante la prueba de PCR se logró amplificar el fragmento de ADN de 345 pb en tres de los 42 terneros (7%) menores de 25 días de edad analizados el segundo año de estudio (Figura 1). El análisis de la secuencia mostró un 100% de identidad respecto de la cepa *Saint Maries* depositada en *GenBank* (Nº de acceso del genoma CP000030.1). En el

Apéndice, (3) se halla el cromatograma de la secuencia de 347 pb de *A. marginale* amplificado por *PCR*, correspondiente al ternero N° 1.

A continuación se detalla la secuencia del fragmento de 347 nucleótidos correspondiente al gen *msp5* de *A. marginale* obtenido del ternero 1 del establecimiento La Elisa, (Empedrado) Corrientes.

```
TTTACACGTG CCCTACCGAG TTAGGCATGG CTTCTCAGCT CCTAAGTAAA CTAGGCGACC
ATGCCGATAA GTTGCAAGTT GTGTTTATAA CTGTTGATCC GAAAAATGAC ACCGTAGCCA
AGCTTAAAGA GTACCACAAG TCTTTTGATG CGAGAATTCA GATGCTCACA GGCGAAGAAG
CAGACATAAA GAGCGTGGTT GAAAACTACA AGGTGTATGT GGGCGACAAG AAGCCAAGTG
ATGGTGATAT CGACCACTCA ACGTTCATGT ACCTCATCAA TGGGAAAGGC AGGTATGTCG
GGCATTTTGC GCCAGATTTT AACGCGTCTG AGGGCCAAGG CGAGGAA
```

Cuando se compararon los resultados de *PCR* con los de *c-ELISA* se encontró que los tres terneros portadores de *A. marginale* fueron negativos en *c-ELISA*; mientras que de los 39 terneros negativos a la prueba de *PCR*, siete resultaron positivos en *c-ELISA*. Del total de terneros sin anticuerpos calostrales (n=42), sólo el 8% estaba infectado con *A. marginale*, antes de los 25 días de edad.



Figura 1: Detección de *A. marginale* en terneros menores de un mes, mediante *PCR* (Establecimiento La Elisa). Calles 1-2-3: muestras de terneros infectados (N° 1-7- 27); Calles 4-5: muestras de terneros no infectados (N° 2 -3); calle 6: marcador molecular de 50 pb; calle 7, control positivo y calle 8, control negativo.

1.2. Estudio Transversal

1.2.1. Resultados del diagnóstico serológico por AP

El estudio transversal realizado en los 20 establecimientos de Bella Vista, con 40 muestras de suero de terneros menores de un año por establecimiento, mostró que el 100% de los rodeos estaban infectados, es decir con al menos un animal positivo dentro de cada uno. La PA fue del 90% (con un intervalo de confianza entre el 88,3 y el 92,4 %) mientras que la PR fue del 92% (Tabla 4).

Tabla 4: Prevalencia hallada en el estudio transversal, mediante la prueba de AP, en el departamento de Bella Vista.

		(%)
Muestra, n	800	
Positivos, n	723	
Prevalencia aparente, (p)	0,904	90,4
q= 1-p	0,096	9,6
error estándar, ee	0,010	1,0
IC, 95 %	0,020	2,0
rango inferior	0,883	88,3
rango superior	0,924	92,4
Prevalencia real, (P)	0,9216	92,1

Las prevalencias intrapredio estuvieron comprendidas entre el 62.5 y el 100%. El 80 % de los establecimientos tuvieron una PA > al 86 % (Grafico 7).

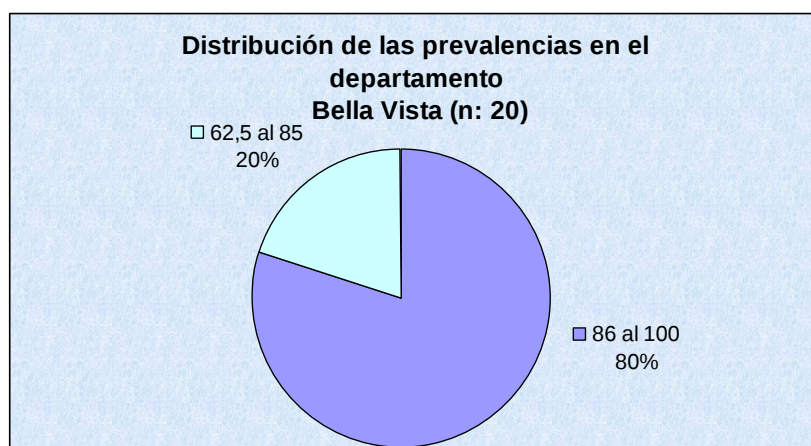


Grafico 7: Estudio transversal de anaplasmosis bovina. Distribución de las prevalencias halladas en los rodeos del departamento Bella Vista mediante AP.

2. Análisis de datos

2.1. De la situación epidemiológica

2.1.1 Estudio transversal

Los resultados serológicos se utilizaron para determinar la tasa de inoculación (h) utilizando la edad promedio en los terneros en cada uno de los 20 establecimientos. La tasa de infección (I) fue de 0,90 con un rango entre 0,62 y 1,0 y (h) varió entre 0,0054 y 0,0384. (Tabla 5).

Tabla 5: Estudio transversal de anaplasmosis bovina en 20 establecimientos del departamento Bella Vista. Tasa de Inoculación diaria (h) calculada para cada establecimiento ordenado de menor a mayor en base a (h).

<i>Establecimientos del departamento Bella Vista</i>	<i>Número de terneros analizados</i>	<i>Promedio de edad (días) (t)</i>	<i>Tasa de Infección (I)</i>	<i>Prevalencia serológica (%)</i>	<i>Tasa de inoculación diaria (h)*</i>
6	40	180	0,625	62,50	0,0054
1	40	300	0,825	82,50	0,0058
7	40	180	0,650	65,00	0,0058
5	40	300	0,875	87,50	0,0069
12	40	300	0,900	90,00	0,0077
11	40	240	0,850	85,00	0,0079
9	40	270	0,900	90,00	0,0085
8	40	270	0,925	92,50	0,0096
10	40	270	0,925	92,50	0,0096
16	40	270	0,925	92,50	0,0096
19	40	210	0,875	87,50	0,0099
2	40	300	0,950	95,00	0,0100
14	40	300	0,950	95,00	0,0100
17	40	270	0,950	95,00	0,0111
3	40	300	0,975	97,50	0,0123
20	40	210	0,975	97,50	0,0176
4	40	300	0,999	100,00	0,0307
13	40	300	0,999	100,00	0,0307
15	40	300	0,999	100,00	0,0307
18	40	240	0,999	100,00	0,0384

* De acuerdo a la formula de Mahoney & Ross, 1972.

Utilizando el criterio sugerido por Mahoney & Ross (1972), que establece que el valor crítico de h para lograr la estabilidad enzoótica del hato es $\geq 0,005$, el 100 % de los establecimientos se encontraría en estabilidad enzoótica. Sin embargo habría tres establecimientos (15 %) con un h cercano al umbral crítico = 0,005, (Establecimientos 7, 1, 6), (tabla 5).

En 9 rodeos (45%) el valor de h estuvo comprendido entre 0,01 y 0,0384; en 8 rodeos (40%) el valor de h se encontró entre 0,006 y 0,0099, mientras que en sólo 3 establecimientos (15%) este valor fue $< 0,006$.

En la tabla 6 se encuentra, el valor hipotético calculado de la tasa de Infección con h a los 270 días.

Tabla 6: Valor hipotético o calculado de cuanto llegaría la tasa de Infección con h a los 270 días, indicando que los tres establecimientos que estaban con valor crítico de h ($> 0,005$) a los 9 meses estarían en estabilidad.

Estableci- mientos Bella Vista	Prome- dio de edad (días)	Prevalen- cia serológica (%)	Tasa de I hallada	Tasa de inoculación diaria h	Tasa de I a los 270 días	Prevalen- cia serológica (%)
6	180	62,500	0,625	0,005	0,770	77
1	300	82,500	0,825	0,006	0,792	79,2
7	180	65,000	0,650	0,006	0,793	79,3
5	300	87,500	0,875	0,007	0,846	84,6
12	300	90,000	0,900	0,008	0,874	87,4
11	240	85,000	0,850	0,008	0,882	88,2
9	270	90,000	0,900	0,009	0,900	90
8	270	92,500	0,925	0,010	0,925	92,5
10	270	92,500	0,925	0,010	0,925	92,5
16	270	92,500	0,925	0,010	0,925	92,5
19	210	87,500	0,875	0,010	0,931	93,1
2	300	95,000	0,950	0,010	0,933	93,3
14	300	95,000	0,950	0,010	0,933	93,3
17	270	95,000	0,950	0,011	0,950	95
3	300	97,500	0,975	0,012	0,964	96,4
20	210	97,500	0,975	0,018	0,991	99,1
4	300	100,000	0,999	0,031	1,000	100
13	300	100,000	0,999	0,031	1,000	100
15	300	100,000	0,999	0,031	1,000	100
18	240	100,000	0,999	0,038	1,000	100

2.1.2. Estudio longitudinal

A los 180 días de edad promedio se encontró una $I = 0,875$ y una $h = 0,0116$ para la cohorte 1 y una $I = 1.0$ y una $h = 0,0512$ para la cohorte 2 con la prueba de AP. Estos resultados indicaron estabilidad enzoótica, para el período en que se realizó el trabajo.

2.2. De la concordancia de las técnicas

Para realizar el análisis de concordancia se utilizaron los resultados de las técnicas serológicas de AP y *c-ELISA*. Para lo cual, se empleó el coeficiente Kappa. La concordancia para la cohorte 1 fue 0,54 y para la cohorte 2 fue 0,45 (Tabla 7). La fuerza de la concordancia fue moderada según la clasificación de López de Ullibarri & Pita Fernandez (2001).

Tabla 7. Concordancia entre las técnicas serológicas AP y c-ELISA y los intervalos de confianza, en las cohortes (n: 40).

Cohorte	Conformidad observada*	Kappa	ee (límite inf)	ee (límite sup.)
1	0,800	0,541	0,416	0,665
2	0,908	0,455	0,336	0,574

* suma de positivos + negativos / total

2.3. De la encuesta epidemiológica

2.3.1. Estudio Longitudinal

Las variables más preponderantes de la encuesta epidemiológica para cada una de las cohortes se detallan a continuación. En cuanto a la raza, por ejemplo, en la cohorte 1 estaba constituida por bovinos Braford, mientras que en la cohorte 2 Hereford. Otra variable donde se encontraron diferencias fue la cantidad de baños anuales y los meses de aplicación. En la cohorte 1, se aplicaron 8 baños durante los meses de enero, febrero, marzo, abril, junio, septiembre, octubre, diciembre; mientras que en la cohorte 2, se aplicaron 6 baños durante los meses de enero, marzo, mayo, junio, septiembre, diciembre. Con respecto a la droga utilizada es la misma para ambas cohortes, la formamidina.

2.3.2. Estudio transversal

En relación a las variables cualitativas nominales como: tipo de explotación- exclusivamente ganadera-, tipo de bovinos -sólo para carne- y uso de acaricidas, los 20 productores contestaron con la misma respuesta, por lo que no hubo variaciones y se las consideró homogéneas. Por esta razón fueron eliminadas del modelo elegido.

Los datos de la encuesta útiles para las evaluaciones epidemiológicas y los resultados de la estadística descriptiva, se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8: Resultado de la encuesta realizada en el estudio transversal, destacando las variables más importantes(n: 20 productores).

Variables continuas independientes	$\bar{x}$	D.E.
Sistema alimentario (Equivalente vaca)	0,48	0,10
Nº de tratamientos anuales, n	5,95	2,01
Ocurrencia de casos clínicos (Anaplamosis), n	4	3,35
Ocurrencia de casos clínicos ("Tristeza"), n	6	3,89
Incidencia anual*, %	0.9	0,7

* Casos último año/ población susceptible (bovinos > 3 meses) x 100

En relación a esos datos, se destacó la diferencia encontrada en base a los productos utilizados, la forma de aplicarlos y los meses de aplicación. En relación a los productos acaricidas utilizados, 10/20 (50%) productores utilizaron la combinación formamidina/avermectinas. La otra combinación aplicada fue piretroide/avermectinas 2/20 (10%) y sólo formamidina 6/20 (30%) o piretroide 2/20 (10%). La forma de aplicación de los acaricidas utilizada fue: combinada inmersión/inyectables 5 /20 (25%) de los productores, derrame/inyectable 6/20 (30%), aspersión/inyectable 2/20 (10%) por derrame 6/20 (30%) o inyectable únicamente 1/20 (5%).

La categorización de los establecimientos según h, mostró la siguiente distribución (ver sección 2.1.1.); se agruparon en 1= $\leq 0,009$ h baja (7/20); 2= $>0,009$ h alta (13/20). Con respecto, a la aplicación del estadístico de *Fischer* (STATISTIX), no se encontró asociación significativa ($p > 0,05$) entre tipo de producto acaricida, ocurrencia de casos clínicos y E.V, con los dos niveles de h (Tabla 9).

No se encontraron diferencias significativas entre cantidad de baños anuales ($p = 0,0043$); tipo de sangre ($p = 0,0012$) y h.

Tabla 9. Tablas de contingencia, asociación entre establecimiento con dos niveles de h y tres características de los mismos.

1.Tipo de producto	Combinado	Solo	Total
Baja (h)	6	1	7
Alta (h)	6	7	13
Prueba exacta de <i>Fisher</i> P=0,1056 NS	12	8	20

2. Ocurrencia de casos clínicos	< 5	> 5	Total
Baja (h)	3	4	7
Alta (h)	9	4	13
Prueba exacta de <i>Fisher</i> P=0,2508 NS	12	8	20

3. E.V.	< 0,5	> 0, 5	Total
Baja (h)	3	4	7
Alta (h)	7	6	13
Prueba exacta de <i>Fisher</i> P= 0,5 NS	10	10	20

2.4 De la estadística de la información

2.4.1. Estudio longitudinal

Se aplicó el test *ANOVA* para medidas repetidas procedimiento *MIXED*, (Littell *et al.*, 1998) donde se observó que hay interacción entre el efecto tiempo y ambas cohortes. Además fueron significativas las diferencias entre cohortes y tiempo. Como así también las diferencias para los meses 1 (0.0037), 2 (0.0001), 3 (<0.0001) y 6 (0.0527). Por otra parte, se aplicó otro test del programa *SAS*, el *GLM Procedure*, para comprender mes por mes, dónde se hallaron diferencias significativas en los tres primeros meses. A partir del cuarto mes no se hallaron diferencias significativas en los niveles de anticuerpos entre ambas cohortes.

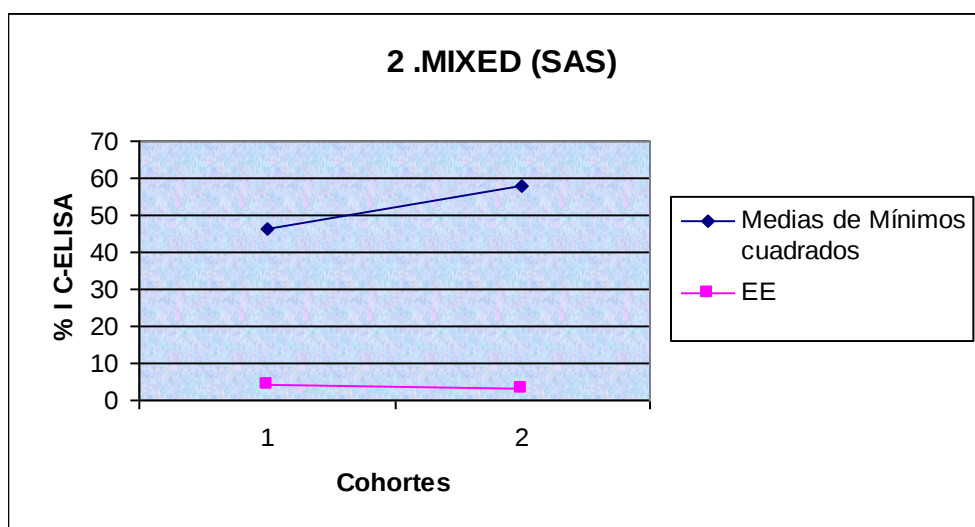
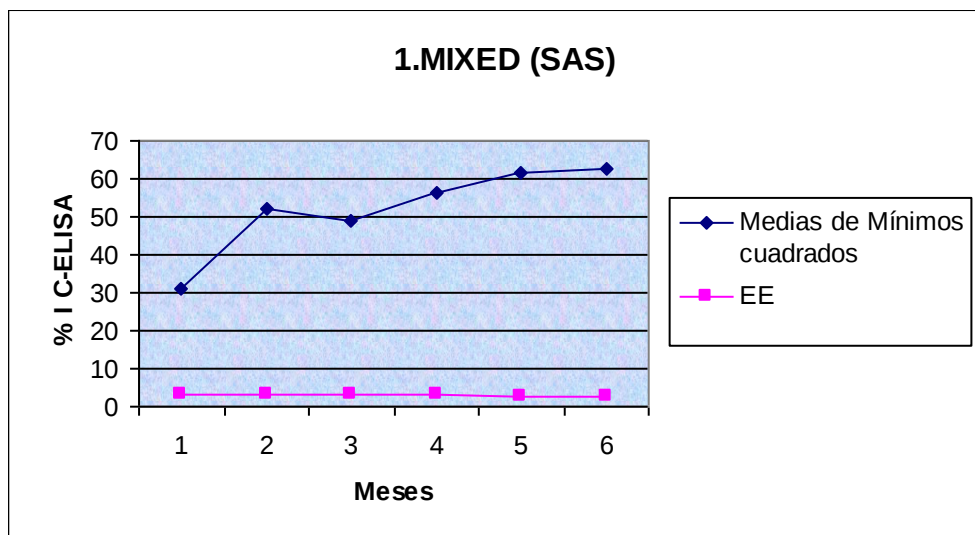


Gráfico 8: Salida de *MIXED (SAS)* para el estudio longitudinal, 1) Durante los seis meses; 2) En ambas cohortes.

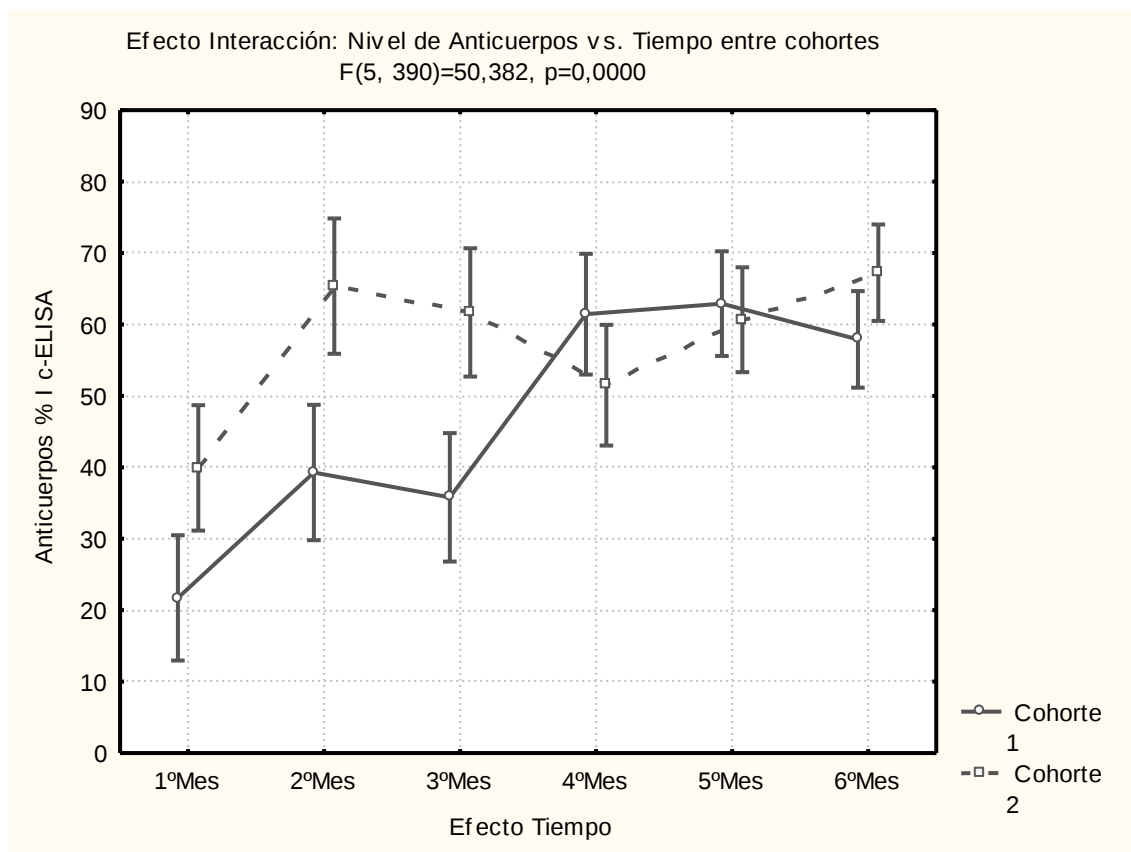


Gráfico 8. ANOVA del estudio longitudinal en ambas cohortes durante los primeros 6 meses de vida.

2.4.2. Estudio transversal

El análisis de la regresión múltiple, determinó que las variables que se encontraban asociadas a h (variable dependiente) fueron proporción de *Bos Indicus*, cantidad de baños anuales y ocurrencia de casos clínicos. Esta asociación fue inversamente proporcional con un $r^2 = 96\%$. El β fue significativo para los tipos de producto formamidina y piretroide.

Tabla 10. Resultados del análisis de regresión múltiple en el estudio transversal.

Variable dependiente	H
Número de casos	20
r múltiple	0,9822
r ²	0,9647
r ² ajustado	0,9457
F	50,8354
Df	7,13
EE	0,5607

Variable independientes	β
E.V.	0,114
Tipo de sangre	0,5
Cantidad de baños anuales	-0,27
Tipo de producto (avermectina)	0,09
Ocurrencia de casos clínicos	0,01
Tipo de producto (piretroide)	0,610
Tipo de producto (formamidina)	1,44

CAPITULO V. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Estudio longitudinal

Los resultados del presente estudio mostraron que a los 4 meses de edad ambas cohortes localizadas en el departamento de Empedrado alcanzaron estabilidad enzoótica para anaplasmosis (Gráfico 1).

Las principales diferencias encontradas en las características de los animales entre las dos cohortes fueron el tipo de razas, y el manejo en relación a los productos garrapaticidas utilizados. La mayor tasa de infección se detectó en la cohorte 2, constituida por terneros de raza Hereford, mientras que la menor estuvo asociada a la raza Braford (cohorte 1). En concordancia con estos resultados, en la cohorte 2 una mayor proporción de terneros tuvo anticuerpos específicos contra *A. marginale* al mes de vida. Asumiendo que estos anticuerpos fueron ingeridos a través del calostro (ya que no podría ser infección adquirida, debido a que el período de incubación de la anaplasmosis es mayor a 30 días), se puede inferir una mayor tasa de infección en las madres de la cohorte 2 respecto de las de la cohorte 1.

En relación a las razas, como lo señalaron Rogers *et al.*, (1978) en Australia, Madruga *et al.*, (1985) en Brasil y Aguirre *et al.*, (1988) en el noroeste Argentino, el tipo *Bos indicus*, no sería más resistente a la infección por *A. marginale* sino menos vulnerable a la acción de los transmisores debido a las características de su piel. Ésta afectaría la eficiencia de la transmisión horizontal, la que estaría disminuida en *Bos indicus* con la consecuente reducción del nivel de infección de *A. marginale*.

En relación al manejo, la cantidad de baños anuales marcó la diferencia entre las cohortes ya que en ambos casos se utilizó la misma droga (formamidina). En la cohorte 1 se realizaron 2 baños anuales más que en la cohorte 2, por lo cual los animales de esta última, tuvieron mayor oportunidad de contacto con *B. (R) microplus*. Dado que los productos utilizados tienen una acción garrapaticida primordialmente, el efecto contra los dípteros hematófagos, se considera limitado (Viera *et al.*, 2002).

A este respecto, Rios *et al.*, (1990), demostraron que en dos establecimientos ubicados en la provincia de Salta, con diferente nivel de infestación de *B. (R) microplus*, se logró una tasa de infección similar por *A. marginale* en un mismo período, no encontrándose relación alguna entre los picos de infestación de garrapatas y las primo-infecciones. Los autores concluyeron que para esa situación *B. (R) microplus* tendría un rol menos importante en la transmisión de *A. marginale* que el previamente supuesto. Esto sugirió que los insectos hematófagos jugarían un rol preponderante en la transmisión de *A. marginale* en esa zona.

Sin embargo, en el presente estudio, la relación inversa entre n de tratamientos garrapaticidas y tasa de infección encontrada en la cohorte 1, indicaría que la transmisión de *A. marginale* estaría dada principalmente por la garrapata, aunque la mayor susceptibilidad a la infestación de garrapatas por el biotipo bovino podría también haber colaborado para obtener este resultado. La presencia y abundancia de insectos hematófagos en ambas cohortes no fue evaluada, por lo que no es posible arribar a una conclusión. Los diferentes métodos de control para *B. (R) microplus* no interfirieron para lograr la estabilidad enzoótica para anaplasmosis a la temprana edad de 4 meses.

La transmisión a través de dípteros hematófagos, independiente de los tratamientos garrapaticidas, queda a la vista en diferentes áreas endémicas, cuando los análisis serológicos para evaluar estabilidad enzoótica en terneros, muestran tasas de infección < al 10% para *Babesia spp* cuyo único vector es la garrapata y > al 80% para *A. marginale* (*).

La presencia de anticuerpos calostrales específicos para *A. marginale* fue evidenciada por AP y *c-ELISA*, en los terneros de un mes de vida (Gráfico 4 a y b).

La zona de inflexión observada en relación al perfil de los anticuerpos detectados por *c-ELISA* entre los 60 y 90 días para la cohorte 1 y entre 60 y 120 días para la cohorte 2 (Gráfico 5 a y b), respondería a la extinción de los anticuerpos calostrales y a la emergencia de inmunoglobulinas en respuesta a las primo-infecciones ocurridas naturalmente.

* Torioni de Echaide, comunicación personal.

Las diferencias significativas encontradas entre los niveles de anticuerpos a través del tiempo entre las dos cohortes ($p < 0,005$), y entre la persistencia y los niveles de anticuerpos ($p < 0,005$), durante los primeros meses de vida confirma una relación directa entre: > tasa de infección: > nivel de Ac calostrales: > persistencia de Ac calostrales para la cohorte 2 respecto de la cohorte 1. Madruga *et al.*, (1985) en un estudio realizado en relación a los anticuerpos calostrales, observaron un incremento de la proporción de terneros serológicamente negativos a los 30 días de edad, con una extinción máxima de 60 días. Esta situación fue similar a la encontrada en la cohorte 1, aunque la persistencia de los anticuerpos calostrales en este caso se extendió hasta los 90 días.

Hay claras evidencias que las primo-infecciones de *A. marginale* ocurrieron en terneros con inmunidad calostrale, como lo demuestran los terneros N° 4 y N° 5 de la cohorte 1 y los N° 2 y N° 3 de la cohorte 2, cuando a los tres meses de edad experimentaron una seroconversión positiva con una franca inversión de la tendencia negativa que caracteriza la extinción de los anticuerpos calostrales, (Gráfico 5 a y b).

Dentro de la categoría de terneros que resultaron serológicamente negativos en el primer mes, la seroconversión positiva ocurrió en el segundo mes de vida, por lo que basados en el período de prepatencia, se puede inferir que en estos terneros las primo-infecciones ocurrieron durante el primer mes de vida como lo muestran 4 de 5 terneros de la cohorte 1 (terneros N° 1, 2, 3 y 5) y 5 de 5 terneros de la cohorte 2 (terneros 1, 2, 3, 4 y 5) analizados (Gráfico 6 a y b). Los resultados permiten concluir que los terneros con inmunidad calostrale se infectaron más tarde que aquéllos que no la adquirieron, debido probablemente a una resistencia a la infección de *A. marginale* otorgada por los anticuerpos maternos. Madruga *et al.*, (1985) determinaron las primeras parasitemias a partir de los 30 días de vida y con una media máxima alcanzada a los 90 días. Además los autores demostraron que la inmunidad humoral fue un importante factor de resistencia para *A. marginale* con un período crítico en torno a los 60 días de edad (tiempo de extinción), a partir del cual los terneros podrían desarrollar anaplasmosis.

Knowles *et al.*, (1996), encontraron que en bovinos inoculados con *A. marginale* por vía endovenosa la seroconversión positiva más temprana ocurrió una semana antes que la ricketsemia patente, registrándose valores de 0,1% de eritrocitos infectados (EI), con un período mínimo de prepatencia de 22 días. En condiciones naturales e involucrando a la garrapata en la transmisión, la mayoría de los autores coinciden que el período de prepatencia es mayor a 40 días, sin embargo algunos informes indican períodos de tan solo 21 días (Connell & Hall, 1972; Leatch, 1973 ; Connell, 1974).

Sanborn *et al.*, (1932) trabajado con insectos hematófagos, encontraron prepatencias de 30 a 73 días.

En el presente estudio, los terneros con anticuerpos calostrales mostraron una seroconversión positiva a partir de los 3 meses de vida, por lo tanto teniendo en cuenta el período de prepatencia, las primo-infecciones ocurrieron durante los dos primeros meses de vida (Gráfico 5 a y b). Sin embargo como las parasitemias no fueron evaluadas, no se pudo determinar si las infecciones fueron más tardías o si el período de incubación fue mayor respecto de los terneros sin anticuerpos calostrales.

Está ampliamente demostrado que los anticuerpos calostrales confieren inmunidad pasiva a los terneros frente a varias infecciones (Blood Henderson, 1988; Tyzzar, 1989). Ristic & Nyindo (1973) y Buening (1973) reportaron que *in vivo*, la presencia en suero de anticuerpos anti-*Anaplasma*, no fue efectiva para la prevención de manifestaciones clínicas cuando los animales fueron expuestos a un desafío.

No obstante, un estudio realizado por Kuttler *et al.*, (1962) sugirió la posibilidad de que otros factores inmunitarios maternos indefinidos contra la anaplasmosis podrían transferirse de vacas portadoras hacia sus terneros lactantes.

En 1984, Zaugg & Kuttler, no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de los anticuerpos calostrales y/u otros factores maternos y la protección en la progenie, sin embargo observaron un período de prepatencia mayor con anemia y parasitemia leves. En terneros de madres libres de anaplasmosis, en

condiciones experimentales el período de prepatencia fue de 18 a 25 días y para terneros de madres portadoras fue de 21 a 36 días, la prepatencia media fue 21 y 29 días respectivamente.

El estudio realizado en los 42 terneros menores de 25 días del establecimiento La ELISA (cohorte 3) indicó que un 17% (7/42) fue positivo a c-ELISA. Este porcentaje fue ligeramente inferior a los del año anterior donde un 25% (10/40) de terneros del mismo rodeo resultó positivo a c-ELISA (Tabla 3), aunque las diferencias no fueron significativas. Teniendo en cuenta que las infecciones postnatales en terneros que no recibieron inmunoglobulinas específicas a través del calostro pueden ocurrir en el primer mes de vida y que los terneros de la cohorte 1 tenían 30 días de edad promedio al momento de la toma de muestras, se puede considerar que la situación epidemiológica de anaplasmosis fue similar en los dos años consecutivos.

Los resultados de la evaluación realizada en La ELISA durante dos años consecutivos indicaría que una proporción importante de madres no estaba infectada con *A. marginale*, lo que refleja una situación de riesgo de ocurrencia de casos clínicos en el período 2002-2003. No obstante, sus terneros lograron la estabilidad enzoótica a edad temprana. Esta situación condice con los casos clínicos en bovinos adultos reportados por los productores para ese período, lo que indica cambios en la situación epidemiológica de la anaplasmosis, dado que las nuevas generaciones de terneros alcanzaron la estabilidad a los 6 meses de edad. La causa de esta variación podría adjudicarse a cambios climáticos o de manejo.

Se le adjudicaría importancia ya que las madres en la edad que poseían resistencia natural no tomaron contacto con los vectores, debido a los cambios climáticos ocurridos, principalmente en el año 1998, donde las precipitaciones en los meses de marzo y abril llegaron a los 400mm, superando a la media de 127,4 mm (Apéndice, Gráfico 9 y 10).

En ninguno de los siete terneros serológicamente positivos encontrados en la cohorte 3, se identificó el gen *msp5* de *A. marginale* a través de PCR, lo que indica que

terneros recibieron anticuerpos calostrales y no se infectaron después del nacimiento. Sin embargo no se puede descartar la ocurrencia de alguna infección intrauterina por un resultado negativo en *PCR*, ya que cuando las parasitemias son muy bajas la *PCR* o su variante *nPCR* pueden no detectarlas. En relación a las bajas parasitemias Torioni de Echaide *et al* (1998) demostraron que el *nPCR* fue capaz de detectar una parasitemia equivalente a 30 eritrocitos infectados por ml y además del consistentemente bajo nivel de rickettsemia en siete animales portadores, infectados experimentalmente con *A. marginale*. Asimismo, el análisis de la secuencia del *msp5* mostró más del 95% de identidad entre 30 amplificaciones de *nPCR* de bovinos infectados naturalmente con cepas de campo de *A. marginale*.

La transmisión intrauterina de *A. marginale* ocurre principalmente cuando la madre se infecta en el último tercio de la gestación (Brinton *et al*, 1976; Ribeiro *et al*, 1995), con elevados niveles de parasitemia (Swift & Paumer, 1976). Aunque también ha sido registrada en crías de vacas portadoras crónicas (Zaugg & Kuttler, 1984; Ristick, 1960; Potglierter & Van Rensburg, 1987). Los terneros infectados *in-útero* pueden inducir anticuerpos propios (Briton *et al.*, 1976; Trueblood *et al.*, 1971; Ribeiro *et al.*, 1995), por lo tanto estas infecciones podrían ser confirmadas inmediatamente después del nacimiento a través de microscopía directa de *A. marginale* en extendidos de sangre coloreados *Ad hoc*, por *PCR* o a través de la detección de anticuerpos antes de la ingesta del calostro, hecho este último que confirmaría la producción de anticuerpos por el feto.

Brinton *et al.*, (1976) observaron títulos positivos de fijación de complemento en terneros nacidos de hembras infectadas. La subinoculación de sangre en estos terneros dio resultados negativos, por lo tanto los títulos de anticuerpos calostrales fueron atribuidos a la transmisión pasiva de las hembras confirmando los resultados obtenidos por Ristic, (1960). Sin embargo, Trueblood *et al.*, (1971) citado por Zaugg *et al.* (1984), comprobaron que el feto bovino fue susceptible a la anaplasmosis a partir de los 100 días después de la concepción y además fue capaz de producir anticuerpos contra *A. marginale*.

Ribeiro *et al.* (1995) demostraron que 36% (4/11) de los terneros recién nacidos, antes de la ingesta del calostro presentaban anticuerpos anti-*A. marginale*, detectados por el test de *DOT-ELISA*. Este dato sugiere la ocurrencia de la transmisión congénita de *A. marginale* en animales que recibieron la infección en el último tercio de la gestación, ya que las madres habían sido inoculadas con *A. marginale* a los 60 y 24 días antes del parto. La transmisión congénita fue demostrada también por Swift & Paumer (1976,1978); Zaugg & Kuttler (1984); Potglieter & Van Rensburg (1987).

En relación con la transmisión en animales portadores, 2,1% (2/97) presentaron anticuerpos contra *A. marginale*, (Ribeiro, 1995). Este dato difiere de las observaciones hechas por Piercy (1956) y Kuttler *et al.*, (1962), que no hallaron evidencias de transmisión vertical en terneros nacidos en áreas endémicas. Fowler & Swift (1975) y Zaugg (1985) sugieren que la infección fetal es causada por una fase extraeritrocitaria del agente que alcanza al feto y establece una infección activa durante la fase aguda, debido a mayor rickettsemia de la madre, que, a diferencia de la fase crónica, el animal mantiene la infección persistente, variando su rickettsemia de 0,000025 a 0,0025% (Eriks *et al.*, 1989).

Generalmente los terneros que nacen infectados, además de sus propios anticuerpos, adquieren también las inmunoglobulinas IgG₁ e IgA a través del calostro (Zaugg *et al.*, 1984), por lo que una *PCR* positiva acompañada de una serología positiva durante los primeros 25 días de vida podría ser indicativa de una infección intrauterina. Una *PCR* positiva pero con serología negativa, durante ese mismo período, podría indicar una infección postnatal dado que en condiciones naturales el período de prepatencia, concomitante con la seroconversión positiva no ocurriría antes de los 25 días (Knowles *et al.*, 1996).

De los 35 terneros negativos de la cohorte 3 de 20 días de edad promedio, tres fueron identificados por *PCR* como portadores de *A. marginale* (Figura 1), con serología negativa, por lo tanto, teniendo en cuenta lo antes expuesto, este resultado permite concluir que estas infecciones ocurrieron después del nacimiento. Si bien este hecho no pudo ser

comprobado en este trabajo debido a la imposibilidad de realizar *PCR* en muestras periódicas obtenidas desde las primeras horas después de nacidos, resulta difícil explicar que los terneros pudieran haber adquirido la infección *in-útero* y, por alguna causa desconocida, los tres terneros no hubieran generado sus propios anticuerpos ni ingerido los anticuerpos específicos contra *A. marginale* a través del calostro.

Estos resultados muestran que las primo-infecciones por *A. marginale* podrían ocurrir ya en el primer mes de vida, siendo las infecciones más tempranas en terneros que no recibieron calostro.

Rey Valeiron *et al.* (2003), evaluaron la presencia de *A. marginale* en terneros recién nacidos, hijos de vacas portadoras naturalmente infectadas, así como la respuesta de anticuerpos contra esta rickettsia. Se utilizaron 14 terneros con un promedio de siete días de nacidos, de los cuales se obtuvo sangre para evaluar la parasitemia, hematocrito, y suero para medir los anticuerpos mediante *ELISA*. Todos los terneros (n=14) mostraron anticuerpos calostrales, aunque con bajo título, y presentaron parasitemia entre los 17 y 30 días de nacidos. Los autores concluyeron que los terneros probablemente habrían adquirido la infección por vía transplacentaria con una deficiente inmunidad pasiva a través del calostro.

Sin embargo se han detectado las primeras parasitemias tan temprano como 21 días, por lo tanto la única manera de comprobar este evento es a través de la identificación de *A. marginale*, antes de la ingesta del calostro, ya sea por inoculación de terneros esplenectomizados o mediante la técnica de *PCR*.

Test diagnósticos

Tanto AP como *c-ELISA* resultaron útiles para el estudio epidemiológico de anaplasmosis, aunque AP detectó una mayor proporción de terneros positivos, identificándose dos momentos críticos entre ellos. El primero ocurrió a los 30 días de edad cuando la relación entre proporción de positivos AP/*c-ELISA* fue de 50%/25% para la

cohorte 1 (Kappa: 0,500) y 68%/58% para la cohorte 2 (Kappa: 0,578). En la cohorte 1, los 10 animales que fueron positivos a AP y negativos a *c-ELISA*, seroconvirtieron positivamente al *c-ELISA* al mes siguiente, lo cual indicaría que los animales estarían incubando la enfermedad. El segundo momento crítico en relación a la proporción de positivos AP/*c-ELISA* se observó a los 3 meses de edad en la cohorte 1 y a los 4 meses en la cohorte 2, en coincidencia con el tiempo de extinción de los anticuerpos calostrales detectados por *c-ELISA* y las seroconversiones ocurridas en cada cohorte.

En los otros muestreos no se registraron diferencias de importancia entre las dos pruebas serológicas.

Los resultados indican que AP es una prueba de mayor precocidad para detectar primo-infecciones, lo que se debería al amplio espectro de antígenos que expone a los diferentes isotipos de anticuerpos. Las IgM son las de mayor avidez para la aglutinación y son las primeras que aparecen, sin embargo poseen menor afinidad por lo que pueden ocurrir uniones inespecíficas con IgM generadas por otros organismos (Tizzard, 1989).

Molloy *et al.*, (1999), observó que, aunque AP y *c-ELISA* mostraron la misma sensibilidad, ésta última demostró mayor especificidad. Además, tiene mayores ventajas en lo que se refiere a la metodología de trabajo, respecto de AP, ya que en este último test, los resultados son influidos por las condiciones de laboratorio y la interpretación subjetiva del operador.

En el presente estudio, AP aparentó poseer mayor sensibilidad respecto de *c-ELISA* para la detección de los anticuerpos calostrales, este resultado podría ser debido a una menor especificidad dada por la presencia de anticuerpos contra antígenos comunes a otros microorganismos relacionados filogenéticamente, como lo fue descrito para otras bacterias (Nielsen *et al.*, 2004).

En contraste *c-ELISA* resultó de gran valor para cuantificar la respuesta inmune, con alta especificidad (95%) y consistencia generando una clara polarización entre negativos y positivos. Su especificidad se basa en el uso de un anticuerpo monoclonal

AnaF16C1 (Visser *et al.*, 1992; Knowles, 1996) que permite identificar con gran afinidad un epítipo de la proteína MSP5 de *A. marginale*. Por hallarse ésta conservada entre otras especies de *Anaplasma* (*A. ovis*, *A. centrale*, *A. phagocitophila*) pueden obtenerse reacciones cruzadas entre ellas, (Ndung'u *et al.*, 1995; Tebele *et al.*, 1991; Visser *et al.*, 1992; Dreher *et al.*, 2005).

Aunque en diferentes experimentos la sensibilidad de la prueba superó el 95% (Torioni de Echaide, 1998; Molloy, 1999), ésta podría estar afectada por el hecho de que el antígeno esté restringido a un único epítipo, mientras que AP responde a múltiples antígenos, que se pusieron en evidencia en los dos momentos críticos de este estudio. Uno durante la fase de incremento de los anticuerpos en respuesta a las primo-infecciones y el otro durante la fase de extinción de los anticuerpos calostrales, lo que indicaría que en c-ELISA requeriría una mayor concentración de anticuerpos para inhibir el epítipo de MSP5, en relación a la requerida en AP para aglutinar múltiples epítipos.

2. Estudio transversal

Los terneros de los 20 establecimientos localizados en el departamento de Bella Vista (todos infestados con *B (R) microplus*), se encontraron en estabilidad enzoótica. Esta situación indica que los terneros tuvieron una tasa de inoculación diaria (h) hipotética > 0.05 hasta la edad de muestreo y permitió predecir para esa generación la ausencia de casos clínicos a un nivel de importancia económica por *A. marginale*. Este resultado no coincide con los antecedentes que indicaban inestabilidad enzoótica en establecimientos del departamento de Bella Vista, en terneros menores de un año con informes de casos clínicos en bovinos jóvenes y adultos (Vanzini *et al.*, 1999; Cetrá *et al.*, 2000). Los registros climatológicos históricos del departamento Bella Vista, indican condiciones climáticas propicias para generar un ambiente para la proliferación de los transmisores de *Anaplasma* spp., sin embargo se registraron cambios climáticos y prácticas de manejo que podrían afectar la situación epidemiológica de la anaplasmosis.

El estudio transversal se realizó entre mayo y agosto de 2003, en terneros de 6 a 10 meses de edad, por lo que estuvieron en un ambiente altamente favorable para el desarrollo de los transmisores, con precipitaciones mensuales mayores a 150 mm, temperaturas superiores a 25°C y humedad relativa mayor a 60% (Apéndice, Gráfico 9), desde la primavera de 2002 hasta el otoño de 2003, lo que explicaría la alta tasa de inoculación de *A. marginale* en los terneros, nacidos y madres en ese período. A esto habría que agregarle la probable inoculación de *A. marginale*, en prácticas rurales que implican transmisión de sangre infectada.

En contraste, la situación ambiental en años anteriores pareció diferente. Durante 1998 se registraron precipitaciones por encima del promedio con picos de hasta 400 mm en el mes de abril que provocaron inundaciones y el consiguiente lavado de los campos. Estas condiciones climatológicas, podrían haber afectado la viabilidad de las larvas de garrapatas normalmente presentes durante todo el año, como lo señaló Ivancovich en 1984, para la localidad El Sombrero Corrientes, con la consiguiente generación de poblaciones de bovinos susceptibles a la anaplasmosis. Esto podría explicar la casuística (33%) de anaplasmosis reportada en bovinos de Bella Vista para ese período (INTA Mercedes), antecedente que motivó la selección de los rodeos de este departamento en búsqueda de rodeos en inestabilidad enzoótica.

Con respecto a las prácticas de manejo, habría que considerar que las superficies de campo utilizadas para la producción de arroz, son destinadas luego a la ganadería, hecho que favorece también la reducción notoria de la población de garrapatas y con ella de la tasa de inoculación de *A. marginale*, generando también situaciones de inestabilidad enzoótica.

A diferencia de lo que sucede con las garrapatas, en relación a los cambios ambientales, los dípteros hematófagos como tábanos y mosquitos, estarían favorecidos además por la presencia de agua. Ya que una parte de su ciclo evolutivo, comprendido por los estadios de huevo, larva, pupa y adultos se realiza en el agua. Por ejemplo los tábanos

depositan los huevos en los lugares más sombríos y húmedos, sobre el agua, en la superficie de hojas y plantas. Si el medio les favorece se desencadenan mudas sucesivas y en un mes logran transformarse en pupas o de lo contrario las larvas hibernan (Boero, 1974).

Los mosquitos desarrollan su máxima actividad en el verano. Las hembras depositan sus huevos sobre la superficie del agua, los cuales tienen una estructura especial dotada de una cámara de aire que les permite mantenerse indefinidamente sobre la superficie y en pocos días se transforman en pupa. Por eso en los lugares de depósitos de aguas naturales como lagunas y esteros, comunes en la zona de estudio, asegurarían la presencia constante de estos transmisores, independientemente de los cambios climáticos, que pudieran ocurrir (Boero, 1974).

En relación a los productos utilizados para el control de la garrapata se destacan diferentes principios activos, frente algunos de los cuales el ectoparásito fue adquiriendo resistencia. En la actualidad, se emplean tres principios activos aprobados para baños de inmersión, los piretroides, los fosforados y la formamidina. Más recientemente, las lactonas macrocíclicas (avamectinas, doramectina, ivermectinas y moxidectina), aportaron sus beneficios y fueron incorporados también en los planes de control (Lucas, & Lamberti, 2006).

De la encuesta realizada a los 20 productores de Bella Vista surge que en los rodeos de estudio se realizaron sistemáticamente al menos seis tratamientos anuales con diferentes productos garrapaticidas con predominio de la combinación formamidina/ivermectina, y las formas de aplicación más utilizadas fueron inmersión/inyectable y derrame *pour on*/inyectable.

De los 20 rodeos analizados, en 13 (54%) se aplicó garrapaticida como droga única, siendo la formamidina empleada en el 85% de los casos. Esto concuerda con lo observado por Guglielmone *et al.*, (2007), referido a una mayor frecuencia de tratamientos anuales y el uso de formamidina en la provincia de Corrientes.

Hay que considerar que la concentración de los principios activos de los baños de inmersión ha sufrido distorsiones a través de los años influenciado por factores tan dispares como costos, zona, vigilancia, atención profesional y educación del encargado. Lucas & Lamberti, (2006) señalaron que entre los años 1985 y 2000, la concentración de las drogas alcanzaba a los 200 partes por millón requerida, sólo en el 13% de los bañaderos estudiados.

La mayoría de los productos utilizados como garrapaticidas, no son tan eficientes como insecticidas (Kessler, 2001). Los piretroides que poseen acción insecticida y repelente, fueron usados solamente en tres rodeos. Por lo cual el tipo de producto no afectaría la presencia de dípteros hematófagos sobre los animales. Hay que tener en cuenta que el control de los dípteros hematófagos se basa en la aplicación de insecticidas en sus moradas (huecos de árboles, restos de heno, corrales) y no sobre el animal, ya que se posan para alimentarse pocos minutos. Esto reforzaría la hipótesis de que en los 20 rodeos, a pesar del control de la garrapata, la transmisión de *A. marginale*, habría estado asegurada probablemente por los dípteros hematófagos.

El análisis estadístico entre el factor identificado como tipo de producto, referido a su forma de aplicación como droga combinada o única, y la tasa de inoculación no mostró asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$), (tabla 9.1). Estos resultados no eran los esperados, considerando las investigaciones que indican que la combinación de productos potencia la acción farmacológica (Lucas & Lamberti, 2006) como antiparasitario externo y ecto-endocidas, generando un control más eficiente sobre la garrapata que cuando se utiliza como droga única.

En relación al factor referido a la cantidad de baños no se encontraron diferencias significativas respecto de la tasa de inoculación. Los resultados parecen indicar que a pesar

de los seis a nueve tratamientos realizados por año, la tasa de inoculación se mantuvo alta. Esto indicaría una vez más el rol preponderante de los dipteros hematófagos en la transmisión de *A. marginale*.

En relación a la ocurrencia de casos clínicos en el año, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el grupo de los trece rodeos que tuvieron una alta tasa de inoculación ($h > 0,009$), con los siete rodeos que tuvieron una menor tasa de inoculación ($h < 0,009$), (Tabla 9.2). Los resultados tampoco fueron coherentes con lo esperado, ya que de acuerdo con Mahoney & Ross, (1972) cuando disminuye la tasa de inoculación los rodeos se encontrarían en inestabilidad enzoótica, con animales que no toman contacto con los agentes cuando son resistentes naturalmente y lo hacen como adulto donde aumenta el riesgo de manifestar la enfermedad clínicamente.

La situación encontrada podría deberse al inconveniente de la dificultad para discriminar los casos clínicos causados por *A. marginale* de aquéllos por *Babesia* spp., ya que sus síntomas se confunden en la entidad conocida vulgarmente como “Tristeza” y son tratados, sin previo diagnóstico de laboratorio para identificar el agente etiológico causal.

A pesar de la resistencia natural a la enfermedad que poseen los bovinos jóvenes, cuatro productores encuestados respondieron que durante el último año tuvieron casos clínicos de anaplasmosis en terneros mayores de tres meses, y seis no pudieron identificar si se trataba de anaplasmosis o babesiosis. Esta información coincide con los hallazgos de Vanzini *et al* (1999) en rodeos de Bella Vista.

Curiosamente en relación a la variable E.V. (carga bovina/ha), y su correspondencia con la tasa de inoculación, no se encontraron diferencias significativas ($p = 0,5$) entre los 10 rodeos que tenían $< 0,5$ E.V., y los otros 10 rodeos con $> 0,5$ E.V. (Tabla 9). Se esperaba que al aumentar el E.V., la mayor la tasa de contacto entre los animales favorecería la transmisión de *A. marginale*. No son comunes en la zona de estudio los espacios reducidos, y la producción es primordialmente extensiva. Este resultado podría

estar condicionado por algún otro factor no considerado en este estudio, como la presencia de reservorios de agua en la superficie considerada para E.V.

El análisis estadístico entre el factor tipo de sangre (*Bos taurus*, *Bos indicus*) clasificado como ½ sangre (acebuzados) y 3/8 sangre (pampizados) y tasa de inoculación no mostró diferencias significativas. Estos resultados concuerdan con los de Bock *et al.* (1999), que observaron que la resistencia innata de las razas cruzas y puras *Bos indicus* no fueron significativamente diferentes, confirmando que ambos son similarmente susceptibles a las infecciones por *Anaplasma spp.* En contraste Madruga *et al.* (1985), observaron que la parasitemia media de los terneros de la raza *Ibague* fue significativamente superior ($p < 0,05$) a los demás grupos experimentales, y sugieren una menor probabilidad de ocurrencia de anaplasmosis en la raza *Nelore* y en los animales ½ sangre *Nelore* respecto de las razas europeas estudiadas en la región.

Mediante el análisis de la regresión múltiple se encontraron resultados con mayor racionalidad que cuando el análisis se realizó en forma individual, lo que indicará la interacción múltiple de las diferentes variables en relación a la tasa de inoculación. Se encontró una asociación inversamente proporcional entre la tasa de inoculación (variable dependiente) y tipo de sangre, cantidad de baños y ocurrencia de casos clínicos. Una alta tasa de inoculación fue asociada con bovinos pampizados (3/8 *Bos indicus*), menor cantidad de baños y menor ocurrencia de casos clínicos, aunque para esta última variable no se discriminó entre la transmisión por garrapatas o dípteros hematófagos.

Si bien los 20 rodeos estuvieron en estabilidad enzoótica, tres de ellos tenían tasas de inoculación cercana al nivel crítico ($h=0,005$), en relación a los demás establecimientos estudiados (Tabla 5). Se identificaron como factores de riesgo al tipo de sangre y la cantidad de baños realizados en el año. Los tres rodeos tenían bovinos 3/8 sangre cebú y realizaban más de ocho baños por año.

Consideraciones generales

Debido a que la epidemiología de la anaplasmosis es un proceso dinámico condicionado por múltiples factores, surge la necesidad de establecer un control estratégico de la enfermedad en forma integrada, sin interferir con el ecosistema, y lograr el equilibrio ecológico.

La FAO (1979), denominó al Control Integrado de Plagas, como un sistema de manejo que, en el contexto del medio ambiente asociado al agrosistema y a la dinámica de población de especies, utiliza todas las técnicas disponibles para mantenerlas a niveles inferiores a aquéllos que causen daño económico. El objetivo principal es mantener las condiciones más favorables para el crecimiento y desarrollo del animal que se está produciendo, pero siempre tomando en cuenta el ambiente y los aspectos ecológicos y sociológicos ligados al mismo. Para lograrlo, poniendo el énfasis en la comprensión de las actividades de cada uno de los componentes del agroecosistema en tratamiento (Vigiani, 1990).

En la actualidad la resistencia a las drogas, es un fenómeno generalizado, que debería considerarse no sólo para las garrapatas sino también para las poblaciones de dípteros hematófagos. Se pretendería el uso racionalizado de los productos disponibles en el mercado para lograr un control eficaz de todos los transmisores, utilizando los recursos disponibles en el ecosistema, manteniendo el equilibrio entre las poblaciones de una comunidad, con la interacción entre competidores, depredadores y presas.

CAPITULO IV. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados de los estudios realizados en el área endémica de la provincia de Corrientes, se concluye que los rodeos se encontraban en estabilidad enzoótica para anaplasmosis durante el período estudiado.

En el estudio transversal, realizado en el departamento de Bella Vista, la prevalencia serológica hallada en terneros fue del 92%.

En el estudio longitudinal los resultados mostraron que a los 4 meses de edad ambas cohortes localizadas en el departamento de Empedrado alcanzaron la estabilidad enzoótica. Las diferencias significativas encontradas entre los niveles de anticuerpos a través del tiempo entre las dos cohortes ($p < 0,005$), y entre la persistencia y los niveles de anticuerpos ($p < 0,005$), durante los primeros meses de vida confirma una relación directa entre una mayor tasa de infección: mayor nivel de Ac calostrales y, a su vez, mayor persistencia de Ac calostrales para la cohorte 2 respecto de la cohorte 1.

Los anticuerpos calostrales específicos para *A. marginale* mostraron un efecto de resistencia a las infecciones naturales. En terneros sin inmunidad calostrale las primeras infecciones se detectaron durante el primer mes de vida, mientras que en aquéllos que habían ingerido calostro ocurrieron a partir de los dos meses de edad.

La persistencia de los anticuerpos calostrales es directamente proporcional al nivel de los anticuerpos, con un tiempo de extinción máximo de cinco meses.

La situación epidemiológica de la anaplasmosis es un proceso dinámico, condicionado por las variaciones del ecosistema.

Se encontró una asociación inversamente proporcional entre la tasa de inoculación (variable dependiente) y tipo de sangre *Bos indicus*, cantidad de baños y ocurrencia de casos clínicos. El uso de formamidinas y piretroides resultaron determinantes para una baja tasa de inoculación.

Se identificaron como factores de riesgo el tipo de sangre y la cantidad de baños realizados en el año, en tres establecimientos que poseían una tasa de inoculación cercana al nivel crítico ($h=0,005$), en el departamento de Bella Vista.

CAPITULO VII. PROPUESTAS

Estudiar los posibles transmisores de *A. marginale*, incluyendo la garrapata común para establecer programas de control que permitan cortar la cadena de transmisión.

Determinar la importancia del rol que juegan en la transmisión de *A. marginale* los dípteros hematófagos en relación a la garrapata en diferentes áreas endémicas de *B. (R) microplus*.

Investigar diferentes alternativas para el control de las poblaciones de los dípteros hematófagos, incluyendo el control biológico.

Demostrar la importancia de la transmisión vertical en la epidemiología de la anaplasmosis, con un diseño experimental que permita determinar la frecuencia de esta transmisión en rodeos con diferentes tasas de infección en zonas endémicas y libres de *B. (R) microplus*.

CAPITULO VIII. BIBLIOGRAFIA CITADA.

- Abdala, A.A.; Mangold, A.J.; Echaide S.T. de. 1992. Transmisión experimental de *Anaplasma marginale* por palpación rectal. Veterinaria Argentina. 9: 683-685.
- Aguirre D.H; Bermúdez, A.C.; Mangold, A.J. and Guglielmone, A.A. 1988. Infección natural con *Anaplasma marginale* en bovinos de raza Hereford Criolla y Nelore en Tucumán, Argentina. Rev. Latinoamericana de Microbiología. 30: 37-42.
- AlderinK, F.J. and Dietrich, R.A. 1982. Economic and epidemiological implications of anaplasmosis in Texas beef cattle herds. Proc. U. S. Anim. Health Assoc. 86: 66-75.
- Allegan, A.R. y Barbet, A.F. 1996. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 as a diagnostic test antigen. J. V. Clin. Microbiol. 34: 270-276.
- Allen, P.C.; Kuttler, K.L. and Amerault, T. E. 1981. Clinical chemistry of anaplasmosis comparative serum protein changes elicited by attenuated and virulent *Anaplasma marginale*. Am. J. Vet. Res. 42:326-328.
- Amerault, T.E. & T.O. Roby. 1968. A rapid card agglutination test for bovine anaplasmosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 153: 1828-1834.
- Anziani, O.S. 1979. Anaplasmosis en áreas libres de garrapatas. Reunión Anual Inf. Téc. INTA-EEERA Rafaela. pp 63-68.
- Anziani, O.S.; Hadani, A. ; Ford, A. C.;Guglielmone, A.A.; Bermudez, A.C.; Mangold, A. J.; Suárez, C.M. y Tarabla, H. A. 1981. Observaciones de campo y laboratorio sobre inoculación de bovinos Holando Argentino con una cepa de *Anaplasma marginale* modificada y atenuada. Gac. Vet. 43:962-974.
- Anziani, O.S.; et al. 1990. Seroprevalencia de la anaplasmosis bovina en áreas libres de garrapatas de la provincia de Santa Fé. Mem. 6° Reunión Anual de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. La Plata. Argentina, diciembre. 55.

- Anziani, O.S.; Bakos, E.; Mangold, A.J.; Signoroni, A.R.; Spath, E. J.A.; Vanzini, V.R.;
 Coordinador: Guglielmone, A.A. 1992. "Relevancia del diagnóstico de la
 anaplasmosis y babesiosis en la comercialización de vacunos inmunizados contra
 estas enfermedades". Informe de la Comisión Científica permanente de
 Enfermedades Producidas por Hemoparásitos y sus Transmisores de la Asociación
 Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Reunión Anual.
 Corrientes. Argentina, noviembre de 1992. 24-27.
- Baker, N.F.; Osebold, J.W. and Christensen, J.F. 1961. Erythrocyte survival in experimental
 anaplasmosis. Am. J.vet. Res. 22: 590-596.
- Barbet, A.F.; Palmer, G.H.; Myler, P.J. and Mc Guire, T.C. 1987. Characterization of an
 immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and
 expression of the gene coding for polypeptide Am105L. Infect. Immun. 55 (10):
 2428-2435.
- Barbet, A.F. 1995. Recent developments in the molecular biology of anaplasmosis. Vet.
 Parasitol. 57(1-3): 43-49.
- Barbet, A.F.; Blentlinger, R. ;Vi, J.; Lundgren, A.M.; Blouin, E.F. and Kocan, K.M. 1999.
 Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture,
 tick salivary glands, and cattle. Infect. Immun.167 (1):102-107.
- Benavides O. E. 1985. Consideraciones con relación a la Epidemiología de Anaplasmosis y
 Babesiosis en los bovinos. Revista ACOVEZ 9(31), 4-11.
- Benavides, E.; Vizcaíno, O.; Britto, C.M.; Romero, A. & Rubio, A. 2000. Attenuated
 Trivalent Vaccine against Babesiosis and Anaplasmosis in Colombia. Annals of the
 New York Academy of Sciences 916, 613-616.
- Berdie, J.; Cardozo, H., Nari, A.; Solari, M.A. y Meeusen, E. 1979. Prevalencia de *Anaplasma*
marginale en un área del departamento Rivera, mediante la prueba de aglutinación
 en placa. Veterinaria. Montevideo, Uruguay.15:55-59.

- Blood, D.C.; Henderson, J.A.; Radostitis, O.M. 1988. Medicina Veterinaria. Sexta edición. Nueva Editorial Interamericana. Capítulo 23.
- Bock, R.E. ; Kingston T.G.; DeVos A.J. 1999. Effect of cattle breed on innate resistance to infection with *Anaplasma marginale* transmitted by *Boophilus microplus*. Aust Vet J. 77:748-751.
- Boero, J.J. 1974. Parasitosis Animales. EUDEBA. 3º edición. Capítulo V.
- Brinton, L. Swift and Richard J.Paumer. 1976. Vertical transmission of *Anaplasma marginale* in cattle. Theriogenology.5(5): 515-521.
- Brown, W.C.; Shkap, V. ; Zhu, D. ; Mc Guire, T. C.; Tuo, W. ; McElwain T.F. & Palmer, G.H. 1998. CD4+T-Lymphocyte and Immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. Infec. Immun.66 (11): 5406-5413.
- Buening, G.M. 1973. Cell-mediated immune responder in calves with anaplasmosis. Am. J. Vet. 34(6):757-763.
- Bundy, D.A.P.; Hylton, G.A. and Wagner, G.C. 1983. Bovine haemoparasitic diseases in Jamaica, Trop. Anim. Hlth Prod., 15: 47-48.
- Cantor, G. H.; Pontzer, C. H. And Palmer, G.H. 1993. Opsonization of *Anaplasma marginale* mediated by bovine antibody against surface protein msp 1. Vet. Immunol. Immunopathol. 37(3-4): 343-350.
- Cetra, B.; Ramírez, L. M. y Vanzini, V. R. 2000. Control de la Babesiosis y Anaplasmosis Bovina en áreas endémicas. Nº 339 INTA, Mercedes.
- Connell, M.L. and Hall, W.T. K. 1972. Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick *Boophilus microplus*. Aust. Vet. J. 48: 477.
- Connell, M.L. 1974. Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick *Boophilus microplus*. Queensland J. Agric. Anim. Sci., 31 (3): 185-193.

- Cossio-Bayugar, R.;Rodriguez, S.D.; Garcia Ortiz, M.A.; García- Tapia, D. Y Abortes Torres, R. 1997. Bovine anplasmosis prevalence in northern Veracruz state, México. *Prev. Vet. Med.* 32 (3-4): 165-170.
- Cuellar Rivera, H.; Cuellar, A.M.; Chávez, G.B.; Carrique-Mas, J.J.; Walter, A. 2000. Estudio sobre babesiosis y anaplasmosis en relación con la carga de garrapatas en terneros lecheros del oriente boliviano. *Vet. Méx.* 31 (1): 39-46.
- Dalgliesh, R. J. y Stewart, N.P. 1982. Infectivity for cattle of *Anaplasma marginale* extracted from *Boophilu microplus* ticks exposed to certain temperatures. *Aust. Vet. J.* 58:24-26.
- De Vos, A.J.; Dalgliesh, R. J.; Callow, L.L. 1987. Babesia. In: Soulsby E.J.L. (E.d.). *Immune response in parasitic infections: immunology, immunopathology, and immunosuppression*, vol 3, Protozoa. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 183-222.
- DeFranco, A. L. 1993. B lymphocyte activation. In: *Fundamental Immunology*. Paul W. Raven Press.505-529.
- De la Fuente, J.; García- Garcia, J, Blouin, E. F. and Kocan, K.M. 2001. Differential adhesion of major surface proteins Ia and 1 b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *Int. J.parasitol.* 31 (2): 145-53.
- Descazeaux, J. 1924. L'anaplasmosse au Chili *Bull. Soc. Path. Exot.*17:639-642.
- Dikmans, G. 1950. The transmission of anaplasmosis, *Am. J. Vet. Res.*11(38)5-16.
- Draghi, M.G.; Cetra, B.; Ramirez, L.M. y Vanzini, V.R. 1997. Anaplasmosis y babesiosis. INTA EEA Mercedes, Corrientes, Argentina. Serie Técnica N°28. Noviembre.
- Drauncourt, M.; Raoult, D. 1994. Taxonomic position of the *Rickettsia*: current Knowledge. *Microbiol. Rev.* 13:13-24
- Dreher, M.U.: J. de la Fuente; Hofmann-Lehmann,R.; Meli, M.L.; Pusterla, N.; Tocan, K.M.; Woldehiwet, Z.; Braun, U. G.; Regula, Staerk, K.D.C.,Lutz. 2005. Serologic Cross-Reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 12 (10): 1177-1183.

- Dumber, J.S.; Barbed, A.F.; Beaker, C.P.; Dash, G.A.; Palmer, G.H.; Ray, S.C.; Rikihisa, Y. , and Rurangirwa, F.R. 2001. Reorganization of genera in the Families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the Order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent 'as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51 (Pt 6): 2145-65.
- Duzgum, A. ; Schunter, C.A.; Wright, I.G.; Leatch, G. Y Waltisbuhl, D.J. 1988. A sensitive ELISA technique for the diagnosis of *Anaplasma marginale* infections. Vet. Parasitol. 29: 1-7.
- Echaide, S.T. De; Rios, L.G. De y Aguirre, D.H. 1989. Evaluación de un antígeno de *Anaplasma marginale* para la prueba de aglutinación en placa. Memorias 5º Reunión Anual Asoc. Arg. Lab. Diag., pp 143-152.
- Eriks, I.S.; Palmer, G.H.; McGuire, T.C.; Barbet, A.F. 1989. Detection and quantitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle using a nucleic acid probe. J. Clin. Microbiol. 27:279-284.
- Eriks, I. S.; Stiller, D.; Palmer G.H. 1993. Impact of Persistent *Anaplasma marginale* Rickettsemia on Tick Infection and Transmission. Journal of Clinical Microbiology. 31(8): 2091-2096.
- Estrada Peña, A. 1985. Análisis de simulación de la epidemiología de la babesiosis. Rev. Iber. Parasitol. 45:219-231
- Ezequiel, M. y Fox, K.A. 1970. Methods of correlation and regression analysis. 3rd ed. London Sydney. Ed. J. Wiley y Sons, Inc. 548p.
- FAO. 1988. El control de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten, control de las enfermedades transmitidas por garrapatas. Roma, Italia.(2). Capítulo 8.
- Figuerola, J. V.; Alvarez, J. A.; Ramos, J.A.; Vega, C.A.; Buening, G.M. 1993. Use of multiplex polymerase chain reaction based assay to conduct epidemiological studies on bovine hemoparasites in Mexico. Revue Elev. MM.Vet. Pays Trop. 46:71-75.

- Fowler, D. and Swift, B.L. 1975. Abortion in cows inoculated with *Anaplasma marginale*. Theriogenology 4: 59-57
- Francis, D.;Kinden, D.A. y Buening, G.M. 1979, Characterization of the inclusion limiting membrane of *Anaplasma marginale* by immunoferriting labeling. Am. J. Vet. Res.40:777-782.
- French, D.M.; McElwain, T.F.; McGuire, T.C. and Palmer, G.H. 1998. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during cyclic rickettsemia. Infec. Immun. 66 (3): 1200-1207.
- Gale, R.C.; Dimmock, C. M. ; Gartside, M. ;Leatch, G. 1996. *Anaplasma marginale* detection of carrier cattle by PCR. Int. J. Parasitol. 26:1103-1109.
- Gautam, O.P. and Singh, B. 1971. Anaplasmosis-I: Incidence in cattle, sheep, and goats in Punjab and Haryana, Haryana Agri. Univ. J. Res. 1 (1):86-91.
- Garfias Bautista, C.R. 1996. La respuesta inmune celular en anaplasmosis bovina. Revista Ciencia Veterinaria 7: 315-329.
- Graat, L.; Casals, J. 1994. Proceedings of the seminar Models and quantitative methods in veterinary epidemiology. CIHEAM. Zaragoza. October.
- Ge, N.L.; Kocan, K.M.; Murphy, G. L. Y Blouin, E.F. 1997. Development of a nonradioactive in situ hybridization for detection of *Anaplasma marginale* in ticks. J. Histotechnol. 20:103-108.
- Guglielmone, A.A.; Mangold, A.J.; Gaido A.B.; Aguirre, D.H. 1990. Parasitismo natural por *Boophilus microplus* en bovinos *Hereford*, criolla, *Nelore* y cruza *Hereford* por *Nelore*. Rev. Med. Vet. (Bs As), 71:108-117.
- Guglielmone, A.A. 1990. Diagnóstico y situación epizootiológica, de las enfermedades de los vacunos asociadas a las garrapatas en la Argentina. Memorias 4º Reunión Anual de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Tandil. Buenos Aires, diciembre 1998. Pp. 41.49.

- Guglielmone, A.A. 1991. Epidemiología de las enfermedades hemoparasitarias de los vacunos. FAO. Oficina Regional para la América Latina y el Caribe. Red de Cooperación Técnica entre Laboratorios de Investigación y Diagnóstico Veterinario. Serie Rlac-gan. (35) 53. P.
- Guglielmone, A.A.; Mangold, A.J.; Gaido A.B.; Aguirre, D.H. 1992. Natural parasitism with *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in cattle biotypes with different proportions of *Bos taurus* (Spanish and British) and *Bos indicus* genes. Res. Rev. Parasitol, 52: 77-82.
- Guglielmone, A.A.; Aguirre, D.H.; Spath, E.A.; Gaido, A.B.; Mangold, A.J.; Ríos. 1992. Long-term study of incidence and financial loss due to cattle babesiosis in an Argentinian dairy farm. Prev. Vet. Med., 12: 307-312.
- Guglielmone, A.A. 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. Elsevier. Veterinary Parasitology 57:109-119.
- Guglielmone, A.A.; Castelli, M.E.; Mangold, A.J.; Aguirre, D.H.; Alcaraz, E.; Cafrune, M.M.; Cetrá, B.; Luciani, C.A.; Suarez, V.H. 2007. El uso de acaricidas para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) en la Argentina. RIA 36(1): 155-167.
- Habich, E. G.; Ríos, L.G. de; Hadani, A.; Condrón, R.S.; De haan, L. y Broadbent, D. 1982. Estudios sobre sanidad animal en el noroeste argentino. Prevalencia de animales con anticuerpos séricos contra *Babesia bovis* y *Anaplasma marginale* en tambos de Catamarca, Salta y Tucumán. Rev. Med. Vet. Buenos Aires. Argentina. 61: 9-19.
- INTA-FAO. 1979. Compendio del Curso de Perfeccionamiento en Control Integrado de Plagas. EERA-INTA. Pergamino (Bs. As.) Rep. Arg.
- Inokuma, H.; Terada, Y.; Kamio, T.; Raoult, D.; Brouqui, P. 2001. Analysis of the 16 rRNA gene sequence of *Anaplasma centrale* and its phylogenetic relatedness to other *Ehrlichia*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8:241-244.

- Ivancovich, J.C. 1984. Comportamiento de los estadios no parasitarios de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Canestrini). Siete diferentes localidades. Boletín EERA-INTA. Buenos Aires, Argentina. 129p.
- Jones, E. W. and Brock, W.E. 1966. Anaplasmosis bovina. Correlaciones clínica-patológicas. Proc. 5th Congr. Panama. Med. Vet. Zoot., Caracas, Venezuela, 254-260.
- Kessler, R.H. 2001. Consideraciones sobre la transmisión de *Anaplasma marginale*. Pesq. Vet. Bras. 21(4): 177-179.
- Kieser, S.T.; Eriks, I.S. y Palmer, G.H. 1990. Cyclic rickettsemia during persistent anaplasmosis infection in cattle. Infect. Immun. 58:1117-1119.
- Knowles, R.T.; Montrose, M.; Craig, T. M.; Wagner, G.G. and Long, R.F. 1982. Clinical and serological evidence of bovine babesiosis and anaplasmosis in St. Lucia. Vet. Parasitol., 10:307-11.
- Knowles, D., Torioni de Echaide, S., Palmer, G., McGuire, T., Stiller, D. y McElwain, T. 1996. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 Epitope Common to Tick and Erythrocyte Stages Identifies Persistently Infected Cattle. Journal of Clinical Microbiology. 34 (9):2225-2230.
- Kocan, K.M., Venable, J.H., Brock, W.E. 1978. Ultrastructure of anaplasma inclusions (Pawhuska isolate) and their appendages in intact and hemolyzed erythrocytes and in complement-fixation antigen. Am. J. Vet. Res. 39:1123-1130.
- Kocan, K. M.; Wickwire, K.B.; Ewing, S.A.; Hair, J.A. and Barron, S.J. 1988. Preliminary studies of the development of *Anaplasma marginale* in salivary glands of adult, feeding *Dermacentor andersoni* ticks. Am. J. Vet. Res. 49: 1010-1014.
- Kocan, K.M., Stiller, D., Golff, W. L. Claypool, P.L. Edwards, W. , Ewing, S.A., McGuire, T.C., Hair, J.A., Barron, S.J. 1992. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. Am. J. Vet. Res. 53 (4):499-507.

- Kreirer, J.P.; Ristic, M. & Schroeder, W. 1964. Anaplasmosis. XVI. The pathogenesis of anemia produced by infection with *Anaplasma*. Am.J. Vet.Res.25:343-352.
- Kuttler, K.L. 1962. Observations of possible immune responses in cattle to anaplasmosis not associated with active infection. Proc. Natl. Anaplasmosis Conf. 4:73-75.
- Kuttler, K.L.; Adams, L. G. And Zaraza, H. 1970. Study of the epizootiology of *Anaplasma marginale* and *Trypanosoma theileri* in Colombia, Inst. Colombiano Agro. Rvta., 5:127-148.
- Leatch, G., 1973. Preliminary studies on the transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*, Aust. Vet. J., 49:16-19.
- Littell, R.C.; Henry, P.R and Ammerman, C.B. 1998. Stastiscal analysis of repeated measures data using SAS procedures. J. Anim. Sci. 76:1216 -1231.
- Lombardero, O.J. & Schiffo, H.P. 1968. Diferencias tróficas y biológicas en *Boophilus microplus* de cebú y su derivado media sangre. Rev. Fac. Cienc. Vet. (La Plata), 10: 167-173.
- Lombardero, O.J.; Schiffo, H.P.; Pastori, R.B. 1972. El *Boophilus microplus* como parásito del cebú. Nuevas observaciones. Actas 5ª jorn. Int. Cienc. Vet. La Plata, 2: 49-55.
- Lopez de Ullibarri, G. I; Pita Fernandez, S. 2001. Medidas de concordancia: indice kappa. www.fisterra.com.
- Losos, G.J. 1986. Infectious Tropical diseases of domestic animals. International Development Research Centre, Canada.19: 742-795
- Lucas, C. y Lamberti, J.C. 2006. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Can. 1887): resultados del análisis químico de baños de inmersión para el control de la garrapata común del vacuno en el nordeste argentino. AAPAVET.
- Luis de la Rue, M. Ruiz Diaz, O. y Solari M. A. 1992. Analysis of bovine normal sera substitutes in the "Card-Test" reaction to *Anaplasma marginale*. Rev. Microbiol. Sao Paulo, Brasil. 23(3):206-207.

- Madruga, C.R.; Kessler, R.H; Gomes, A.; Schenk, M.A.M. and de Andrade, D.F. 1985. Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em áreas enzoótica, nos bezerros da raça *Nelore*, *Ibagé* e cruzamentos de *Nelore*. Pesq. Agropec. Bras., 20:135-142.
- Mahoney, D.F. 1962. The epidemiology of babesiosis in cattle. Aust. J. Sci. 24:310-313.
- Mahoney, D.F. and Ross, D.R. 1972. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. Aust. Vet. J. 48:292-298.
- Mangold, A.J.; Aguirre, D.H.; Bermudez, A.C.; Kuhne, G.I. y Guglielmone, A.A.; 1986. Infestaciones naturales de bovinos de raza *Hereford*, *Criolla* y *Nelore*, con *Boophilus microplus*. Vet. Arg. 3:238-246.
- McGarey, D. J. and Allred, D.R. 1994. Characterization of hemagglutinating components of the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. Infect. Immun. 62: 4587-4593.
- McGuire, T.C.; Musoke, A.J.; Kurtti, T. 1979. Functional properties of bovine Ig G1 and Ig G2: interaction with complement macrophages, neutrophils and skin. Immunol. 38:249-256.
- McGuire, T. C. and Musoke, A.J. 1981. Biologic activities of bovine Ig G subclasses. Adv. Exp. Med. Biol. 137:359-366.
- Molloy, J.B.; Bowles, P.M.; Knolwles, D.P.; Mc Elwain, T.F.; Bock, R.E.; Kingston, T.G.; Blight, G.W. and Dalgliesh, R.J. 1999. Comparison of a competitive inhibition ELISA and the card agglutination test for detection of antibodies against *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in cattle. Aust. Vet. J. 77:245-249.
- Ndung'u, L.W.; Aguirre, C.; Barbet, A.F. y McGuire, T.C., 1995. Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats using the MSP5 competitive inhibition Enzyme-linked. L. Clin. Microbiol. 33:675-679.

- Nicholls, M. J.; Ibata, G. and Vallejos Rodas, F. 1980. Prevalence of antibodies to *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in dairy cattle in Bolivia. Trop. Anim. Health Prod. 12:48-49.
- Nielsen, K.; Smith, P.; Widdison, J.; Gall, D.; Kelly, L.; Kelly, W.; Nicoletti, P. 2004. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* 0:9 and *Escherichia coli* 0157: H7. Veterinary Microbiology 100: 25-30.
- Norton, G.A.; Sutherst, R.W. y Maywald, G.F. 1983. A framework for integrating control methods against the cattle tick, *Boophilus microplus*, in Australia. J. Appl.Ecol. 20:489-505.,
- Otin, C. ; Wilson, A.J. and Campebell, R.S. F.1980. A comparative study of experimental anaplasmosis in *Bos indicus* and *Bos taurus*.1980. Aust. Vet. J. 56:262-266.
- Paine, G.D. & Miller, A.S.1977. Anaplasmosis in a newborn calf, Vet. Rec., 100:58.
- Payne, R.C. & Scott, M.J. 1982. Anaplasmosis and babesiosis in El Salvador. Tropical Animal Health Production. 14: 75-80.
- Palmer, G.H.; Barbet, A.F. ; Kuttler, K.L. ; Mc Guire, T.C. 1986. Detection of *Anaplasma marginale* common surface proteins in all stages of infection. J. Clin. Microbiol. 23:1299-1302.
- Palmer, G.H.; Barbet, A.F.; Musoke, A.J.;Katende, J.M.;Rurangirwa, F.R.;Shkap, V.; Pipano, E.; Davis, W.C.; McGuire, T.C. 1988. Recognition of conserved surface protein epitopes on *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale* isolates from Israel, Kenia y The United States. International Journal for parasitology. 18: 33-38.
- Parker, R.J.; Shepherd, R.K. ; Trueman, K.F. ; Jones, G. W. ; Kent, A.S.and Polkinghorne, I.G.1985. Susceptibility of *Bos indicus* and *Bos taurus* to *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* infections. Vet. Parasitol. 17:205-213.
- Payne, R.C. and Scott, J.M., 1982. Anaplasmosis and babesiosis in El Salvador. Trop. Anim. Health Prod., 14: 75-80.

- Patarroyo, J. H.; Villa, O. and Diazgranados, H. 1978. Epidemiology of cattle anaplasmosis in Colombia: I. Prevalence and distribution of agglutinating antibodies, Trop.Anim. HlthProd., 10:171-174.
- Perry, B.D.; Musisi, F.L.; Pergram, R. G.; Schels, H.F. 1985. Assessment of enzootic stability to tickborne diseases. World Annuam Review. 56:24-32.
- Piercy, P.L. 1956. Transmission of anaplasmosis. Ann NY Acad. Sci. 64:40-48.
- Poncet, A.L. 1987. Contribution on l'étude de l'anaplasmose bovine. Diagnostique différentiel avec les autres anémies des bovins. These, Ec. Nat. Vet. Lyon, 114.
- Potgieter, F.T. and Van Rensburg, L. 1987. The persistence of colostral *Anaplasma* antibodies and incidence of in utero transmission of *anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. Onderstepoort J. vet Res., 54:557-560.
- Potgieter, F.T. 1979. Epizootiology and control of anaplasmosis in South Africa, J.S. Afr. Vet. Med. Ass. 50:367-372.
- Potgieter, F.T.; Sutherland, B. And Biggs, H.C. 1981. Attempts to transmit *Anaplasma marginale* with *Hippobosca rufipes* and *Stomoxys calcitrans*, Onderspoort J. Vet. Res. 48:119-22.
- Rey Valeiron, C., Aso, P.M. y Coronado, A. 2003. Prevalencia de *Anaplasma marginale* y anticuerpos específicos en becerros neonatos. Acta Científica Venezolana, 54: 121-126.
- Ribeiro, M.F.B., Lima, J.D., Guimaraes, M.A., Scartamburlo, M.A. y N.E. Martins. 1995. Transmissao congenita da anaplasmose bovina. Arq bras. Med. Vet. Zootec. 3 (47): 297-304.
- Richey, J.L. y Palmer, G.H. 1990. Bovine Anaplasmosis. The Compendium Food Animal. 12: 1661-1669.
- Rios de L.G., Aguirre, D.H., Gaido, A.B. 1990. Infection naturelle par *Anaplasma marginale* chez deux troupeaux de bovins avec différents niveaux d'infestation par la tique *Boophilus microplus*. Revue Elev. Med. Vet. Pays trop, 43(4): 447-452.

- Ristic, M. 1960. Anaplasmosis. Adv. Vet. Sci. 6: 111-192.
- Ristic, M. 1968. Infectious blood diseases of man and animals. Vol. II Academic Press. 576 p.
- Ristic, M.; Nyindo, M. B.A. 1973. Mechanisms of immune response to an attenuated *A. marginale* vaccine. Proc. Natl Anaplasmosis Conf. 6 th. 66-70.
- Ristic, M. & Carson, C. A. 1977. Methods of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on use of the attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. In: Immunity to blood parasites of animals and man. Eds. L. Miller, J.A. Pino and J.J. McKelvey. Plenum Press Co. New York, USA. 151-188.
- Ristic, M., McIntyre, I. 1981. Diseases of cattle in the tropics. In: Martinus Vihhoff Pub. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science. The Hague. Netherlands. Vol 6p.662.
- Rivera, M. 1996. Hemoparasitosis bovinas. Arauco Ediciones, C.A., UCV. Caracas. 237p.
- Rogers, R.J.; Blight, G.W. and Knott, S.G. 1978. A study of the epidemiology of *Anaplasma marginale* infections of cattle in Southern Queensland: clinical disease and the prevalence of complement fixing antibodies. Aust. Vet. J. 54:115-120.
- Rogers, R. J. and Shiels, I.A. 1979. Epidemiology and control of anaplasmosis of Australia J. S. Afr. Vet. Med. Ass., 50:363-6.
- Ross, D.R. & Mahoney, D.F. 1974. Bovine babesiosis: Computer simulation of *Babesia argentina* parasite rates in *Bos taurus* cattle. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 68 (4): 385-392.
- Samish, M.; Krigel, Y.; Pipano, E.; Bin, C. and Hadani, A. 1986. The transmission of anaplasmosis to cattle by the ticks *Boophilus annulatus*. Isr. J. Vet. Med. 42:58-59.
- Sanborn, C.E.; Stiles, G.W. y Moe, L.H. 1932. Preliminary experiments in the transmission of anaplasmosis by horse flies. Bull. Oklahoma Agric. Exp. Stn (204) 15 pp.
- Schiffo, H. P. y Lombardero, O. J. 1964. Los derivados del cebú frente a la piroplasmosis y la babesiosis. Gaceta Veterinaria 26: 147-154.

- Seifert, H.S.H. (1998) Sanidad Animal en los trópicos. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- Sharma, S.P. and Bansal, G.C. 1986. Immune responses in cattle vaccinated with gamma-irradiated *Anaplasma marginale*. Indian J. Anim. Sci. 56:490-493.
- Signorini, A.; C. Mattos & E. Oria. 1987. Programa nacional de lucha contra la garrapata (*Boophilus microplus*) en la Argentina. IICA (Editor). Programa de control de garrapatas en los países del área sur. Serie publicaciones misceláneas. Montevideo. 163 pp.
- Smith, R.D. 1982. Guía para el diagnóstico y control de la anaplasmosis y la babesiosis en ganado bovino. Centro para la investigación de zoonosis. Universidad de Illinois. E.U.A.P.50.
- Späth, E. J.A. 1986. Un estudio epidemiológico de babesiosis y anaplasmosis en el Valle de Lerma, Pcia. De Salta. Rev. Med. Vet. 67:274-278.
- Späth, E. J.A. & Mangold, A. J. 1986. Algunas características de producción y sanidad de rodeos de ganado bovino de carne en el sudeste de Salta y norte de Tucumán. Rev. Med. Vet. 6: 101- 112.
- Späth, E.J.A.; Guglielmone, A.A. y Rios, L.G. de. 1987. Utilización de un modelo matemático simple para evaluar la situación epizootiológica de la babesiosis bovina. Rev. Med.Vet. 68:126-131.
- Späth, E. J.A.; Guglielmone, A. A.; Signorini, A. R. y Mangold, A. J. 1994. Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas en la Argentina. (1° parte). Therios 23 (116): 341-360.
- Späth, E. J.A.; Guglielmone, A. A.; Signorini, A. R. y Mangold, A. J. 1994. Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas en la Argentina. (2° parte). Therios 23 (117): 389-396.

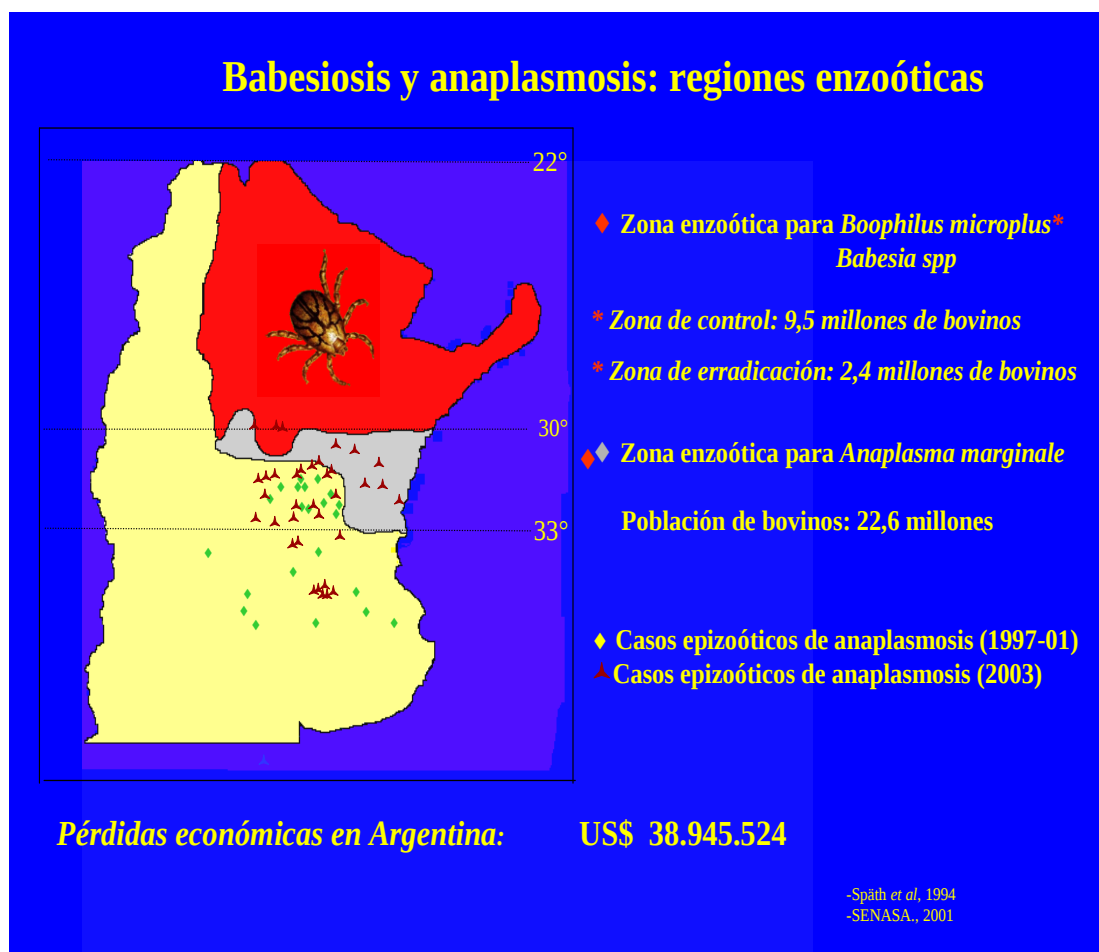
- Späth, E. J.A.; Guglielmone, A. A.; Signorini, A. R. y Mangold, A. J. 1994. Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas en la Argentina.(3° parte). *Therios* 23 (118): 454-468.
- Switf, B.L. and Paumer, R.J. 1976. Vertical transmission of *Anaplasma marginale* in cattle. *Theriogenology* 6:516-519.
- Switf, B.L. and Paumer, R.J. 1978. Bovine fetal anoxia observed in pregnant beef heifers experimentally inoculated with *Anaplasma marginale*. *Theriogenology* 10:395-403.
- Switf, B. L.; Reeves, J.D. and Thomas, G.M.1979. Testicular degeneration and libido loss in beef bulls experimentally inoculated with *Anaplasma marginale*. *Theriogenology* 11: 277-290.
- Switf, B. L.; Murdoch, W. J. and Dahigren, R.R. 1984. Anemia associated with anestrus in beef heifers inoculated with *Anaplasma mariginale*: endocrinology and ovarian changes. *Theriogenology* 22:643-649.
- Tebele, N. ; McGuire, T.C. and Palmer, G.H. 1991. Induction of protective immunity using *Anaplasma marginale* inicial body membranes. *Infect. Immun.* 59:3199-3204.
- Teclaw, R.F.; Romo, S. ; Garcia, Z. and Wagner, G.G. 1985. A serological survey for anaplasmosis in cattle in the Mexican States of Nuevo Leon, Tamaulipas and Coahuila using the card test. *Prev. Vet. Med.* 3:417-425.
- Theiler , A. 1910. *Anaplasma marginale*. The Marginal Points in the Blood of Cattle Suffering from Specific Disease. Govt. Vet. Bacteriol., Transvaal., South Africa. 6- 64.
- Thrusfield, M. 1995. *Veterinary Epidemiology*. Second edition. Blackwell Science, Oxford.
- Tizard, I. 1989. *Inmunología Veterinaria*. Tercera edición. Nueva Editorial Interamericana.
- Torioni de Echaide, S.; Knowles, D.P.; McGuire, M.C.; Palmer, G.H.; Suarez, C. and Ferry F. McElwain.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. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(3):777-782.

- Trueblood, M.S.; Swift, B.L. Bear P.D. 1971. Bovine fetal response to *Anaplasma marginale*. Am. J. Vet. Res. 32:1089-1090.
- Trueblood, E.S.; McGuire, T.C. y Palmer, H. 1991. Detection of *Anaplasma marginale* rickettsemia prior to onset of clinical signs by using an antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 29:1542-1544.
- Trueman, K. F. And Wilson, A.J. 1980. Observations on the pathology of *Anaplasma marginale* infections in cattle. Proc. Symp. Ticks and tick-borne diseases. 56th Annu. Conf. Aust. Vet. Assoc. Townsville. 22-26.
- Valdez, R.A., McGuire, T.C., Brown, W.C., Davis, W.C., Jordan, J.M. and Knowles, D.P. 2002. Selective in vitro depletion of CD4+ T lymphocytes with anti-CD4 monoclonal antibody during acute infection of calves with *Anaplasma marginale*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9 (2): 417-424.
- Vanzini, V.R.; Guglielmone, A.A.; Anziani, O.S.; Peralta, J.L.; Mangold, A.J.; Echaide S.T. de y Echaide I.E. 1993. Curso de diagnóstico de la babesiosis y la anaplasmosis bovina. Esperanza, Santa Fé.
- Vanzini, V.R. y Ramirez, L.M.; 1994. Control de anaplasmosis y babesiosis en áreas endémicas. Informe Actividad priorizada. INTA-Mercedes
- Vanzini, V.R. y Ramirez, L.M.; 1994. Babesiosis y anaplasmosis Bovina: Diagnóstico, epidemiología y control. INTA-Argentina RIA 25(3):137-190.
- Vanzini, V.R.; Mangold A.J. y Guglielmone A.A. 1999. Modelo técnico económico para la prevención de la babesiosis y la anaplasmosis de los bovinos en la ganadería de cría extensiva de la provincia de Corrientes. Therios 28 (147): 118-127.
- Viera, M.L.B.; Leite, R.C.; Martins, J.R.; Sacco, A.M.; Silva, J.G.C. 2002. Resposta Imune humoral contra *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) en bovinos submetidos a distintas estrategias de controle do garrapato vetor *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Revista Brasileira parasitologia Veterinaria 11, 2:71-76.
- Vigiani, R. A. 1990. Hacia el control integrado de plagas. Editorial Hemisferio Sur S.A.

- Viseshakul. N., Kamper, S., Bowie, M.V., and Barbet, A.F.2000. Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the richettsia *Anaplasma marginale* Gene 253 (1): 45- 53, 2000.
- Visser E.S.; McGuire T.C.; Palmer G.H. ; Davis, W.C.; Shkap, V.; Pipano, E. Y Knowles, D.P.JR. 1992. The *Anaplasma marginale* msp5 genes encoded 19kDa protein conserved in all recognizar *Anaplasma species*. Infect. Immun. 60:5139-5144.
- Vuotto, I.; D'Agostino, B.; Signorini A.; Mattos, C.; Oria E.; Vizcaíno, R. 1991. Evaluación de la flumetrina "pour on" al 1% en animales infestados con la garrapata común del bovino *Boophilus microplus* (Can.) Vet. Arg 8: 15-20.
- Wiesenhutter, E. 1975. Research into the relative importance of "*Tabanidae*"(Diptera) in mechanical disease transmission. III. The epidemiology of anaplasmosis in a Dar-es-Salaam dairy farm. Tro. Anim. Health Prod. 7:15-522.
- Wright, I. G. 1978. Biogenic amine levels in acute *Babesia bovis* infected cattle. Vet. Parasitol. 4:393-398.
- Zaugg, J.L.and K.L.Kuttler. 1984. Bovine anaplasmosis: In utero transmisión and the imunologic significance of ingested colostral antibodies. American Journal of Veterinary research, 45,(3):440-443.
- Zaugg, J.L.1985. Bovine anaplasmosis: Transplacental tranmisssion as it relates to stage of gestation. American Journal of Veterinary research, 46,(3):570-572.
- Zaugg,J.L.; Stiller, D.; Coan, M.E. y Lincoln, S.D. 1986. Transmisión of *Anaplasma margianle* (Theiler) by males of *Dermacentor andersoni* (Stiles) fed on an Idazo field infected with chronic carrier cow. Am. J. Vet. Res. 47:2269-2271.
- Zaugg, J.L.1990. Seasonally of natural transmission of bovine anaplasmosis under desert montain range conditions. Jauma. 196: 1106-1109.
- Zimmer, P. 2005. Enfermedades diagnosticadas en el Laboratorio de Sanidad Animal (2000-2004). N° 402. INTA, Mercedes.

APENDICE

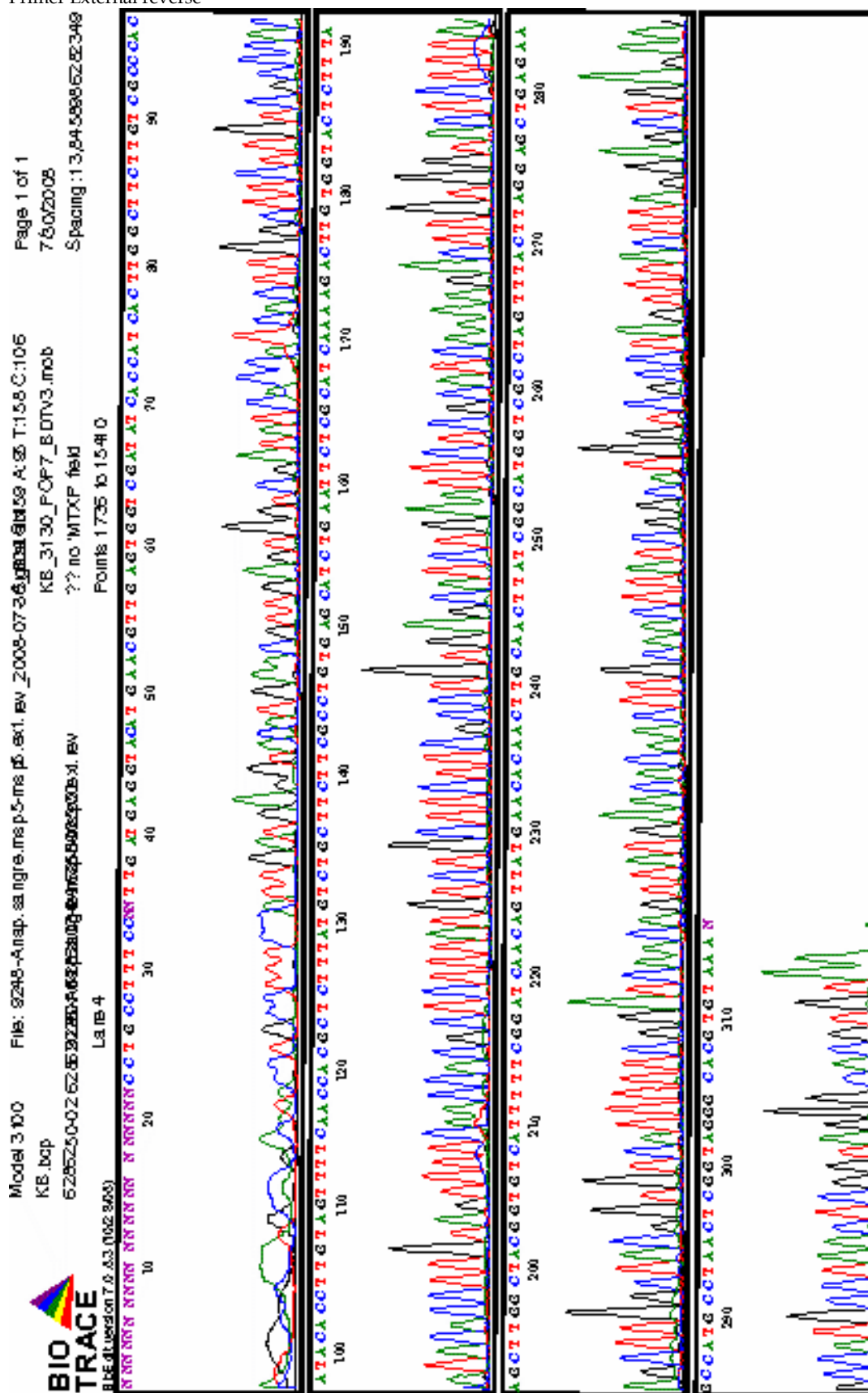
1. Mapa 1: Distribución de la babesiosis y anaplasmosis en Argentina. (Fuente Späth *et al.*, 1994; SENASA 2001)



2. Mapa 2: Departamentos en los cuales se realizó ambos estudios (longitudinal: Empedrado, transversal: Bella Vista) en la provincia de Corrientes, Argentina.

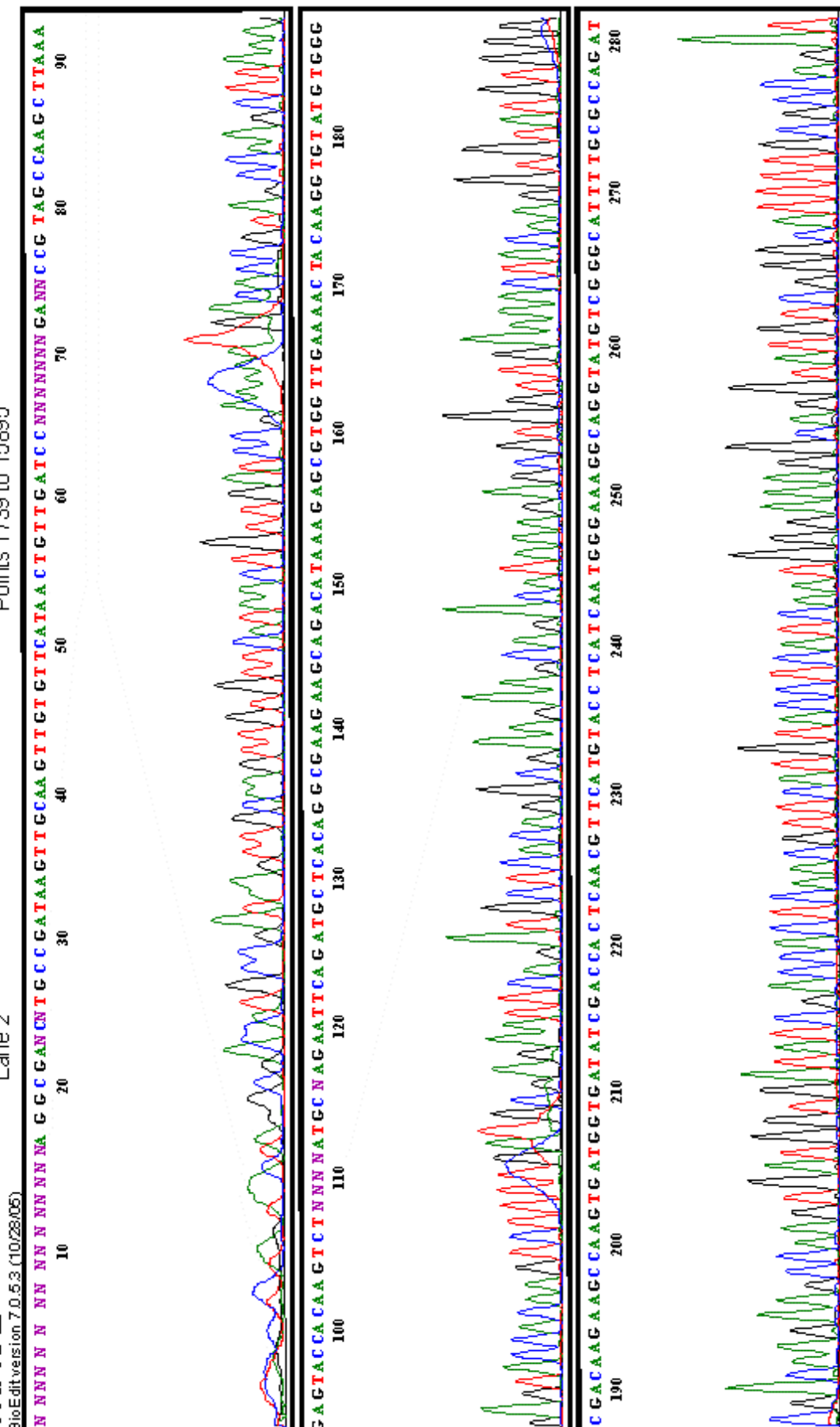


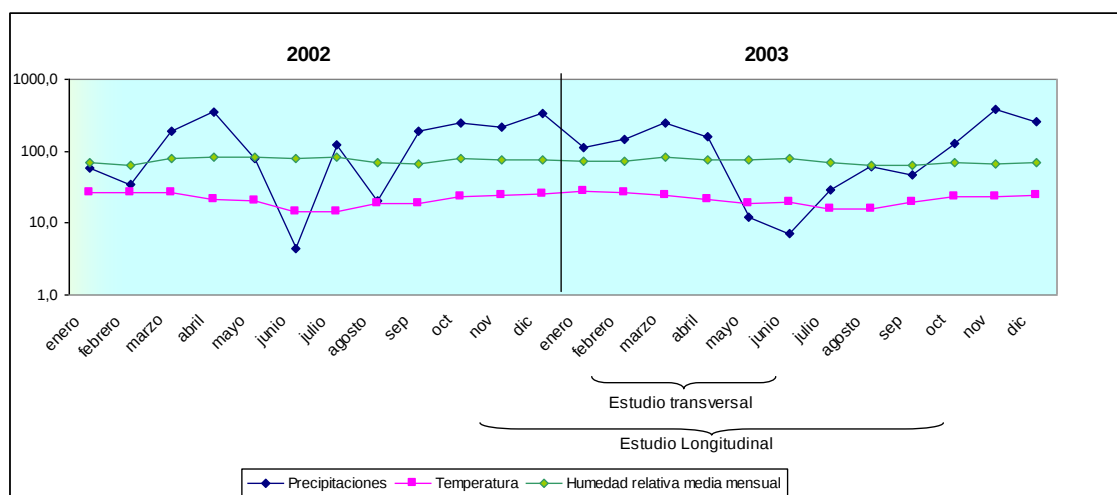
3. Cromatograma de la secuencia de 347 pb de *A. marginale* amplificado por PCR correspondiente al ternero N° 1. Primer External reverse



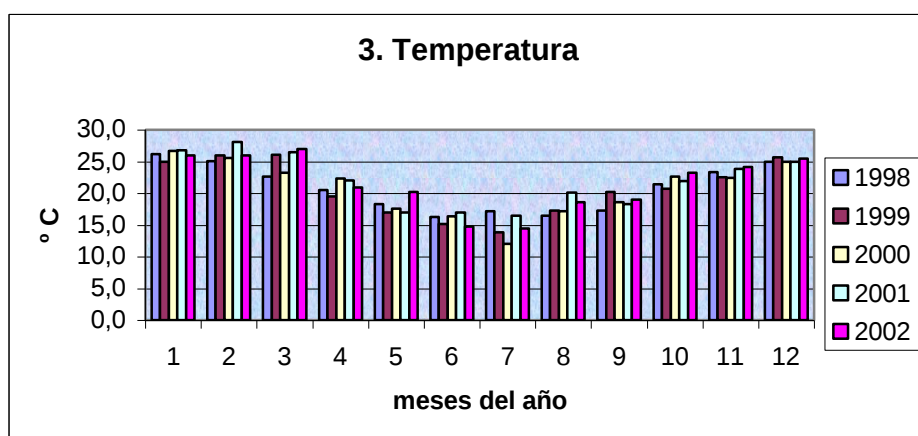
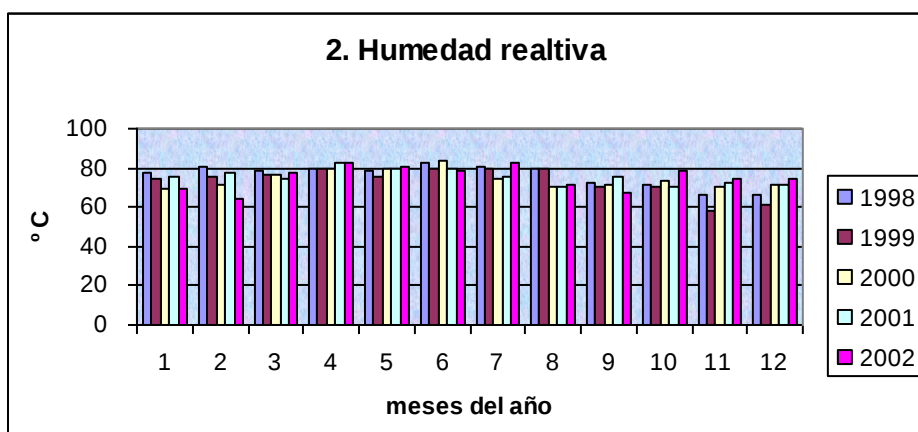
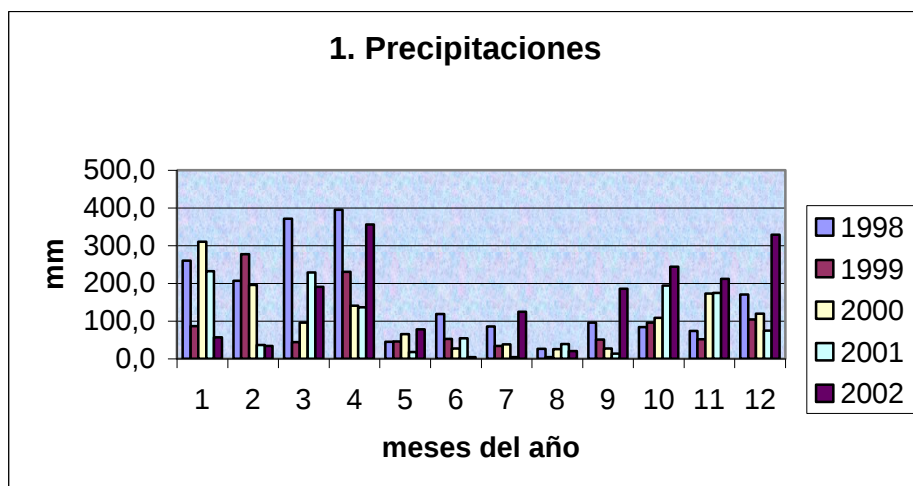
Primer internal forward

Model 3100	File: 9247.anapsangrem.sp5.msp5.int.for.ab1	Signal G:107 A:68 T:72 C:57	Page 1 of 2
KB.bcp	L#1	KB_3130_POP7_BDTv3.mob	7/30/2008
626286250-02 626286250-01	626286250-02 626286250-01	?? no 'MTXF' field	Spacing: 13,8184118270874
626286250-02 626286250-01	626286250-02 626286250-01	Points 1739 to 15895	
Lane 2			



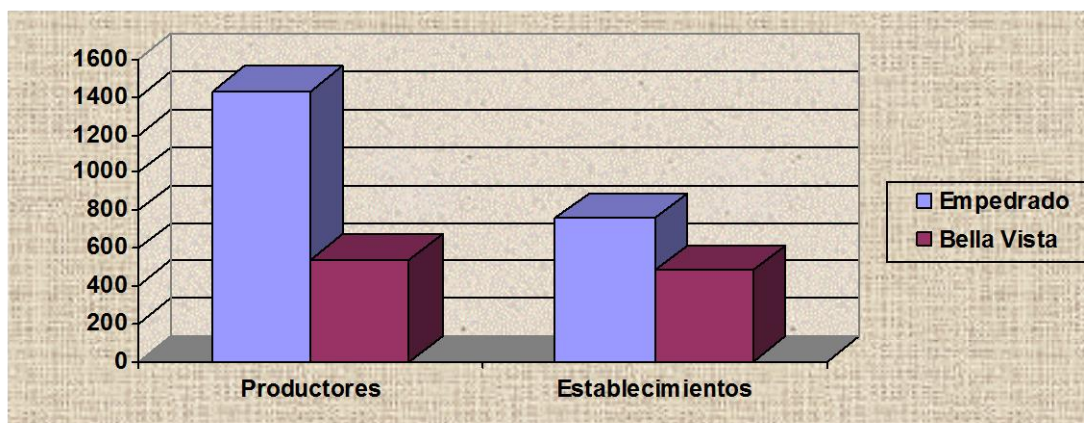


4. Grafico 9 Los registros climatológicos mensuales, a) precipitaciones, b) humedad relativa media mensual, c) Temperatura media mensual; relacionado con el periodo que se realizaron los trabajos, para los departamentos de Bella Vista y Empedrado.

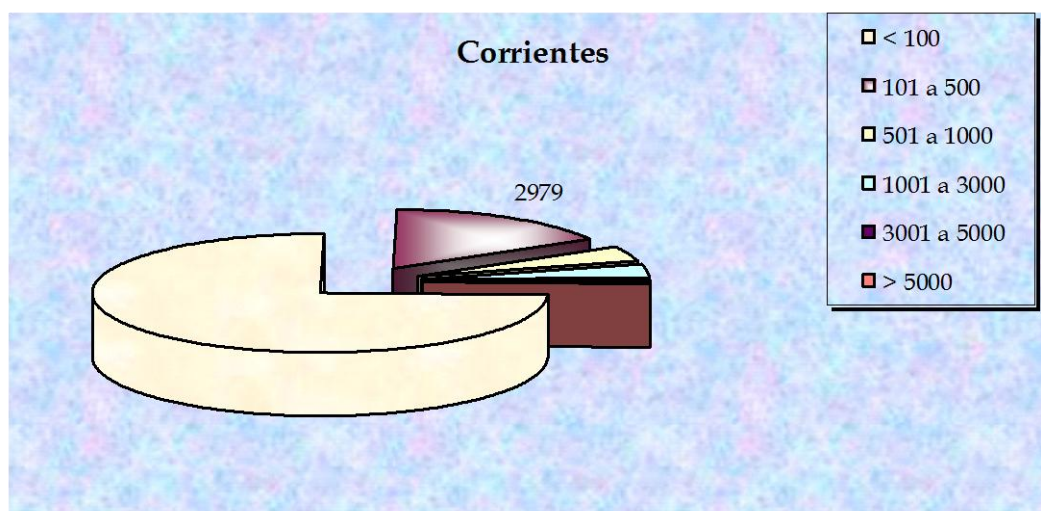


5. Grafico 10. Los registros mensuales climatológicos comparados con los años anteriores:

1) Precipitaciones, 2) Humedad relativa, 3) Temperatura.



6. Grafico 11: Distribución del número de productores y establecimientos ganaderos en los departamentos de Empedrado y Bella Vista de la provincia de Corrientes.



7. Grafico 12: Estratificación de los establecimientos ganaderos según el número de bovinos, en la provincia de Corrientes.

8. Tabla 1: Variables dependientes asociadas a la tasa de inoculación en los 20 establecimientos analizados en el departamento Bella Vista, Corrientes.

<i>Establecimiento Bella Vista</i>	<i>h</i>	<i>Edad(días)</i>	<i>E.V.</i>	<i>Proporción de Bos Indicus</i>	<i>Cantidad de baños (anuales)</i>	<i>Tipo de Producto</i>	<i>Ocurrencia de casos clínicos de Anap.</i>
18	0,0384	210	0,5	1/2	4	4 2	3
4	0,0307	300	0,5	1/2	3	4	1
15	0,0307	300	0,5	1/2	4	4	2
13	0,0307	300	0,4	1/2	3	4	0
20	0,0176	210	0,4	1/2	5	4 2	5
3	0,0123	300	0,4	1/2	8	4 2	0
17	0,0111	270	0,4	1/2	4	1	7
2	0,0100	300	0,75	1/2	8	4	0
14	0,0100	300	0,4	1/2	5	4 2	6
19	0,0099	210	0,5	3/8	7	4 2	6
16	0,0096	270	0,7	1/2	5	4	4
10	0,0096	270	0,4	1/2	4	4	7
8	0,0096	270	0,4	1/2	6	4 2	5
9	0,0085	270	0,4	3/8	6	4	8
11	0,0079	240	0,6	3/8	9	4 2	10
12	0,0077	300	0,5	1/2	6	4 2	0
5	0,0069	300	0,5	3/8	6	1 2	6
7	0,0058	180	0,5	3/8	9	1 2	5
1	0,0058	300	0,4	3/8	8	4 2	5
6	0,0054	180	0,4	3/8	9	4 2	10

Para el tipo de Productos, se utilizó código de acaricidas: 1. Piretroides, 2. Avermectinas, 3. Fosforados, 4. Formamidinas, 5. Piretroides + Fosforados.

ANEXO 1

9. TECNICAS DIAGNOSTICAS

9.1. ANAPLASMA SPP

1.1. Prueba de aglutinación en placa. Esta prueba detecta las inmunoglobulinas G y M contra *Anaplasma spp.* Se sigue la técnica de Amerault and Roby, 1998.

La prueba requiere de un factor sérico bovino (FSB) que aporta complemento y congulutina necesarios para que se produzca la reacción de aglutinación. El FSB se obtiene de un bovino normal mayor a 1 año de edad.

Bovino normal: es aquél que al examen clínico no presenta signos de enfermedad y en este caso además debe ser serológicamente negativo a *Anaplasma*.

1.1.1. Materiales y equipamiento:

- Micropipetas automáticas regulables de 5-50 µl
- Gradillas
- Placas de vidrio transparente de 3mm de espesor, de 13 x 7,5 cm, divididas en 10 cuadrados de 2 x 2 cm cada uno. Permite realizar 10 análisis.
- Caja de lectura de 45 x 35 x 15, fondo oscuro opaco, fuente de luz blanca recubierta parcialmente y tapada con una placa de vidrio transparente.
- Mezcladores plásticos.
- Heladera
- Freezer
- Centrífuga
- Reloj de laboratorio
- Agitador tipo vortex
- Agitador orbital
- Incubadora entre 24-28°C
- Microplacas para dilución de 200 µl

1.1.2. Reactivos:

- Antígeno de *Anaplasma marginale*
- Factor sérico bovino (FSB)
- Sueros problema
- Suero de referencia positivo
- Suero de referencia negativo

El antígeno: se elabora en la EEA Rafaela del INTA y se mantiene entre 4 °C y 8°C (Anexo 1)

El FSB: se obtiene y se titula en la EEA Rafaela del INTA y se mantiene a -70° o en nitrógeno líquido (Anexo 2)

Prueba de AP: La prueba se realiza en las placas de vidrio.

En cada placa se pueden procesar 8 sueros problema y los sueros de referencia positivo y negativo.

En cada recuadro se colocan por separado:

30 µl de suero

30 µl de FSB

15µl de antígeno.

Se mezcla con los mezcladores individuales formando un círculo de 1.8 cm de diámetro, y se coloca en un agitador orbital (90-110 rpm) en cámara húmeda entre 23°C y 28°C A los 4 minutos se realiza la lectura.

La presencia de grumos se considera positivo.

Para procesar los sueros hay que dejarlos sin congelar durante 48 hs para permitir que se destruya el propio complemento y evitar reacciones la autoaglutinación.

Fallas de la prueba: si la temperatura es mayor a 28°C se observarán falsas reacciones positivas. Si es menor a 23°C habrá falsas reacciones negativas. Es por lo tanto indispensable colocar en cada placa los controles positivo y negativo y trabajar entre 23 y 28°C. Se puede ajustar el tiempo 4 minutos $\pm$

1/2 minuto, en función de la temperatura. Por ejemplo, puede ser necesario que a 28°C se agite 3,5 minutos, mientras que a 23°C 4,5 minutos. Siempre controlándolo con los sueros de referencia.

Preparación de antígeno de *Anaplasma marginale* para la prueba de aglutinación en placa

Se realiza a partir de terneros esplenectomizados. Se inocula el primero y cuando tiene el pico de parasitemia se realiza un pasaje a otro esplenctomizado y así sucesivamente hasta lograr después de tres ó cuatro pasajes una parasitemia mayor al 70% antes de los 7 días de la inoculación.

STOCK

- 1) Sangrar el bovino aproximadamente 1 litro cada 100 kg., en erlenmeyers de 2 litros con perlas de vidrio para defibrinar y eliminar los glóbulos blancos. Agitar suavemente pero en forma continua con movimientos rotativos durante el sangrado y por lo menos 15 minutos después de tomar la muestra, para evitar que se coagule.
- 2) Centrifugar la muestra en frascos de un litro y eliminar el suero. Lavar con buffer PBS pH=7.2 a 1000 x g, 30 min y resuspender el pellet en un volumen igual de PBSS con 30% DMSO (dil final 15%).
- 3) Agitar con agitador magnético para homogeneizar bien la suspensión y congelar a -40°C en fracciones de 250-300 ml.

ANTIGENO

- 1) Descongelar aproximadamente 300 ml de la suspensión de GR.
- 2) Centrifugar la suspensión a 20,000 x g con PBS/antibióticos en frascos de 250 ml.
- 3) Eliminar el sobrenadante con hemoglobina.
- 4) Repetir los lavados hasta que el sobrenadante quede transparente. .
- 5) Resuspender el sedimento en pequeños volúmenes de Buffer Acetato pH: 5.

- 6) Sonicar en baño de hielo a 100 w durante 20 segundos, 3 series. NO PERMITIR QUE SE CALIENTE, hasta que la suspensión quede homogénea.
- 7) Colocar aproximadamente 10 ml de la suspensión homogeneizada en tubos de 30 ml y completar hasta 25 ml con buffer acetato.
- 8) Centrifugar a 20,000 x g 30 min. Eliminar el sobrenadante coloreado.
- 9) Repetir la operación de los puntos 2 y 3 pero con buffer acetato hasta que el sobrenadante esté transparente.
- 10) Recuperar el sedimento blanco en buffer acetato, sonicar y centrifugar a 1,000 x g, durante 20 min, en tubos de 15 ml graduados (0.1 ml)
- 11) Llevar el sedimento al 4% en buffer acetato.
- 12) Teñir con 1 ml de fast green al 1% por cada 25 ml de la suspensión al 4%, en agitación durante 1 h.
- 13) Lavar la suspensión teñida, tres veces con buffer acetato y llevar a una concentración final del 1.8% a 1,000 x g durante 20 min. Según las condiciones del laboratorio la concentración del antígeno se puede ajustar entre el 1.8% hasta el 2.5%.
- 14) Mantener en alícuotas de 3 ó 4 ml, refrigerado. NO CONGELAR.

BUFFERS:

1) PBSS x5.

Na ₂ HPO ₄	91.97g
KH ₂ PO ₄	14.30g
NaCl	42.90g
Csp	2.000 ml

Antibióticos:

Penicilina G Na: 200.000 UI (120 mg/l)

Estreptomicina: 200 mg/l

2) Buffer Acetato 0.2M pH 5 (William & Chase p 386)

Solución A: ácido acético glacial 0.2M., 0,58 ml para 50 ml de agua destilada.

Solución B: Acetato de sodio con una molécula de H₂O 0,2M, 5,44g para 200 ml de agua destilada.

Solución de trabajo buffer acetato 0.1M para 100 ml

Sol. A	14,8 ml
Sol. B.	35,2ml
NaCl al 0,85%	0,425g
p- hidroxibenzoato	0,05 g.
H ₂ O ₂ destilada. c.s.p.	100 ml

3) Colorante

Fast green	1g
ClNa	0,5g
Methyl para hidroxibenzoato	0,1g
H ₂ O ₂ destilada c.s.p.	100 ml

Método rápido para seleccionar el FSB: seleccionar tres bovinos adultos, normales y negativos a la prueba. Obtener una alícuota de suero de cada animal rápidamente, dentro de las 4 horas debe estar a -70 °C o en nitrógeno líquido. Probar los sueros candidatos para FSB con el suero positivo y el negativo: 30 µl del suero positivo, 30 µl del candidato a FSB y 15 µl de antígeno. Realizar lo mismo con el suero de referencia negativo. Agitar y leer a los 4 minutos. Seleccionar el que mejor discrimine positivo y negativo a los 4 minutos entre los 24-27°C. Volver a sangrar el bovino seleccionado como dador de FSB y guardarlo en alícuotas de 1 o 2 ml, de manera que una vez descongelado se elimine. NO VOLVER A CONGELAR.

Cuando el FSB se mantiene entre -20 y -60°C, el reactivo no es estable, el título del complemento y conglutinina disminuye y afecta la reacción.

ANEXO 2

9.2.1. ELISA

ELISA de competición (c- ELISA) para el diagnóstico de *Anaplasma spp* basado en la proteína de superficie MSP5:

- Adsorción de Antígeno: los antígenos se adsorben al plástico favorecido por el buffer fijador.
- Lavados
- Unión de Anticuerpos específicos (sueros) a los epitopes: si los sueros a evaluar incluyen anticuerpos específicos de distintos isotipos se unirán a los antígenos adsorbidos.
- Lavados
- Conjugado Ana/6L1-HRPO: el conjugado es un anticuerpo monoclonal (mAb) contra un epítopo del antígeno. La unión de los anticuerpos específicos impide la unión del mAb-conjugado. Los mAb sólo se unen a éstos cuando no hay anticuerpos específicos.
- Lavados
- Detección de la enzima: la enzima presente en los negativos hidroliza el sustrato cromógeno generando color. La intensidad se evalúa con un fotómetro.

Reactivos:

1.1. Químicos:

1.1.1 Carbonato de sodio (CO ₃ Na)	pm 105.99
1.1.2. Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	pm 84.01
1.1.3. Cloruro de sodio (NaCl)	pm 58.44
1.1.4. Fosfato de potasio monobásico(PO ₄ H ₂ K)	pm136.10
1.1.5. Fosfato de potasio dibásico (PO ₄ HK ₂)	PM 174.18
1.1.6. Polioxietilensorbitano momolaurato (Tween 20)	
1.1.7.Glicina	PM 75.07
1.1.8. Sucrosa	PM 342.31

- 1.1.9. Albúmina bovina (BSA) fracción V.
- 1.1.10. Citrato trisódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) PM 294.10
- 1.1.11. Ácido cítrico ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) PM 210.15
- 1.1.12. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- 1.1.13. ABTS 0.04M (2,2-Azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
PM 548.7
- 1.1.14. Lauryl sulfato de sodio (SDS) PM 288.38

1.2. Biológicos:

- 1.2.1. Antígeno recombinante, de la proteína de superficie de *A. marginale* (MSP-5) con un peso molecular de 19KD.
- 1.2.1.1. Antígeno 1: El gen *msp5* fue clonado en p-Mal y expresado en *E. coli*, como una proteína de fusión MSP-5-*maltosa binding protein* (MBP), y purificada por cromatografía. Debido a que los sueros pueden tener anticuerpos contra MBP producido por *E. Coli* ambiental, éstos se deben adsorber con MBP para evitar las reacciones cruzadas, eliminar el background y obtener una especificidad aceptable.
- 1.2.3. Conjugado: se utiliza un anticuerpo monoclonal (mAb) Ana F16 C1 anti-MSP-5, conjugado a la enzima peroxidasa. Obtenido comercialmente (VMRD, USA).
- 1.2.4. Suero control positivo fuerte (C++) anti-*A. marginale*. Suero de referencia internacional de Red de Hemoparásitos Latinoamericana de FAO (RLH-FAO)
- 1.2.5. Suero control positivo débil (C+) anti- *A. centrale*. Suero obtenido 4 años después de una única inoculación.
- 1.2.6. Suero negativo. Suero de referencia internacional de la Red de Hemoparásitos Latinoamericana (FAO).

EQUIPAMIENTO E INSTRUMENTAL

- 1.3. Placas: se utilizan placas Nunc 2-69620.
- 1.4. Micropipetas monoclonales automáticas regulables de 0,5-10ul, 10-40ul, 0-100ul, 100-1000ul.

- 1.5. Micropipetas multicanales automáticas regulables: 5-50ul, 50-300ul.
- 1.6. Agitador orbital, con ajuste de velocidad.
- 1.7. Lavador de placas automático o semiautomático.
- 1.8. Espectrofotómetro para placas de 96 pocillos. Multiskan de Labsystem con filtros de 405, 450, 492 y 620 nm.
- 1.9. Refrigerador (4-8°C)
- 1.10. Congeladora (-20; -40°C)
- 1.11. Medidor de pH
- 1.12. Balanzas de precisión
- 1.13. Incubadora
- 1.14. Material de vidrio para laboratorio
- 1.15. Criotubos
- 1.16. Destilador de agua
- 1.17. Computadora
- 1.18. Programas para ELISA: c-EIA (IAEA), SEPIA (ADRI)

2. SOLUCIONES:

- 2.1. Solución para adsorción de antígeno:

Buffer carbonato/bicarbonato 0,06M pH 9.6

Bicarbonato de sodio (CO_3HNa)	3,80g
Carbonato de sodio (CO_3Na)	1,93g
H ₂ O destilada csp	1000ml

- 2.2. Solución Salina fosfatos (PBS) 0.01M pH 7.2

Cloruro de sodio (Na Cl)	42.50g
Fosfato de potasio monobásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$)	1.95g
Fosfato de sodio dibásico (PO_4HK_2)	6.25g
H ₂ O destilada csp	5000ml

- 2.3. Solución diluyente para sueros:

PBS-T EDTA/EGTA 0.0075M, pH 6,3

EDTA	0,5585g
EGTA	0,5705g
PBS-T csp	100 ml
Leche descremada	4%

3.4.1. *Buffer* substrato

Citrato de sodio/ácido cítrico 0.05M, pH 4,5

Citrato trisódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	3,82 g
Acido cítrico ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	2,30 g
H ₂ O destilada csp	500ml

3.4.2. Substrato para la peroxidasa

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3%

Mantener en un frasco oscuro a 4 °C

2.4. Cromógeno (donante de hidrógeno)

ABTS 0.04M (2,2- Azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)

ABTS anhidro	0,2195 g
H ₂ O destilada csp	10 ml

El ABTS es fotosensible, mantenerlo al abrigo de la luz a 4°C

3. EJECUCIÓN DE LA PRUEBA

- 3.1. Adsorción del antígeno: a partir del antígeno concentrado de *A. marginale*, se prepara una dilución de trabajo en buffer carbonato/bicarbonato 0.06M pH 9.6, según se especifica para cada lote.

Con una pipeta multicanal distribuir 100 μl de la dilución de trabajo de antígeno en cada pocillo de las microplacas. Sellar las placas con papel de acetato y mantenerlas en reposo durante 18 hs a temperatura ambiente, o a 4°C. Después de la adsorción del antígeno, las placas deben mantenerse a -20°C hasta su uso. Si las placas se van a usar

inmediatamente después de la adsorción no hace falta congelarlas. La prueba debe realizarse a una temperatura ambiente entre 25 y 28°C.

Importante: antes de comenzar la prueba a) permitir que todos los reactivos se estabilicen entre 25 y 28°C; b) colocar las placas en la estufa durante 45 minutos. Bloquear la placa durante 30 minutos con el buffer de bloqueo, en reposo.

- 3.2. Lavado: una vez finalizado el bloqueo, lavar la placa de *ELISA* tres veces con 200 ul de buffer lavado PBS-T. Agregar 50ul de buffer PBS.
- 3.3. Incubación de los sueros con el antígeno: con una pipeta multicanal traspasar 50ul suero problema e incubar 30 minutos con agitación continua. Mientras se incuban los sueros, encender la computadora y el lector de *ELISA*. Seleccionar el filtro apropiado del lector (en este caso 405 nm). Seleccionar el programa adecuado y cargar los datos según las indicaciones del mismo.
- 3.4. Conjugado: agregar 100 ul del conjugado (mAb AnaF16C1-peroxidasa) a una dilución previamente establecida por titulación. Incubar a temperatura ambiente 30 minutos con agitación continua. Por ejemplo para una dilución 1:2000, colocar para cada placa 12 ml de PBS 6 ul del conjugado.
- 3.5. Inmediatamente antes de finalizar la incubación del conjugado, preparar el sustrato. Se prepara 12 ml por placa: 12 ml de buffer sustrato (citrato de sodio/ácido cítrico, 0.05M, pH 4.5).

300 ul de cromógeno ABTS

60ul de H₂O₂ al 3%.

Finalizada la incubación del conjugado lavar la placa 3 veces como se indica en 4.2. Agregar 100 ul del sustrato, en la placa de prueba y también en la primera columna de una placa limpia que se utilizará como blanco. Incubar con agitación continua durante 10 minutos hasta cortar la reacción con 50 ul de SDS 8 %. La lectura puede hacerse en forma dinámica. En este caso se debe leer la placa a los 4 minutos de iniciada la incubación con el sustrato, con agitación continua hasta que el momento indique el tiempo de lectura óptimo para esa placa, momento en que se realizará la lectura final, sin necesidad de frenar la reacción.

4. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición (%I). El CC, no incluye suero pero si incluye el mAb anti-MSP5 conjugado y representa el 100% de color, o sea 0%I.

Tomando como referencia este valor se obtienen los % I para los restantes sueros.

La fórmula es:

$$100 - \frac{\text{media de la DO del suero problema} \times 100}{\text{media de la DO del CC}}$$

5. CONTROLES DE CALIDAD

Los valores de % I de los controles deben estar incluidos dentro de determinados rangos, establecidos en el propio laboratorio. Para ello se obtiene el % I promedio de 100 placas y la DS obtenidos para cada control como el % I promedio $\pm$ 3DS. De esa manera nuestros controles deben resultar:

C++ 87 -106 % I

C+ 35 - 70 % I

C- 12 - 20 % I

CC- 12 - 9 % I

La DO del CC, referente para toda la placa, debe resultar entre 0.700 y 1.600 en un período de 8 a 20 minutos

ANEXO 3

9.3. PCR

9.3.1. EXTRACCION DEL DNA A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE

Muestras con citrato congeladas son preferibles.

1. Descongelar las muestras de sangre. Se aconseja trabajar con tubos Eppendorf de 2 ml.
2. Tomar 500 a 1000 ul de cada muestra y colocarlas en tubos Eppendorf.
3. Agregar 800 a 1000 ul de BUFFER LISIS DE GLÓBULOS ROJOS. Mezclar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos.
4. Remover parte del sobrenadante cuidadosamente con una pipeta dejando el sedimento y algo del líquido que lo cubre.
5. Agregar 1000 -12000 ul de agua destilada, mezclar bien para lavar el sedimento y volver a centrifugar igual que en el paso anterior. Sacar el sobrenadante y repetir el lavado resuspendiendo el sedimento. Centrifugar hasta obtener el sobrenadante claro-transparente.
6. Agregar 500 ul de BUFFER LISIS CELULAR y 8 ul de PROTEINASA K (20 mg/ml). Mezclar muy bien despegando el sedimento con el tip e incubar 1 hora como mínimo a 56 - 62°C. En este paso puede quedar a temperatura ambiente mucho tiempo (meses).
7. Refrigerar las muestras 5 - 10 minutos y agregar 100 ul de CLNa 5M, y 1 volumen de fenol cloroformo (500 ul). Agitar muy bien en vortex y centrifugar 10 - 15 minutos a 14.000 rpm.
8. Se colocan en otros tubos bien identificados 500 ul de ISOPROPANOL y el sobrenadante de los tubos del paso anterior, con tips con barrera. Se cierran bien y se agitan 50 veces para que se formen los ovillitos de DNA. Se centrifugan 2 - 3 minutos a 14.000 rpm, se vuelca el sobrenadante y se dejan boca abajo para que se sequen.
9. Se agregan 500 ul de ETANOL 75% se enjuaga el ADN y se centrifuga a 14.000 rpm por 2 - 3 min. Se dejan secar boca abajo.
10. El ADN se resuspende en agua destilada pura o bidestilada (100 ul).

9.3.2. BUFFERS Y SOLUCIONES:**1.1 LISIS PARA GLÓBULOS ROJOS**

0.14 M	NH ₄ CL (PM=53.50)	1.87 g
0.017 M	Tris-CLH	0.52 g
H ₂ O bidestilada c.s.p.		250 ml

1.2 LISIS CELULAR

0.05M TRIS-CLH (Stock = 1M) pH 8	1,52g
0.1M EDTA (Stock = 0.5M)	9,30g
0,1M NaCl	1,46g
2% SDS (Stock = 20%)	25 ml
H ₂ O bidestilada c.s.p.	250 ml

1.3 PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

5M CLNA

1.4 PRECIPITACIÓN DEL ADN

PHENOL: CLOROFORMO: ALCOHOL ISOAMÍLICO (25:24:1) (Invitrogen).

1.5 DILUCIÓN DE ADN AMPLIFICADO

0.25% AZUL DE BROMOPHENOL

0.25% XYLENE CYANOL

30% GLICEROL EN H₂O DESTILADA

1.6 ELECTROFORESIS

MOPS { 3-[N-MORPHOLINO] (PROPANOL-SULFONIC ACID) }

0,4M MOPS pH 7 (HONa)	83,72 g
0,1M Acetato de Sodio	8,20 g
10 mM EDTA	3,72 g
c.s.p.	1000 ml

1.7 VISUALIZACIÓN DE BANDAS EN GELES SUJETOS A ELECTROFORESIS

BROMURO DE ETIDIO: 10mg/ml en buffer MOPS

9.3.2. PCR

2.1 OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES (primers)

msp5 Int For 5' TTCC TCG CCT TGG CCC TCA GA 3'

msp5 Ext Rev 5' TCC TCG CCT TGG CCC TCA GA 3'

Tamaño esperado 345 pb

2.2. MEZCLA DE REACTIVOS (para un volumen final de 50 ul por reacción).

Reactivos	Concentración	Volumen
Buffer TRIS-ClH	10 mM (10X)	5,0 ul
Cl ₂ Mg	1,5 mM	3,0 ul
DNTP's	0,2 uM	1,5 ul
<i>msp5</i> Int For	0,8 uM	1,5 ul
<i>msp5</i> Ext Rev	0,8 uM	1,5 ul
Taq Polimerasa	1 UI	0,3 ul
H ₂ O		34,2 ul
ADN		3 ul

2.3. AMPLIFICACIÓN DEL ADN

CICLOS		
Desnaturalización inicial	95° C	5 min
40 ciclos		
Desnaturalización	95°C	30 seg
Hibridación	60°C	30 seg
Extensión	72°C	30 seg
Extensión final	72°C	5 min
Mantenimiento	4°C	

2.4. ELECTROFORESIS

Se realizó en geles de agarosa al 1,5% en 40 ml con 5 ul de bromuro de etidio (10mg/ml). Las muestras se diluyeron 1/6 en *buffer* de corrida y se cargaron 10ul por calle. Se colocó un marcador molecular de 100 bp (INVITROGEN) un control positivo, un control negativo y un control de reactivos. Se realizó la corrida electroforética durante 45 min a 60 V, en 0,4M de buffer MOPS.

2.5. VISUALIZACIÓN DEL GEL

Se visualizaron las bandas en el gel separadas por electroforesis, con una fuente de luz ultravioleta protegida.

Encuesta: ENCUESTA PARA GANADEROS

DATOS DEL ESTABLECIMIENTO

A. CARACTERÍSTICAS GENERALES

A1.Nombre del propietario:	
A2. Dirección del propietario:	
A3. Dirección del establecimiento:	
A4. Nombre del veterinario:	
A5. Nombre del encargado:	

1. Fecha de la encuesta:	2. Código del establecimiento:

3. Tipo de explotación: (1:Excl.ganadera; 2:Ganadera-agrícola)	
4. Explotación ganadera: (1:Bov.para carne; 2:Bov.para leche; 3:Doble propósito)	
5. Cria otro ganado: (1: Si; 2: No)	
6. Que ganado: (1: ovino; 2: caprino; 3:equino; 4:otro)	
7. Numero:	

ESTRUCTURA DEL RODEO:

Proporcion de *Bos indicus*:

8. N° de toros:	16.
9. N° de vacas:	17.
10. N° de vacas 1° paric.	18.
11. N° de vaquillonas	19.
12. N° de novillitos 1-2 años	20.
13. N° de novillitos >2 años	21.
14. N° animales < 1 años	22.
15. Otros bovinos:	23.

24. Superficie destinada a ganaderia (ha):

25. Carga animal (ha/EV):

B. MANEJO NUTRICIONAL DE LAS VACAS MADRES

Indique los meses en que se utiliza cada tipo de recurso forrajero utilizando los códigos (1, 2 o 3).

E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37

1. Pastura permanente
2. Pastura estacional
3. Otro.....

Índice del sistema de alimentación:

39	
----	--

En caso de permanecer la pastura permanente sin animales (Descanso) Indique entre que meses.

De..... 40. A.....41

C. CONTROL DE LAS GARRAPATAS

Usan Acaricidas?

42	
----	--

Indique forma de aplicación

43	
----	--

(1: inmersión; 2: aspersión fija; 3: aspersión manual; 4: derrame; 5: inyectable; 6: otros.....)

Indique meses de aplicación utilizando los códigos de los acaricidas:

MESES

E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55

CODIGO ACARICDAS

Acción prolongada: 1. Piretroides, 2. Avermectinas

Acción corta: 3. Fosforados, 4. Formamidinas

Mixtos: 5.Piretroides + Fosforados 6. Otro.....

Indice de relación Acaricida-Aplicación

56	
----	--

D. OCURRENCIA DE BABESIOSIS Y/O ANAPLASMOSIS DURANTE EL ULTIMO AÑO

CALENDARIO

Indique el número de casos en cada mes

Diagnóstico Veterinario?

Anaplasmosis

	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Enfermos	Muertos.	<1a	1-2a	>2a
57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74

Babesiosis

	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Enfermos	Muertos.	<1a	1-2a	>2a
75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92

Indeterminado

	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Enfermos	Muertos	<1 ^a	1-2a	>2a
93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110

Observaciones (Indique si los casos eran animales nacidos en el establecimiento)

.....

111	
-----	--

E. COMENTARIOS

.....

.....

112	
-----	--