

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para obtener el título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

TÍTULO DEL TRABAJO: Epidemiología de la babesiosis de los bovinos causada por *Babesia bigemina* (Smith y Kilborne, 1893) en el sudoeste de la provincia del Chaco.

AUTOR: Mastropaolo, Mariano

DIRECTOR: Mangold, Atilio José

CODIRECTOR: Mórtola, Eduardo

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Inmunología y Parasitología. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

MIEMBROS DEL JURADO: Romero, Jorge

Späth, Ernesto Juan

Vignau, Maria Laura

“A lo largo de la lista completa de enfermedades que afectan a los animales domésticos no hay ninguna con características tan peculiares o que desarrolle fenómenos tan misteriosos como ocurría con ésta, con anterioridad a las presentes investigaciones. La diseminación del contagio letal por parte de ganado aparentemente sano, y lo inofensivos que resultaban los animales evidentemente enfermos eran inexplicables bajo la luz de cualquier conocimiento previo derivado del estudio de otras enfermedades. Los veterinarios que no habían tenido la oportunidad de presenciar la enfermedad se mostraban escépticos con relación a la veracidad de estas observaciones y algunos la llamaban “la novela de la Patología”. Estas observaciones no solo fueron confirmadas, sino que el fenómeno ha sido explicado y nuestro conocimiento se ha consolidado sobre una base científica”

(D. E. Salmon. Letter of transmittal. En: Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or Southern Cattle Fever. By T. Smith and F. L. Kilborne. 1893.)

Dedicado a los integrantes de la URISA NOA, EEA INTA Salta desde el año 1976 quienes sentaron las bases para el estudio de las garrapatas y las enfermedades que transmiten en la Argentina.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Atilio J. Mangold mi director de tesis doctoral y de beca de postgrado, por ofrecerme la posibilidad de llevar adelante este trabajo y por compartir su experiencia en el estudio de las garrapatas de la Argentina y las enfermedades que transmiten.

Mi profundo agradecimiento es también para Susana Torioni de Echaide, por la instrucción en las técnicas serológicas y moleculares aplicadas durante el desarrollo del trabajo experimental y por la disposición para resolver las dificultades propias de dichas técnicas. Alberto Guglielmone puso a disposición su extensa colección bibliográfica y enriqueció este trabajo y mi formación profesional con sus ideas y oportunos comentarios.

Walter Basso asumió la codirección al comienzo de la carrera de doctorado y Eduardo Mórtola lo hizo al final de la misma. A ambos les agradezco la confianza depositada y el tiempo que les demandó esta actividad.

La participación de Fernando Seguro en las tareas de campo y de Paola Amherdt en el laboratorio fue decisiva para el desarrollo de esta tesis y a los dos quiero expresarles mi reconocimiento mas sincero. Agradezco también la colaboración de los integrantes del grupo de Parasitología e Inmunología del INTA EEA Rafaela, Ignacio Echaide, Víctor Vanzini, Mirta Castelli, Beatriz Valentín, Nerina Aguirre, Santiago Nava, Paula Ramírez, Estefanía Ugarte, Carolina Thompson, Eugenia Baravalle, Pablo Salusso, Ramón Mansilla, Liliana Aguirre y Mariano Ferreira.

Roberto Ecker y Nérida Radoceovich abrieron las tranqueras de sus establecimientos y me permitieron llevar a término los dos años de estudios mensuales que requería el estudio longitudinal. Estas actividades fueron posibles gracias a la gestión y orientación de Alberto R. Jacquet, del INTA - EEA Las Breñas. No puedo dejar de destacar la colaboración prestada por Martín Díaz y familia, Esteban y Migno, que a la madrugada o a la siesta, de a caballo o al pie del cepo, fueron una ayuda invaluable en el trabajo de campo.

Quiero agradecer a Carlos Luciani, Vanina Margonari, Arnaldo Fumagalli, Edgardo Leonhardt, Severo Sánchez y Omar Tariff, así como a los propietarios, administradores y empleados de los establecimientos por su colaboración para el desarrollo del estudio transversal.

La colaboración de Marcelo Signorini fue decisiva en la finalización de esta tesis, por lo que estoy profundamente agradecido. Pablo M. Beldoménico y Alejandra Cuatrín colaboraron en la aplicación de los modelos matemáticos y estadísticos.

Le agradezco a Fred T. Potgieter del Onderstepoort Veterinary Institute, Republica de Sudáfrica, por acceder a examinar muestras de glándulas salivales y por sus invaluables comentarios acerca de la biología de las babesias. De la misma manera, las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido debo agradecerlas a la capacidad técnica y la predisposición de Patricia Sarmiento.

Es justo agradecer también al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme las Becas Tipo I y Tipo II y a las autoridades de la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA EEA Rafaela) por permitirme realizar las actividades relativas a este trabajo en dicha institución. El trabajo de campo y de laboratorio se financió con fondos del proyecto específico AESA 3596 del INTA y con el apoyo financiero de la Asociación Cooperadora de la EEA Rafaela.

A mi familia le debo el impulso para empezar y la insistencia para terminar. El tiempo necesario para concluir la última etapa me lo cedieron Wolfgang, Brigitte, Nicola y Peter. A todos ellos tengo que expresarles también mi profundo agradecimiento.

Finalmente quiero agradecerle a Nina por su compañía, cariño, apoyo, estímulo y confianza desde el principio y hasta el final de este trabajo.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES PARCIALES DEL
TRABAJO DE TESIS

Epidemiología y control de hemoparásitos (Babesia y Anaplasma) en Argentina.

Mangold A. J. y M. Mastropaolo.

En: A. Nari, C. Fiel (eds.), Enfermedades parasitarias con importancia clínica y productiva en rumiantes: fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control. Pp. 639-655. 2013. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires. 752 pp. ISBN: 978-9974-674-35-6

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
<u>PARTE I</u>	
Descripción del área de estudio	17
Capítulo 1: Prevalencia, factores de riesgo y distribución espacial de <i>Babesia bigemina</i> en establecimientos ganaderos del sudoeste del Chaco.	
Introducción	22
Materiales y Métodos	24
Resultados	30
Discusión	37
<u>PARTE II</u>	
Descripción de los establecimientos	46
Capítulo 2: Detección por PCR de <i>Babesia bigemina</i> en glándulas salivales de hembras de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> y cuantificación de la proporción de garrapatas infectadas en condiciones de campo.	
Introducción	47
Materiales y Métodos	50
Resultados	54
Discusión	60
Capítulo 3: Incidencia de infección y análisis de los factores relacionados con la transmisión de <i>Babesia bigemina</i> en dos rodeos de cría del sudoeste del Chaco.	
Introducción	64
Materiales y Métodos	67
Resultados	71
Discusión	90
DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	100
BIBLIOGRAFÍA	106

APÉNDICE I: Composición de soluciones utilizadas	135
APÉNDICE II: Script de R para el cálculo de la prevalencia real	136
APÉNDICE II: Formato de encuestas	137

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Áreas de aptitud ecológica de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> en Argentina	13
Figura 2. Zonificación del país con relación al plan de lucha contra la garrapata común del bovino <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .	14
Figura 3. Oblea utilizada en los remates de ganado para identificar lotes procedentes de la zona de control de <i>R. (B.) microplus</i> .	15
Figura 4. División política del área analizada en los capítulos 1 y 2.	20
Figura 5. Eco-regiones del área de estudio.	21
Figura 1.1. Grupos químicos de acaricidas utilizados y cantidad de establecimientos que utiliza cada uno.	35
Figura 1.2. Proporción de establecimientos que realizan tratamientos acaricidas en cada mes del año.	35
Figura 1.3. Distribución y estatus epidemiológico de los establecimientos analizados en relación con las áreas de aptitud ecológica para <i>R. (B.) microplus</i> .	36
Figura 2.1. Disección de glándulas salivales de <i>Rhipicephalus (B.) microplus</i> .	55
Figura 2.2. Avia Terai. Proporción de garrapatas infectadas con <i>B. bigemina</i> con relación a las fechas de colecta.	58
Figura 2.3. Villa Ángela. Proporción de garrapatas infectadas con <i>B. bigemina</i> con relación a las fechas de colecta	59
Figura 3.1. A) Temperatura media mensual (°C) y B) Humedad relativa ambiente (%) registradas en Avia Terai, Villa Ángela y EEA INTA Sáenz Peña. C) Precipitaciones mensuales (mm) registradas en la estación meteorológica de EEA INTA Sáenz Peña.	77
Figura 3.2. Avia Terai. Prevalencia de parasitación por A) larvas, B) ninfas y C) hembras de <i>R. (B.) microplus</i> en dos cohortes consecutivas de terneros. Para la primer cohorte no se obtuvo información relativa a las larvas. En junio de 2008 no se obtuvieron muestras.	80
Figura 3.3. Villa Ángela. Prevalencia de parasitación por A) larvas, B) ninfas y C) hembras de <i>R. (B.) microplus</i> en dos cohortes consecutivas de terneros. En noviembre de 2006 no se obtuvieron muestras.	81
Figura 3.4. Intensidad media y abundancia media de la parasitación por hembras de <i>R. (B.) microplus</i> en dos cohortes consecutivas de terneros en A) Avia Terai y B) Villa Ángela.	82
Figura 3.5. Histogramas de frecuencia de la parasitación por hembras de <i>R. (B.) microplus</i> en dos cohortes consecutivas de terneros en Avia Terai (AT) y Villa Ángela (VA).	83
Figura 3.6. Prevalencia (%) (P) e incidencia acumulada (IA) por ELISA e incidencia acumulada por PCR en dos cohortes consecutivas de terneros en A) Avia Terai y B) Villa Ángela.	86

Figura 3.7. Tasa de inoculación (h) estimada sobre la prevalencia serológica (P ELISA), incidencia acumulada serológica (IA ELISA) e incidencia acumulada por PCR (IA PCR) para dos cohortes consecutivas de terneros en A) Avia Terai y B) Villa Ángela.	87
Figura 3.8. Análisis estadístico de sobrevivencia para la cohorte 1 (C1) y cohorte 2 (C2) de terneros en función de cada localidad estudiada (AT: Avia Terai; VA: Villa Ángela) según positividad a ELISA y PCR hasta los 9 meses de vida	88
Figura 3.9. Análisis estadístico de sobrevivencia para Avia Terai (AT) y Villa Ángela (VA) en función de cada cohorte de terneros estudiada (1: cohorte 1; 2: cohorte 2) según positividad a ELISA y PCR hasta los 9 meses de vida.	89
Tabla 1.1. Frecuencias, proporciones y valor de p para las variables vinculadas al manejo de los rodeos en relación con el estatus epidemiológico de los mismos	33
Tabla 1.2. Análisis de regresión de las variables de manejo significativas en las tablas de contingencia	34
Tabla 1.3. Análisis de contingencia de las variables vinculadas con la distribución geográfica de los establecimientos	34
Tabla 2.1. Cantidad de glándulas salivales de <i>R. (B.) microplus</i> analizadas, cantidad de positivas y porcentaje de prevalencia de la infección con <i>B. bigemina</i> en relación con la localidad y fecha de colecta.	57
Tabla 2.2. Efecto del tiempo post colecta sobre la fragilidad de los ciegos intestinales de las garrapatas sometidas a disección y contaminación de la muestra con material de ingesta de la garrapata.	59
Tabla 3.1. Avia Terai. Porcentaje de prevalencia de larvas y ninfas y porcentaje de prevalencia, abundancia media e intensidad media de hembras de <i>R. (B.) microplus</i> en dos cohortes consecutivas de terneros.	78
Tabla 3.2. Villa Ángela. Porcentaje de prevalencia de larvas y ninfas y porcentaje de prevalencia, abundancia media e intensidad media de hembras de <i>R. (B.) microplus</i> en dos cohortes consecutivas de terneros.	79
Tabla 3.3. Avia Terai. Porcentaje de prevalencia serológica (P) estimado mediante la prueba de ELISA, incidencia acumulada (IA) estimada mediante las pruebas de ELISA y PCR y tasa de inoculación (h) estimada para los parámetros anteriores en dos cohortes consecutivas de terneros.	84
Tabla 3.4. Villa Ángela. Porcentaje de prevalencia serológica (P) estimado mediante la prueba de ELISA, incidencia acumulada (IA) estimada mediante las pruebas de ELISA y PCR y tasa de inoculación (h) estimada para los parámetros anteriores en dos cohortes consecutivas de terneros.	85

TÍTULO

Epidemiología de la babesiosis de los bovinos causada por *Babesia bigemina* (Smith y Kilborne, 1893) en el sudoeste de la provincia del Chaco

PALABRAS CLAVE

Babesia bigemina, *Rhipicephalus microplus*, epidemiología, densidad de hospedadores, distribución agregada, disección

RESUMEN

Babesia bigemina es uno de los agentes etiológicos de la babesiosis de los bovinos y en Argentina es transmitida solamente por ninfas y adultos de la garrapata *Rhipicephalus (B.) microplus*. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar el estatus epidemiológico y factores asociados para *B. bigemina* en rodeos del sudoeste de la provincia del Chaco y evaluar la incidencia de infección y la proporción de garrapatas infectadas en dos establecimientos ganaderos (AT y VA) de la región. Se determinó que un 51% de los rodeos se encontraba en inestabilidad enzoótica, con riesgo de sufrir brotes de importancia económica. El estatus epidemiológico se asoció con la utilización de pasturas megatérmicas perennes. No se encontró relación entre el control de garrapatas y la transmisión de *B. bigemina* ni una relación espacial entre los campos con el mismo estatus epidemiológico, infiriéndose que los factores de manejo tendrían más influencia que los geográficos en la epidemiología de la enfermedad en la región estudiada. La proporción de garrapatas infectadas con *B. bigemina* fue de 19,8 % para AT y 9,3 % para VA. Esto explicaría una mayor transmisión del parásito en AT con respecto a VA. Sin embargo la infección estuvo relacionada con la proporción de animales con presencia de garrapatas y no con la abundancia de garrapatas sobre los animales. Esto indicaría que la proporción de garrapatas infectadas no sería una limitante para la transmisión y que las situaciones de baja transmisión no se deberían a la presencia de pocas garrapatas infectadas ni de pocas garrapatas sobre los animales, sino a pocos animales con garrapatas sobretodo por efecto de una distribución agregada. Se infiere que la variable más relevante en la regulación de la dinámica de transmisión es la densidad de hospedadores, o carga instantánea.

TITLE

Epidemiology of bovine babesiosis caused by *Babesia bigemina* (Smith y Kilborne, 1893) in Southwestern Chaco province

KEY WORDS

Babesia bigemina, *Rhipicephalus microplus*, epidemiology, host density, aggregated distribution, dissection.

ABSTRACT

Babesia bigemina is one of the etiological agents of bovine babesiosis and in Argentina is transmitted only by nymphs and adults of the tick *Rhipicephalus (B.) microplus*. The objectives of this study were to evaluate the epidemiological status and associated factors for *B. bigemina* in cattle herds from south western Chaco province and to evaluate the incidence of infection and the proportion of infected ticks in two cattle farms (AT and VA) of the region. It was asserted that 51% of the herds were in a situation of enzootic instability, with risks of suffering outbreaks of economical importance. The epidemiological status was associated with the use of megathermal perennial pastures. Neither was determined a relationship between tick control and transmission of *B. bigemina* nor a spatial relationship between farms with the same epidemiological status, inferring from this that farm management factors are of greater influence on the epidemiology of the disease in the surveyed region than the geographical factors. The proportion of ticks infected with *B. bigemina* was 19.8% for AT and 9.3% for VA. This could explain a greater transmission of the parasite in AT compared to VA. The infection, however, was related to the proportion of animals with presence of ticks and not to the abundance of ticks on the animals. This could indicate that the proportion of infected ticks is not a limiting factor for transmission and that the situations of low transmission are not due to a low proportion of infected ticks and even not due to low ticks boundaries on the animals, but due to a low proportion of animals with ticks, specially because of an aggregated distribution. It is inferred that the most relevant variable in regulation of dynamics of transmission is the host density, or stock density.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las babesias son protozoos parásitos obligados de glóbulos rojos de vertebrados terrestres. Son transmitidas exclusivamente por garrapatas duras (Acari: Ixodidae), en las que realizan parte de su ciclo biológico. Producen una enfermedad aguda denominada babesiosis, caracterizada por fiebre, anemia hemolítica y en casos severos, la muerte. Las babesiosis de los bovinos, que suelen manifestarse en forma de brotes, con alta morbilidad y mortalidad, constituyen una seria limitante para el desarrollo de la ganadería en regiones tropicales y subtropicales del globo (McCosker, 1981). Las babesias pertenecen al Phylum Apicomplexa, Clase Aconoidasida, Orden Piroplasmorida, Familia Babesidae (Peirce, 2000). La taxonomía clásica de los dos géneros principales que afectan a los animales domésticos, *Babesia* y *Theileria*, se fundamenta en la morfología y biología de los parásitos (Mehlhorn y Schein, 1984). Un criterio básico para la diferenciación de ambos géneros es que las babesias, una vez que son inoculadas al hospedador vertebrado invaden directamente eritrocitos, mientras que las theilerias parasitan en primer lugar linfocitos o macrófagos, en donde se reproducen por esquizogonia o división múltiple (Mehlhorn y Schein, 1984; Uilenberg, 2006). Otro criterio de importancia lo constituye el tamaño de las formas intraeritrocitarias y la disposición de éstas dentro de las células sanguíneas (Kakoma y Mehlhorn, 1994; Mehlhorn y Schein, 1984). Las técnicas serológicas y la sensibilidad a tratamientos farmacológicos también se han utilizado como criterio taxonómico (Callow y col., 1976b; Hoyte, 1976).

La utilización de herramientas moleculares aplicadas al estudio de los piroplasmas revela una situación taxonómica compleja, ya que se ha generado evidencia concluyente de que ambos géneros son parafiléticos y que filogenéticamente existirían de 5 a 8 genotipos entre los que se distribuyen los piroplasmas conocidos (Allsopp y col., 1994; Allsopp y Allsopp, 2006; Criado-Fornelio y col., 2003; Lack y col., 2012; Morrison, 2009; Schnittger y col., 2003; Zahler y col., 2000a). Diferentes autores coinciden en que esta situación se observa también a nivel específico, habiéndose detectado diferencias genéticas que demuestran la existencia de complejos de especies, por lo que bajo una misma denominación se encontrarían especies crípticas, incluso entre aquellas de mayor importancia sanitaria, como *B. bovis*, *B. microti* y *B. divergens* (Allsopp y Allsopp, 2006; Criado-Fornelio y col., 2004; Kjemtrup y col., 2000b; Kjemtrup y col., 2000a; Luo y col., 2005; Ruef y col., 2000; Vogl, 2004;

Zahler y col., 2000a). Mediante el uso del diagnóstico molecular se han detectado también numerosos organismos que representarían especies nuevas. De acuerdo al criterio mas o menos conservador de los autores se las ha descrito y asignado a uno de ambos géneros, o simplemente se ha mencionado el hallazgo sin definir una denominación genérica (Birkenheuer y col., 2004; Birkenheuer y col., 2006; Bosman y col., 2010; Bronsdon y col., 1999; Conrad y col., 2006; Dantrakool y col., 2004; Holman y col., 1994; Jinnai y col., 2010; Kjemtrup y col., 2006; Lopez-Rebollar y col., 1999; Luo y col., 2005; Malandrin y col., 2010; Marinkelle, 1996; Oosthuizen y col., 2008; Penzhorn y col., 2001; Soares y col., 2011; Yabsley y col., 2006; Yabsley y col., 2009; Zahler y col., 2000b).

Los microorganismos causantes de la babesiosis bovina en Argentina son *B. bovis* y *B. bigemina*, y ambos son transmitidos exclusivamente por la garrapata común del bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Guglielmone, 1995). En el ámbito rural se suele englobar el síndrome hemolítico-febril causado por estos patógenos junto con la anaplasmosis causada por *Anaplasma marginale* bajo el término vernáculo de "Tristeza" (Späth, 1986). Estudios locales demostraron que la garrapata de los bovinos y las enfermedades que transmite constituyen un problema económicamente relevante para la producción pecuaria nacional (Späth y col., 1994a; Späth y col., 1994b; Späth y col., 1994c). El área de distribución de los patógenos coincide con la de su vector y comprende aproximadamente 61 millones de hectáreas en el norte del país (Guglielmone y Mangold, 1987), donde se encuentra en la actualidad una población bovina de aproximadamente 14 millones de cabezas (Rossanigo y col., 2012). En el conjunto de esta región la babesiosis es una enfermedad común, con mayor incidencia en el otoño, produciendo en general, epizootias de tipo puntual en bovinos mayores de un año (Guglielmone, 1994).

En Argentina, el estudio de la epidemiología de las babesias ha tenido un sesgo hacia *B. bovis* debido principalmente, a la disponibilidad temprana de pruebas serológicas para el diagnóstico de esta especie (Guglielmone, 1987). Mediante estas pruebas se caracterizaron extensas áreas del Noroeste del país y se determinaron factores de riesgo de brotes por este patógeno para diferentes zonas ecológicas y tipos de producción (González de Ríos, 1987; Guglielmone y col., 1997a; Habich y col., 1982; Späth y col., 1987). La falta de una técnica de diagnóstico serológico para *B. bigemina* hasta el año 1985, resultó en un menor volumen de información con respecto a este patógeno (Guglielmone, 1987), sobre el que solo hay registros de prevalencia serológica para localidades

puntuales (Aguirre y col., 1990; Mastropaolo y col., 2009b; Vanzini y col., 1999), lo que resulta insuficiente para decidir estrategias de control y prevención.

Babesia bigemina fue descrita en 1893 por Smith y Kilborne en los Estados Unidos de Norte América, quienes a la vez demostraron por primera vez que un patógeno podía ser transmitido por un artrópodo (Smith y Kilborne, 1893), sentando las bases para el estudio de las enfermedades transmitidas por vectores. En Argentina fue diagnosticada por primera vez en 1903, por Lignières, (Lignieres, 1903), quien ensayó satisfactoriamente los primeros métodos de inmunización, lo que se tradujo en la posibilidad de usar reproductores de alto valor genético dentro del área de distribución de *R. (B.) microplus* (Guglielmone, 1991b; Vanzini y Ramirez, 1994).

Existe controversia sobre la importancia sanitaria de *B. bigemina*, que en términos generales es menos patógena que *B. bovis* (Guglielmone, 1994). En Australia, por ejemplo, se considera que *B. bigemina* rara vez causa enfermedad (Bock y col., 2004; Jonsson y col., 2012) y no se incluye en los esquemas de vacunación (FAO, 1988). En África se considera que *B. bovis* es más virulenta, pero que *B. bigemina* causa mayores pérdidas debido a una distribución geográfica más extensa (de Vos y col., 2006). En los Estados Unidos de Norteamérica, *B. bigemina* era la causa de la Fiebre de Texas, enfermedad que por si misma justificó una larga y costosa campaña de erradicación de la garrapata *R. (B.) annulatus* en ese país (Levine, 1971). En Israel se considera a *B. bigemina* como un patógeno de relevancia (Shkap y col., 2005) y lo mismo ocurre tanto en nuestro país como en el sur de Brasil, donde se demostró que este protozooario causa reacciones clínicas de gravedad (Begeres de Almeida y col., 2006; Mangold y col., 1992). Un análisis de los brotes de babesiosis diagnosticados a lo largo de ocho años en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Cerrillos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en Salta, determinó que el 15% de los brotes fueron causados exclusivamente por *B. bigemina* y un 23% se debieron a infecciones mixtas de *B. bigemina* y *B. bovis* (Späth, 1986).

La existencia de una situación contrastante con Australia no es un dato menor, ya que en ese país se generó un importante volumen de información sobre la interacción entre las babesias de bovinos y sus garrapatas vectoras, así como sobre la ecología de esta garrapatas, que fue la base para estudios epidemiológicos en otras regiones del globo (Bock y col., 1999; Callow, 1968; Callow y col., 1976a; Callow y Stewart, 1978; Dalgliesh y Stewart, 1978; Dalgliesh y Stewart, 1982; Dallwitz y

col., 1987; Hitchcock, 1955; Mahoney, 1969; Mahoney y col., 1973; Mahoney, 1974; Mahoney y col., 1979; Mahoney y col., 1981; Mahoney y Mirre, 1971; Mahoney y Mirre, 1979; Mahoney y Ross, 1972; Riek, 1964; Riek, 1966; Sutherst y col., 1978; Sutherst y col., 1983; Sutherst y col., 1986; Sutherst y col., 1988; Sutherst y Bourne, 2006; Sutherst y Dallwitz, 1979). Sin embargo se ha demostrado recientemente que la garrapata de los bovinos presente en Australia no es *R. (B.) microplus*, sino *R. (B.) australis* (Estrada-Peña y col., 2012). Claramente, la información publicada en ese país ya no puede extrapolarse de manera directa a las condiciones de Argentina, lo que valoriza la importancia de los trabajos locales. Por este motivo, y sumado a la situación taxonómica ya descrita, es que en este trabajo de tesis se dará prioridad a la información que refiere específicamente a *B. bigemina* y en particular a los estudios generados en la región.

El ciclo biológico de *B. bigemina* implica la transmisión de un eritrocito a otro, de un estadio de garrapatas al siguiente, de la garrapata a un hospedador vertebrado y viceversa (Friedhoff, 1988). La reproducción o multiplicación se produce por una alternancia de reproducción sexual (gamogonia) y asexual (esporogonia y merogonia) (Hodgson, 1992). La primera de éstas comienza aún dentro del hospedador vertebrado o inmediatamente después de la ingestión por la garrapata, cuando algunas formas parasitarias se diferencian en gametocitos (Mackenstedt y col., 1990; Mackenstedt y col., 1995; Rudzinska y col., 1983), que son las únicas formas capaces de infectar las garrapatas (Hodgson, 1992). Una vez en el intestino de la garrapata, los gametocitos son fagocitados por las células digestivas mientras todavía están cubiertos por la membrana del glóbulo rojo (Hodgson, 1992). Este proceso solo ocurre en las hembras de garrapatas las 16-24 horas previas a su desprendimiento del bovino (Friedhoff, 1988). Una vez en la célula digestiva, los gametocitos se diferencian en gametos y de la unión sexual de dos gametos (gamogonia) se produce un cigoto que abandona la célula digestiva e invade una célula viteliogénica del epitelio intestinal (Mehlhorn y Schein, 1984; Mehlhorn y Schein, 1993). En estas células el cigoto se desarrolla en un cuerpo de fisión múltiple (esporogonia), dentro del que se desarrollan células alargadas móviles poliploides llamadas esporokinetos, los cuales son liberados a la hemolinfa de la garrapata (Mackenstedt y col., 1995). Desde allí invaden los ovarios, oocitos y embriones de la garrapata. Al mismo tiempo, los esporokinetos invaden otros órganos, donde se producen esporogonias secundarias cuyos kinetos aumentan la infección de las larvas embrionarias (Kakoma y Mehlhorn, 1994; Potgieter y Els, 1977).

Similares ciclos de esporogonia se producen en el huevo y en diferentes órganos de larvas, ninfas y adultos de garrapatas. Un ciclo final de esporogonia se produce en las glándulas salivales de ninfas y adultos de *R. (B.) microplus*. En este sitio el resultado de la esporogonia no son esporokinetos, sino las formas infectantes para el bovino, esporozoítos haploides (Mackenstedt y col., 1995), que morfológicamente son similares a los merozoítos intraeritrocitarios (Friedhoff y Smith, 1981; Potgieter y Els, 1977; Weber y Friedhoff, 1979). En el caso de *B. bigemina*, debido a los ciclos de esquizogonia continuos en las garrapatas adultas, puede producirse transmisión vertical a la progenie, aún en ausencia de reinfección alimentaria (Büscher, 1988; Friedhoff, 1988; Potgieter y Els, 1977; Rosenbusch, 1927; Rosenbusch y Gonzalez, 1923).

La infección del bovino ocurre cuando se inoculan las formas presentes en las glándulas salivales de las garrapatas, durante la alimentación de las mismas (Friedhoff y Smith, 1981). Una vez en el bovino, *B. bigemina* invade solamente eritrocitos (Mehlhorn y Schein, 1984). Dentro de éstos, los trofozoítos (estadio que se alimenta) permanecen en contacto directo con el citoplasma de la célula hospedadora (Rudzinska, 1981). Este estadio se divide asexualmente (merogonia) dentro del eritrocito, dando lugar a dos merozoítos hijos, resultado de una fisión binaria. Los merozoítos abandonan la célula e inmediatamente invaden sendos eritrocitos. Este ciclo de reproducción asexual continúa indefinidamente hasta que el bovino muere o consigue controlar la infección (Young y Morzaria, 1986). Una sola infección de *B. bigemina* puede permanecer en el hospedador vertebrado como infección latente durante meses (Callow y col., 1974; Latif y col., 1979; Pipano y col., 2002), desarrollando picos de parasitemia detectables a intervalos irregulares que se deben a un mecanismo de variación antigénica (Allred y Al-Khedery, 2004; Zwart, 1979). En condiciones de campo, las reinfecciones producidas por nuevas inoculaciones, que se comportan como poblaciones antigénicamente diferentes, dan lugar a picos de parasitemia superpuestos o alternados, por lo que los microorganismos pueden ser detectables en sangre por largos periodos (Mahoney, 1973; Mahoney y col., 1973; Mahoney, 1974; Mahoney y col., 1979). Esta infección latente fue considerada durante muchos años como un requisito para la protección inmunológica, un estado conocido como premunición (Boero, 1976; Lombardero y col., 1976; Sergent y Sergent, 1956). Este concepto ha debido abandonarse ya que diferentes autores demostraron que los animales que se recuperan de una infección desarrollan una fuerte inmunidad que se mantiene al menos a lo largo de toda la vida

útil de los bovinos, aún habiendo eliminado la infección y en ausencia de reinfecciones (Aguirre y col., 1993; Mahoney y col., 1973; Mahoney y col., 1979; Pipano y col., 1972; Pipano y col., 2002; Trueman y Blight, 1978).

La gravedad del cuadro clínico luego de la primoinfección depende en gran medida de la edad del animal afectado. Las infecciones en animales jóvenes no producen manifestaciones clínicas, mientras que en animales de mayor edad el cuadro clínico suele ser grave, con frecuencia fatal. Esto es debido a un mecanismo de resistencia innata (Zintl y col., 2005) que persiste hasta los siete a nueve meses de vida. Si bien la evidencia experimental no es concluyente con respecto a la duración de este periodo de resistencia y difiere de acuerdo a diferentes autores (Latif y col., 1979; Levy y col., 1982; Mahoney y Ross, 1972; Riek, 1963; Smith, 1984; Trueman y Blight, 1978), existe sobrada evidencia de que en nuestro país la mayoría de los brotes de babesiosis se produce en animales mayores a 12 meses de edad (Guglielmone y col., 1992a; Späth, 1986; Späth y col., 1994c). Independientemente de la edad a la primoinfección, o que esta haya cursado o no con un cuadro clínico, como se mencionó previamente, los animales recuperados desarrollan una sólida inmunidad que confiere protección para toda la vida. Esta inmunidad se basa en mecanismos de base celular y principalmente en la acción del bazo como órgano del sistema retículo-endotelial (de Vos y col., 1987; Goff y col., 2010; Zwart, 1979). Debido al mecanismo de variación antigénica mencionado anteriormente, para que la inmunidad sea completa, es necesario que el animal curse con la infección y se exponga a los diferentes antígenos que es capaz de expresar el patógeno, hasta neutralizarlo (Pipano y col., 1972). Estos animales resistirán la enfermedad clínica frente a nuevas reinfecciones, aún siendo serológicamente negativos debido a la ausencia de nuevos estímulos (Callow y col., 1974). Si la infección se interrumpe rápidamente con un tratamiento efectivo, el animal podrá ser positivo a una prueba serológica, pero no ser capaz de resistir la infección de una población de babesias antigénicamente diferente (Callow y col., 1974).

La presentación clínica de babesiosis en un rodeo depende entonces de la frecuencia de transmisión (Mahoney, 1973). Debido a la resistencia innata, si los animales se infectan a temprana edad, no se producirán brotes de importancia a lo largo de su vida útil, es decir, que una alta tasa de transmisión del patógeno conlleva a una mínima presentación de la enfermedad. Este estado se ha denominado estabilidad enzoótica (EE). Por el contrario, si una gran proporción de la tropa se expone

al patógeno una vez terminado el periodo de resistencia innata, las consecuencias clínicas pueden ser graves, o incluso fatales, presentándose en general en forma de epizootias puntuales, que afectan a una gran proporción del rodeo en un lapso muy corto de tiempo. A este escenario epidemiológico se lo ha denominado de inestabilidad enzoótica (IE) (Guglielmone, 1992a). La frecuencia de transmisión en condiciones de producción ganadera depende no solo de factores bióticos (hospedador, vector, patógeno) o abióticos (clima, características edáficas) sino también antrópicos (factores de manejo de los establecimientos ganaderos) (Guglielmone, 1994). La estabilidad debe asimismo alcanzarse para cada cohorte de terneros nacidos en el establecimiento, por lo que resulta evidente que la situación puede cambiar de un año a otro e incluso ser diferente en establecimientos dentro de una misma región (Cetrá y col., 2000; Mastropaolo y col., 2009b).

En el bovino, *B. bigemina* produce anemia hemolítica. Generalmente no produce enfermedad hasta que la parasitemia excede el 1% de los eritrocitos infectados. Las parasitemias pueden alcanzar valores de 15 a 40%. La anemia se produce porque el glóbulo rojo se destruye cuando el parásito lo abandona y porque la fragilidad osmótica de los eritrocitos aumenta, incluso en aquellos que no están infectados (Kakoma y Mehlhorn, 1994). El periodo prepatente luego de la infestación con garrapatas infectadas es de 12 a 15 días (Mangold y col., 1992). La signología es concordante con el cuadro de anemia hemolítica. Las manifestaciones clínicas incluyen hipertermia, adinamia y estupor. Frecuentemente se observa taquicardia y polipnea, como mecanismos compensatorios de la anemia. Un signo frecuente es la hemoglobinuria. La anemia y la ictericia son notorias. Algunos animales pueden desarrollar un cuadro clínico leve, con diferentes picos de parasitemia durante una a tres semanas. Con cada pico de parasitemia se produce un aumento de la temperatura rectal, junto con anorexia y depresión. En estos casos no suele observarse hemoglobinuria, aunque si ictericia. Durante la fase aguda de hemólisis, la anemia es normocítica. Durante la convalecencia, sin embargo, se vuelve macrocítica, con aumento del volumen corpuscular medio y aparición de reticulocitos (Kakoma y Mehlhorn, 1994). Los hallazgos *post-mortem* más frecuentes son la vejiga urinaria con orina teñida de rojo, el bazo hipertrofiado con pulpa reblandecida y oscura, hígado también hipertrofiado, tinte amarillento, vesícula distendida y llena con bilis espesa (Guglielmone, 1992a).

El diagnóstico presuntivo debe confirmarse con la inspección microscópica de extendidos de sangre obtenidos de la circulación periférica. *Babesia bigemina* se observa como pares dispuestos en ángulo agudo en los eritrocitos, aunque también pueden reconocerse formas simples, ameboideas o piriformes. Su tamaño es mayor a 3,5 μm . La mera presencia de *B. bigemina* en los extendidos sanguíneos no es un indicador de enfermedad clínica, ya que estos parásitos pueden observarse en la sangre de animales sanos, así como en animales enfermos por otras causas. La sintomatología de babesiosis por *B. bigemina* se acompaña por parasitemias mayores al 1% de los eritrocitos infectados, siendo posible detectar valores de 20% o superiores. Se observa hipertermia mayor a 40,5°C y un índice hematocrito inferior a 0,2 (Anziani y col., 1992; de Vos y col., 2006; Mangold y col., 1992). El diagnóstico diferencial se debe realizar con todas aquellas enfermedades que produzcan muerte súbita, fiebre, anemia, orina roja e ictericia. Entre éstas, babesiosis por *B. bovis*, anaplasmosis, hemoglobinuria bacilar, mancha, carbunco, enterotoxemia, botulismo, rabia paresiante, leucosis, fasciolosis, leptospirosis, haemonchosis, intoxicación por alcaloides pirrolizidínicos, intoxicación por cobre, intoxicación por *Brassica* sp., intoxicación por helechos e intoxicación por *Wedelia* sp. (Anziani y col., 1992; de Vos y col., 2006).

Las drogas babesicidas son de alta eficacia contra *B. bigemina*. Las drogas utilizadas actualmente son el diaceturato de diaminazene en dosis de 3,5 mg/kg y el dipropionato de imidocarb en dosis de 1,5 mg/kg. El tratamiento exitoso de los casos clínicos se basa en la rapidez del diagnóstico y la pronta aplicación de la medicación específica. Cualquier terapia adicional es ineficaz en ausencia de la terapia específica (Arellano Sota, 1988). El dipropionato de imidocarb se puede usar también como quimio-profiláctico, ya que dosis de 3 mg/kg confiere protección contra desafíos de *B. bigemina* por ocho semanas (Arellano Sota, 1988). Esta técnica se puede emplear cuando animales susceptibles deben permanecer por períodos cortos en zonas de transmisión de babesias, o en regiones donde no es posible vacunar (Guglielmone, 1992a).

En Argentina está disponible una vacuna contra *B. bovis* y *B. bigemina* basada en microorganismos vivos atenuados multiplicados en cultivos *in vitro* o *in vivo* (Guglielmone, 1996), en dosis conocidas de eritrocitos infectados por cada protozooario (Aguirre y col., 1989; Arellano Sota, 1994; Echaide y col., 1993; Mangold y col., 1988). Para el éxito vacunal es indispensable la multiplicación de los patógenos en los bovinos inoculados. La inmunidad conferida luego de una sola

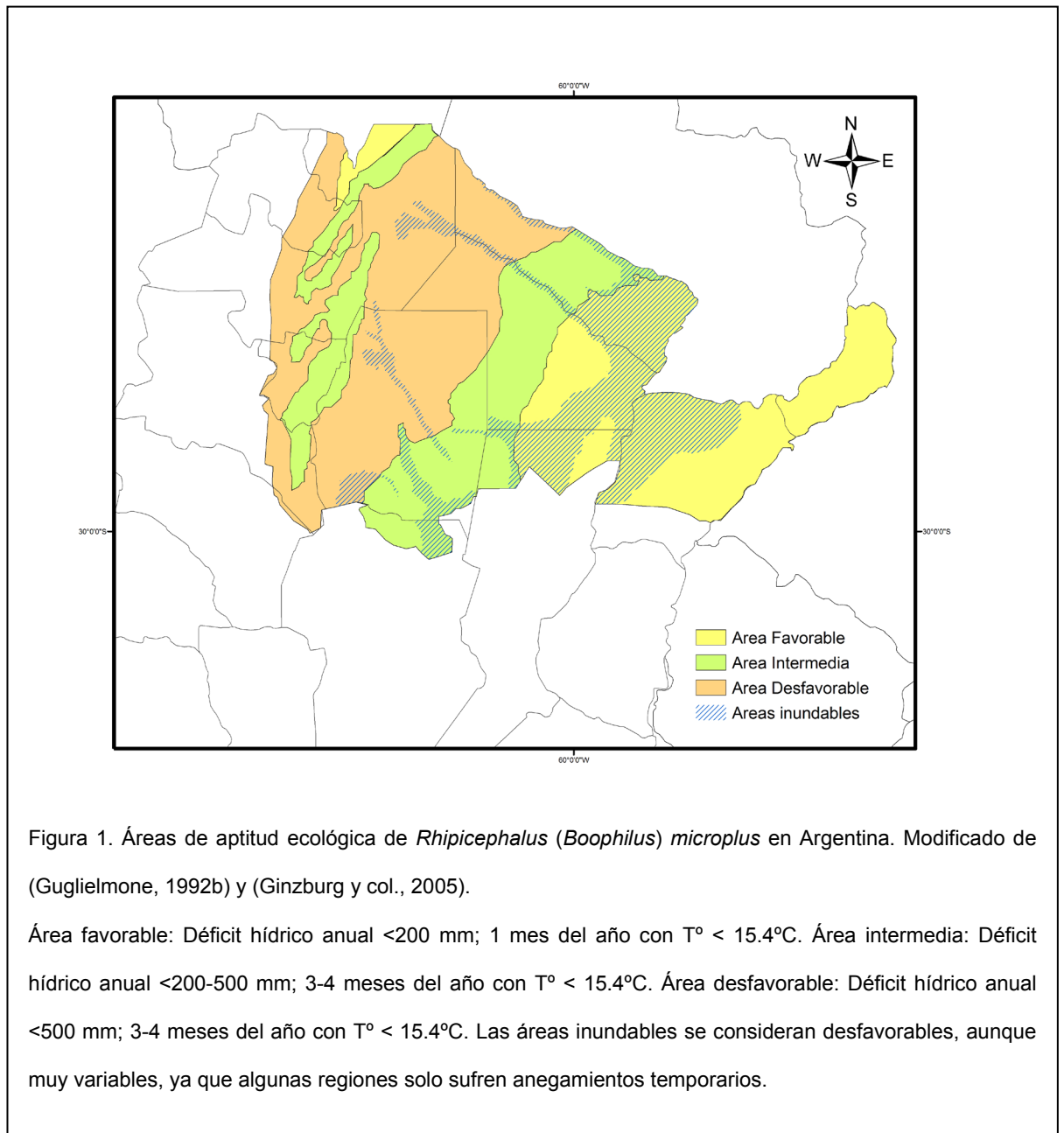
aplicación es suficiente para toda la vida útil de los bovinos (Mahoney y col., 1979). Aplicadas en animales jóvenes, provocan una reacción imperceptible que no afecta la ganancia de peso (Aguirre y col., 1989; Aguirre y col., 1991; Echaide y col., 1993; Guglielmone y col., 1989a; Mangold y col., 1988; Mangold y col., 1992; Mangold y col., 1993). Las cepas utilizadas, atenuadas en nuestro país, perdieron la capacidad de ser transmitidas por garrapatas, por lo que no incorporan microorganismos al sistema (Mangold y col., 1993).

El único vector reconocido de *B. bigemina* en Argentina es la garrapata común del bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Guglielmone, 1995). Esta garrapata tiene un ciclo biológico de un hospedador, donde los tres estadios parasitarios, larvas, ninfas y adultos (machos y hembras), se alimentan, mudan y copulan sobre el mismo individuo. Este ciclo se divide en dos fases: una parasitaria, en la cual la garrapata se desarrolla sobre el bovino y otra no parasitaria o de vida libre, que se cumple fuera del hospedador, en las pasturas (Nuñez y col., 1987). La fase no parasitaria comienza cuando las hembras ingurgitadas (teleoginas) se desprenden del bovino y caen al suelo para poner sus huevos. Esta fase no parasitaria se subdivide en varios períodos. Como período de pre-oviposición se define al espacio de tiempo desde que la teleogina se desprende hasta que pone el primer huevo, que normalmente es de 2 a 6 días (Nava y col., 2013). El lapso desde que las teleoginas comienzan la oviposición hasta que ponen su último huevo se conoce como período de oviposición. Las teleoginas habitualmente ponen entre 2000 y 3000 huevos, en sitios protegidos de las radiaciones solares directas. El período que transcurre desde la oviposición hasta el nacimiento de las larvas se denomina período de incubación, cuya duración puede variar entre 20 y 45 días, dependiendo mayormente de la temperatura ambiente (Ivancovich y col., 1982; Ivancovich y col., 1984). Cuando las larvas que se encuentran en la vegetación acceden a un bovino, comienza la fase parasitaria del ciclo biológico, que a diferencia de la fase no parasitaria, es escasamente influida por las condiciones ambientales. Una vez sobre el bovino, las larvas se alimentan (3 a 5 días) y mudan a ninfas. Estas se alimentan a su vez y hacia el día 9 a 12 aproximadamente, se ingurgitan, mudando sobre el hospedador a adultos (machos y hembras). Luego de la cópula, las hembras se ingurgitan y finalmente caen al suelo para desovar. La duración modal de la fase parasitaria completa es de 23 días (Nuñez y col., 1972; Nuñez y col., 1987).

En Argentina, la garrapata común del bovino se distribuye principalmente al norte de los paralelos 30°-31° Lat. S, con excepción de la región andina. Se la encuentra en las provincias de Salta, Tucumán, Jujuy, Santiago del Estero, Santa Fe (al norte del paralelo 30° Lat. S), Córdoba, Catamarca, Formosa, Misiones, Corrientes y Chaco. La duración relativamente constante de la fase parasitaria le confiere capacidad para realizar más de un ciclo anual. En zonas tropicales, la garrapata común del bovino puede desarrollar hasta cinco ciclos anuales, pero en áreas más meridionales, como el sur del Chaco, norte de Santa Fe, sólo puede completar entre 2 y 3 ciclos anuales. El número y la duración de ciclos anuales están determinados por la duración de la fase no parasitaria, la cuál es influenciada por factores abióticos como la temperatura y la humedad del ambiente (Ivancovich y col., 1982; Ivancovich y col., 1984; Nava y col., 2013). En función de estos dos factores el área de distribución se puede clasificar en diferentes áreas de aptitud ecológica como: Área favorable: Déficit hídrico anual < 200 mm; 1 mes del año con $T^{\circ} < 15.4^{\circ}\text{C}$; Área intermedia: Déficit hídrico anual < 200-500 mm; 3-4 meses del año con $T^{\circ} < 15.4^{\circ}\text{C}$; Área desfavorable: Déficit hídrico anual < 500 mm; 3-4 meses del año con $T^{\circ} < 15.4^{\circ}\text{C}$. Las zonas con anegamientos permanentes o regulares no son aptas para el desarrollo de garrapatas aunque se encuentren incluidas en el área favorable (Guglielmono, 1992b). La aptitud ecológica de las distintas regiones de Argentina para la garrapata común del bovino se muestra en la figura 1.

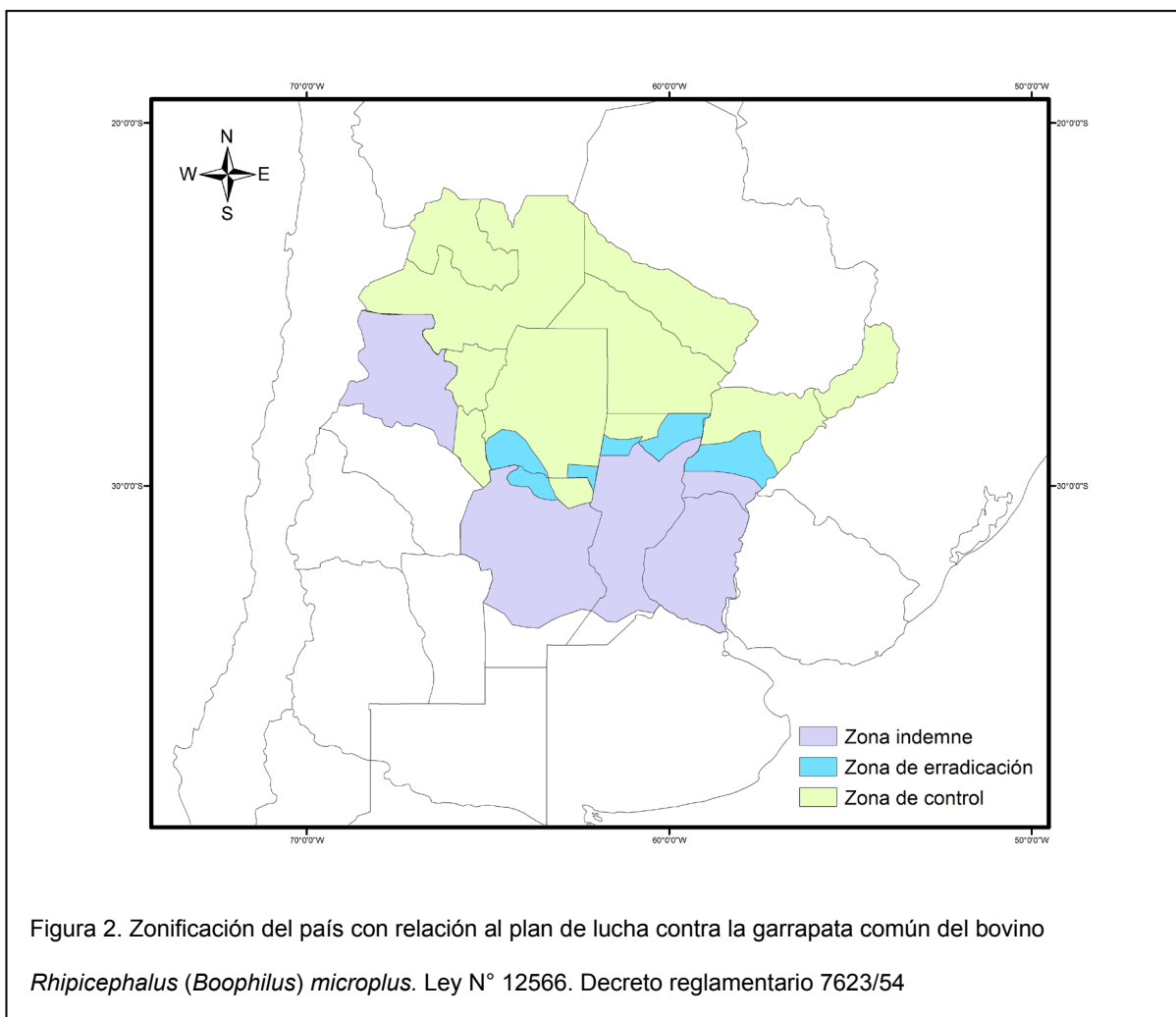
El control de *R. (B.) microplus* está reglamentado por el Servicio Nacional de Calidad Agroalimentaria (SENASA) y este es el organismo rector que a través de la ley de lucha obligatoria contra la garrapata (Ley N°12566) indica los procedimientos que productores y veterinarios deben seguir en las distintas áreas del país. El artículo 1° del decreto reglamentario 7623/54 de la ley 12566 establece el marco legal para la zonificación del país con relación al plan de lucha contra la garrapata común del bovino. Dichas zonas (Figura 2) se definen de la siguiente manera: a. Zona de control: no existe obligatoriedad de erradicación. Se promueven la adopción de medidas tendientes a garantizar un nivel mínimo de saneamiento. b. Zona de erradicación: es la zona del país apta para el desarrollo de poblaciones de *R. (B.) microplus*, donde los establecimientos se encuentran bajo vigilancia local y zonal en proceso de limpieza obligatoria, auditada por el estado. c. Zona indemne: son las áreas del país ecológicamente libres de la presencia de la garrapata *R. (B.) microplus*, o aquellas que son aptas para el desarrollo de su ciclo biológico donde se haya ejecutado y comprobado su erradicación en

todos los establecimientos y/o exista un porcentaje menor al uno por ciento (1%) de establecimientos infestados en proceso de limpieza, fiscalizado por el SENASA.



Mientras que el movimiento de ganado de una zona a otra está regulado y fiscalizado (Asociación Argentina de Parasitología Veterinaria, 2000), el desplazamiento de tropas dentro de la zona de control suele hacerse sin ninguna precaución. Esto es debido, presumiblemente, a dos conceptos erróneos fuertemente arraigados en el ámbito ganadero. Uno es la noción de premunición,

que implica que para que haya una respuesta inmune activa debe haber parásitos circulando en el organismo y que la inmunidad se pierde cuando los parásitos son eliminados. El otro concepto es que los animales nacidos y criados en la región endémica de garrapatas son inmunes a las enfermedades transmitidas por estas (figura 3). Ambos conceptos sumados llevan a la conclusión errónea de que si un animal nacido y criado en una zona endémica se enferma de tristeza, es debido a la pérdida de la inmunidad por haber eliminado la infección, sin contemplar la posibilidad de que el animal nunca se hubiera infectado. Esta confusión no es casual, ya que ambos conceptos derivan del estado del conocimiento científico mundial hasta la primera mitad del siglo veinte y preconizado en la literatura académica local (Boero, 1976; Eckell, 1977; Lombardero y col., 1976).



La tendencia a considerar inmunes a los bovinos nativos de la zona endémica lleva a los propietarios a no incluir medidas de prevención de la babesiosis en los esquemas sanitarios de los rodeos (Guglielmone, 1992a).



Figura 3. Oblea utilizada en los remates de ganado para identificar lotes procedentes de la zona de control de *R. (B.) microplus*.

La implementación racional de técnicas de prevención y control requiere, no obstante, de información epizootiológica para determinar la relevancia del problema y las estrategias de prevención más rentables. En esta área existe una deficiencia de información (Guglielmone, 1992a). Las mayores pérdidas ocasionadas por las garrapatas y las enfermedades que transmiten a los bovinos recaen en la ganadería del extremo norte de Santa Fe, oeste de Chaco y Formosa y centro y norte de la provincia de Corrientes (Späth y col., 1994c). Esto se debe a las condiciones favorables para el desarrollo de *R. (B.) microplus* en esta región donde la ganadería vacuna es de mayor importancia. Los estudios más relevantes en cuanto a la epizootiología de las babesias de los bovinos en nuestro país se realizaron, sin embargo, en explotaciones lecheras en el valle de Lerma en la provincia de Salta y en regiones aledañas del noreste argentino (Gaido y col., 1997; González de

Ríos, 1987; González de Ríos y col., 1988; González de Ríos y col., 1989; Guglielmone, 1987; Guglielmone y col., 1992a; Guglielmone y col., 1997a; Habich y col., 1982; Späth y col., 1979; Späth y col., 1987) resultando difícil interpolar la información a explotaciones tan contrastantes como son los establecimientos ganaderos de producción de carne en la región del Chaco.

En el año 2003 se produjeron diversos brotes de babesiosis bovina en el sudoeste de la provincia del Chaco (A. J. Mangold. Comunicación personal). Esta situación derivó en un estudio epidemiológico que determinó que una gran proporción de los rodeos de la zona se encontraba en una situación de IE, aunque no se pudieron establecer factores de riesgo que conduzcan a tal situación (Mastropaolo y col., 2009b). Por tal motivo se decidió llevar adelante una investigación exhaustiva sobre aspectos cuantitativos y cualitativos de la dinámica de transmisión de *B. bigemina* en esa región. El diseño de esa investigación, así como sus resultados y conclusiones, componen este trabajo de tesis doctoral.

El objetivo general de esta tesis es generar conocimientos sobre aspectos epidemiológicos de *B. bigemina* en rodeos para producción de carne en el chaco argentino y contribuir al desarrollo e implementación de estrategias para la prevención y control eficientes de la enfermedad causada por este patógeno.

La parte I consta de una descripción del área de trabajo y del capítulo 1, donde se detalla un estudio transversal realizado con el objetivo de evaluar el riesgo de ocurrencia de brotes en el sudoeste de la provincia del Chaco y analizar los factores que pueden conducir a una situación de riesgo. La parte II consta de dos capítulos basados en un estudio longitudinal llevado adelante en dos establecimientos y que aborda aspectos de la dinámica de transmisión-infección, tanto en las garrapatas vectoras, como en los bovinos. Así, en el capítulo 2 se estudia la prevalencia de infección por *B. bigemina* en hembras de *R. (B.) microplus* colectadas mensualmente sobre terneros, mientras que en el capítulo 3 se describe la dinámica de infección por *B. bigemina* en terneros, en relación con la parasitación por *R. (B.) microplus*. Finalmente se exponen las conclusiones generales sobre la información original generada en este trabajo y las perspectivas de investigación futura sobre la epidemiología de *B. bigemina*.

PARTE I

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras utilizadas para el análisis realizado en el capítulo 1 se obtuvieron de establecimientos ubicados en los departamentos Almirante Brown, Independencia, General Belgrano, 9 de Julio, O'Higgins, 12 de Octubre, San Lorenzo, Tapenagá y Mayor L. J. Fontana en el sudoeste de la provincia del Chaco; los departamentos Copo, Alberdi, Moreno, Juan F. Ibarra y General Taboada en el noreste de la provincia de Santiago del Estero y el departamento 9 de Julio en el noroeste de la provincia de Santa Fe (Figura 4).

El área de estudio corresponde a la provincia biogeográfica Chaqueña del dominio Chaqueño según Cabrera y Willink (1973). Esta región, denominada comúnmente Gran Chaco Sudamericano (Morello y col., 2009), presenta en toda su extensión un gradiente pluviométrico con extremos de 1300 mm anuales en el este hasta 400 mm anuales en el oeste. De acuerdo al esquema de eco-regiones propuesto por Burkart y col. (1999) el área de estudio se ubica en dos regiones contiguas, el Chaco Seco y el Chaco Húmedo, correspondientes respectivamente al distrito chaqueño occidental y al distrito chaqueño oriental según Cabrera (1994) (Figura 5). Estas dos regiones son tratadas por Morello y col. (2009) como Subregión del Chaco semiárido de la eco-región del Chaco Seco y eco-región del Chaco Húmedo, respectivamente. Esta última clasificación considera al Chaco semiárido como una amplia zona de transición gradual entre las dos regiones.

El Chaco Seco comprende una vasta planicie que presenta una suave pendiente hacia el este y se extiende sobre la mitad occidental de Formosa y Chaco, la oriental de Salta, casi todo Santiago del Estero, norte de Santa Fe y Córdoba y sectores de Catamarca, La Rioja y San Luis. El clima es continental cálido subtropical, con áreas que presentan las máximas temperaturas absolutas del continente. La temperatura media anual varía de norte a sur desde 23°C hasta cerca de 18°C. Los promedios de enero alcanzan los 28°C en el norte de Santiago del Estero y Chaco. Los promedios de julio oscilan latitudinalmente de 16 a 10°C (Morello y col., 2009). Con temperaturas mínimas absolutas que oscilan entre los -6 y -7°C, se producen heladas entre mayo y agosto (Cabrera, 1994). Las precipitaciones varían entre 500 y 700 mm anuales, son marcadamente estivales y disminuyen hacia el sudoeste. La vegetación característica es el bosque xerófilo con árboles como el quebracho

colorado santiagueño (*Schinopsis lorentzii*), quebracho blanco (*Aspidosperma quebracho-blanco*), mistol (*Zizypus mistol*), yuchán (*Chorisia insignis*), itín o carandá (*Prosopis kuntzei*), guayacán (*Caesalpinia paraguariensis*), brea (*Cercidium praecox*), varias especies de *Prosopis sp.* y *Acacia sp.*, así como diferentes cactáceas, como *Opuntia quimilo* y *Cereus coryne*, que alcanzan varios metros de altura. Los bosques alternan con estepas halófilas y pastizales o sabanas edáficas o inducidas por incendios o desmontes (Cabrera y Willink, 1973).

El chaco húmedo ocupa la mitad oriental de Formosa y Chaco, el extremo noroeste de Corrientes y norte de Santa Fe. El clima es subtropical cálido. La temperatura media anual disminuye de norte a sur, desde los 23° en el límite con Paraguay, hasta cerca de 18°C en la provincia de Santa Fe (Cabrera, 1994). Las heladas son escasas, aunque no hay ningún lugar en la región donde nunca hiele en campo abierto (Morello y col., 2009). Las lluvias alcanzan valores de 1300 mm anuales en el borde oriental y disminuyen hacia el oeste hasta los 750 mm, con una concentración marcadamente estival. El paisaje predominante es un mosaico de franjas de tierras altas, bien drenadas, con bosques, acompañando el curso de los grandes ríos (Pilcomayo, Bermejo, Paraná, y sus afluentes), alternando con interfluvios bajos, de esteros y cañadas, con fisonomías de pastizal, sabana y pajonal. La concentración estacional de las lluvias, la escasa pendiente y los suelos poco permeables de los interfluvios originan repetidas inundaciones en vastas extensiones de la eco-región (Burkart y col., 1999). La vegetación presenta mayor diversidad que en el Chaco Seco y se constituye básicamente de bosques xerófilos de quebracho colorado chaqueño (*Schinopsis balansae*), quebracho blanco, guayacán, espina corona (*Gleditsia amorphoides*), lapacho (*Tabebuia sp.*) y Urunday (*Astronium balansae*), entre otros, mezclados con palmares y sabanas, condicionada por las diversas fisonomías mencionadas (Burkart y col., 1999). Así, cerca de los ríos existen selvas marginales con elementos amazónicos y en los interfluvios aparecen mosaicos de bosques bajos compuestos por algarrobos (*Prosopis sp.*), churqui, (*Acacia caven*), ñandubay (*Prosopis algarrobilla*) y tala (*Celtis tala*) que rodean pajonales con predominio de espartillos y sabanas de *Sorghastrum sp.* y *Paspalum sp.* como especies dominantes (Cabrera, 1994). Es característica la presencia de palmeras caranday (*Copernicia australis*) en comunidades puras o alternando con las especies arbóreas mencionadas. En la región existen también esteros, que se diferencian de las sabanas por tener un fondo de agua

libre, sin cubierta vegetal, y diversas especies acuáticas como totoras, junco y camalote como especies dominantes (Burkart y col., 1999).

La transición entre el Chaco Seco y el Chaco Húmedo no es abrupta, sino que debe considerarse un gradiente de ecotonía correspondiente con una amplia faja de 800 mm de precipitaciones anuales denominada zona centro chaqueña. El régimen pluviométrico de esta faja presenta una gran variación interanual, con sequías extraordinarias que afectan las comunidades vegetales y por lo tanto al sistema agro productivo. En el área bajo estudio en el presente trabajo se corresponde con el “Dorsal Agrícola” o “Lomo Algodonero” del noreste de Santiago del Estero, sudoeste del Chaco y noroeste de Santa Fe. Hay especies diagnósticas de esta zona de transición, como el quebracho mestizo (*Schinopsis heterophylla*), la carandilla (*Trithrinax schyzophylla*) y el itín o carandá (Morello y col., 2009), particularmente abundante en la región analizada.

En una amplia región del sur del Chaco y norte de Santa Fe, el drenaje se encauza con dificultad en sentido norte-sur hacia el río Salado, dando origen al área conocida como “Bajos Submeridionales” (Burkart y col., 1999). Ésta es una extensa depresión con anegamientos prolongados originados básicamente por la abundancia estacional de lluvias y la ausencia de cauces definidos (Ginzburg y col., 2005). Los periodos plurianuales de anegamientos alternan con sequías, también prolongadas. Estos anegamientos y la condición salina de los suelos determinan un tipo de vegetación prácticamente sin elementos arbóreos y con predominio de pastizales de *Elionurus muticus*, *Leptochloa chloridiformis* y *Spartina argentinensis*, junto con otras especies halófilas (Cabrera, 1994). Esta área, que se corresponde con el distrito de las sabanas de Cabrera (1994) y con los Bajos Submeridionales, Subregión de la Gran Depresión Central según Morello y col. (2009), forma el límite sur de la región bajo estudio en este trabajo de tesis.

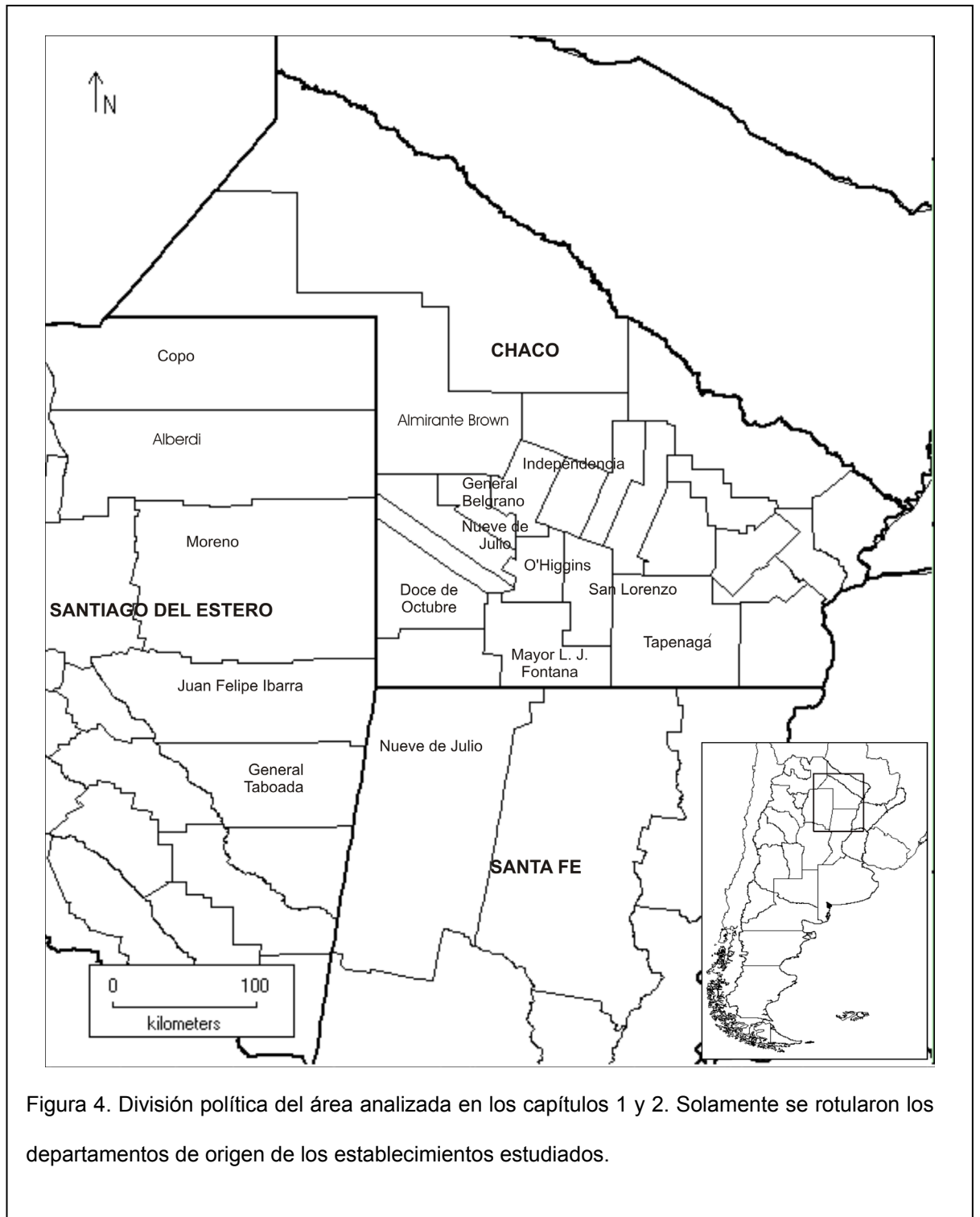


Figura 4. División política del área analizada en los capítulos 1 y 2. Solamente se rotularon los departamentos de origen de los establecimientos estudiados.

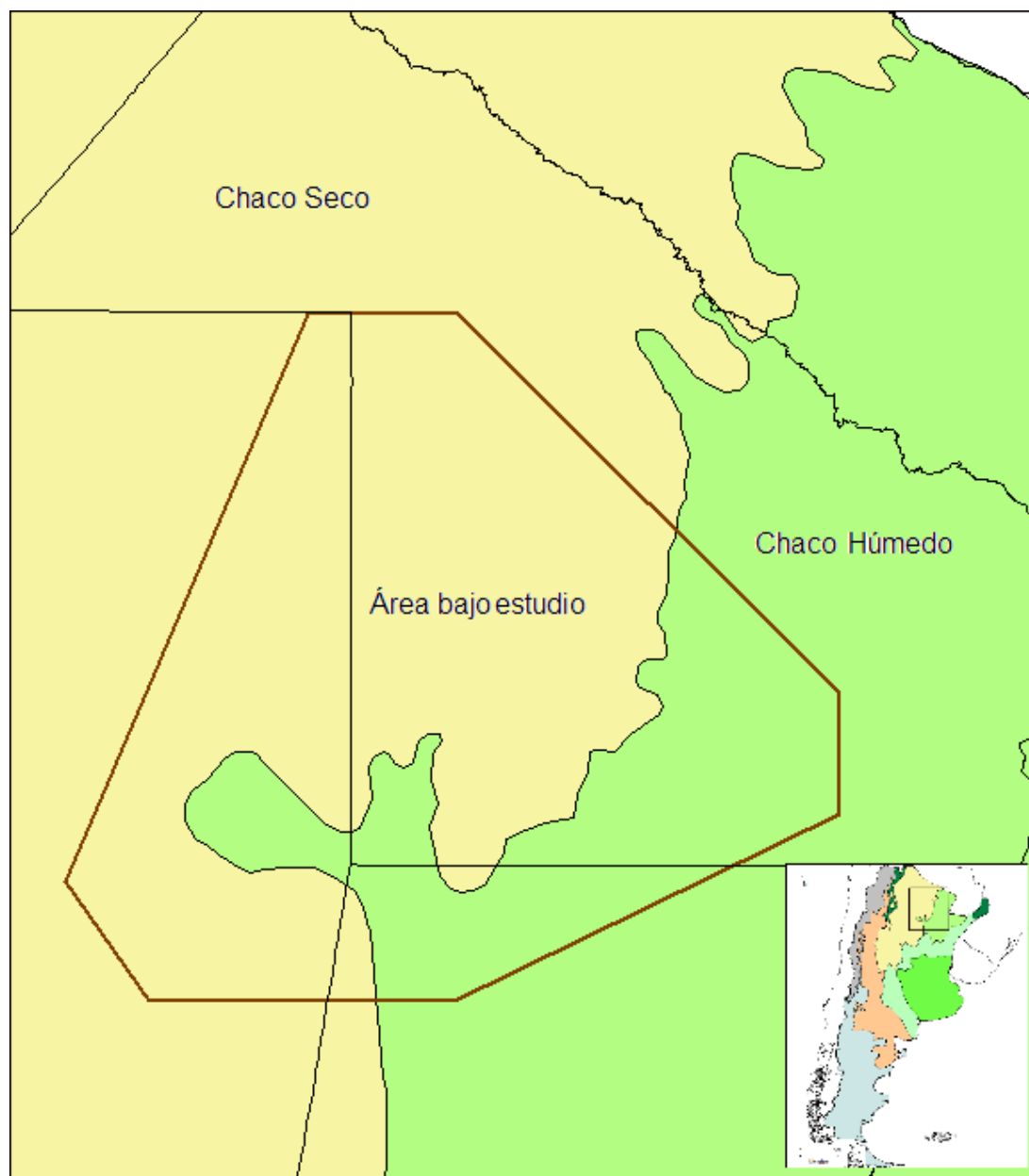


Figura 5. Eco-regiones del área de estudio. Modificado de Burkart y col. (1999)

CAPITULO 1:

Prevalencia, factores de riesgo y distribución espacial de *Babesia bigemina* en establecimientos ganaderos del sudoeste del Chaco

INTRODUCCIÓN

Los estudios observacionales se utilizan para identificar factores de riesgo y para estimar el efecto cuantitativo de las variables que contribuyen a la ocurrencia de una enfermedad o evento. Los estudios transversales son estudios observacionales que implican la selección previa de unidades de muestreo, la determinación simultánea de la presencia o ausencia de enfermedad (prevalencia) y la presencia de hipotéticos factores de riesgo para todas las unidades de muestreo analizadas (Thrusfield, 2007).

En el caso de las babesiosis interesa, además de la prevalencia, la frecuencia de transmisión, ya que si ésta es adecuada para asegurar que todos los terneros se infecten durante el periodo de resistencia innata, la babesiosis clínica será mínima y se habrá alcanzado un estado de estabilidad enzoótica (EE). Por el contrario, si una proporción importante de los terneros no se infecta durante el periodo de inmunidad innata, el rodeo se encontrará en una situación de inestabilidad enzoótica (IE). En este caso existe riesgo de brotes ya que los animales tendrán contacto con los patógenos luego del año de edad, cuando son altamente susceptibles a la enfermedad clínica (de Vos y Potgieter, 1983; Mahoney y Ross, 1972). La frecuencia de transmisión se puede estimar por un modelo matemático simple mediante el cálculo de la tasa de inoculación (h) (Mahoney, 1973; Mahoney y Ross, 1972), definida como la proporción de la población de terneros diariamente infectada (Macdonald, 1950). La tasa de inoculación relaciona la prevalencia del patógeno con la edad del rodeo y tiene cierto valor predictivo, ya que indica qué proporción del rodeo recibirá un inóculo antes de perder la resistencia innata si las condiciones de transmisión permanecen constantes (Mahoney, 1973) y permite valorar de forma indirecta el riesgo de ocurrencia de brotes (FAO, 1988).

La tasa de inoculación es la consecuencia de una compleja interacción de factores que involucra a las condiciones ambientales para el desarrollo de poblaciones de garrapatas, el nivel de resistencia a las garrapatas de los biotipos bovinos y factores de manejo tales como esquemas de

control de ectoparásitos, carga animal por unidad de superficie y tipo de pasturas (Guglielmo, 1992a).

En Argentina se han realizado estudios transversales de importancia regional en forma casi exclusiva para *B. bovis* (Guglielmo y col., 1997a; Habich y col., 1982; Späth y col., 1987). Estos trabajos se llevaron adelante en diferentes regiones del noroeste argentino (Guglielmo, 1992b), donde se detectaron situaciones de inestabilidad bajo distintas condiciones productivas o de manejo. Por otro lado estudios puntuales en la provincia de Corrientes (Vanzini y col., 1999) determinaron situaciones de inestabilidad enzoótica en establecimientos donde luego se produjeron brotes de importancia. El único estudio transversal en el sudoeste del Chaco, realizado en 33 establecimientos, determinó que el 18% de los rodeos estudiados se encontraban en una situación de estabilidad endémica para *B. bigemina* mientras que en el restante 82% de los rodeos existía un alto riesgo de brotes por este patógeno (Mastropaolo y col., 2009b). El 66,6% de los productores consultados en dicho trabajo manifestaron que las enfermedades transmitidas por garrapatas eran un problema sanitario relevante en sus rodeos.

Los objetivos de este capítulo fueron determinar de manera indirecta el riesgo de ocurrencia de brotes de *B. bigemina* en rodeos del sudoeste del Chaco mediante la determinación de la tasa de inoculación, explorar la interacción entre factores de manejo y el estatus epidemiológico de los rodeos y evaluar el grado de asociación espacial y la existencia de agregaciones espaciales para rodeos con el mismo estatus epidemiológico en el área estudiada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron 2072 muestras de suero de terneros de 47 establecimientos ganaderos del sudoeste de la provincia del Chaco, noreste de la provincia de Santiago del Estero y norte de Santa Fe, distribuyéndose en los siguientes departamentos: Chaco) Almirante Brown (n: 11), Independencia (n: 2), General Belgrano (n: 1), 9 de Julio (n: 1), O'Higgins (n: 3), 12 de Octubre (n: 1), San Lorenzo (n: 3), Tapenagá (n: 3), Mayor L. J. Fontana (n: 8); Santiago del Estero) Copo (n: 1), Alberdi (n: 1), Moreno (n: 7), Juan F. Ibarra (n: 3), General Taboada (n: 1); Santa Fe) 9 de Julio (n: 1). Los establecimientos se seleccionaron por conveniencia (Thrusfield, 2007) de acuerdo a la disposición de los propietarios para colaborar y presencia de infraestructura mínima para la recolección de las muestras. En cada establecimiento seleccionado se completó una encuesta relativa a las características del rodeo y al manejo del mismo. Las muestras de sangre se procesaron mediante una prueba de ELISA indirecto y la información obtenida mediante las encuestas se volcó en una base de datos para su análisis estadístico. Para cada rodeo se tomaron además las coordenadas geográficas, información que fue utilizada en un análisis de estadística espacial.

TOMA DE MUESTRAS

En cada establecimiento se tomaron muestras de sangre entera por punción de la vena yugular de terneros de entre 4 y 9 meses de edad. La cantidad de terneros muestreados en cada establecimiento se definió de acuerdo al número total de terneros de cada rodeo: 20 si la población total fuera menor a 40 terneros y el 50% si el rodeo tuviera entre 40 a 200 terneros. Para el caso de rodeos de más de 200 terneros se tomaron un máximo de 100 muestras. Las muestras fueron colectadas en tubos de 5 ml y transportadas refrigeradas al laboratorio Parasitología e Inmunología de la EEA Rafaela del INTA. En el laboratorio se centrifugaron las muestras para separar el suero, que fue almacenado a -20° C en tubos individuales hasta su procesamiento.

ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA).

Las muestras de suero fueron sometidas a una prueba de ELISA indirecto basado en extractos proteicos derivados de la cepa BbiS1A de *B. bigemina* multiplicada *in vitro*, con >50% de los eritrocitos parasitados. El cultivo completo se incubó a 4° C en una atmósfera normal durante 6 h para

lograr parásitos libres y se centrifugó a 1200 xg durante 10 min. El sobrenadante fue recuperado y centrifugado a 3000 xg durante 20 min. El sedimento resultante fue resuspendido y lavado tres veces en PBS 0.015 M pH 7,4 utilizando las mismas condiciones de centrifugación. La última suspensión (1:50) fue sonicada tres veces 15 seg (VircoSonic 300®) y centrifugada a 12.000 xg durante 60 min. Se colectó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteína en un espectrofotómetro a 280 nm y se llevó a 0,800 (\pm 0.050) $\mu g/\mu l$. El antígeno fue preservado en alícuotas a $-20^{\circ}C$, hasta su uso. Cada partida de antígeno fue estandarizada con un panel de sueros de bovinos infectados con *B. bigemina* (n=88), con *B. bovis* (n=44) y de bovinos no infectados por *Babesia* spp. (n=44). Para la prueba se utilizaron placas de ELISA de 96 pocillos con fondo plano (COSTAR-3590®). La primer columna se destinó para cuatro controles por duplicado, un control positivo fuerte, un control positivo débil, un control negativo (Echaide y col., 1993; Guglielmone y col., 1997b) y un control de conjugado, sin suero.

Las placas se sensibilizaron con el extracto proteico de merozoitos de la cepa BbiS1A diluido 1:100 en solución 0,05 M carbonato/bicarbonato pH 9,6, durante 12 h a temperatura ambiente y se mantuvieron a $-20^{\circ}C$ hasta su uso. Las placas se descongelaron a $37^{\circ}C$ durante 40 min y después de eliminar el contenido se bloquearon con 20 % de leche descremada en 0,05 M carbonato/bicarbonato, pH 9,6, a $28^{\circ}C$ durante 35 min. Luego de cuatro lavados con 0.01 M PBS- 0.2% Tween-20 (PBS-T), se agregaron 200 μl de los sueros problema y sueros controles diluidos 1/10 en PBS/0,075 M EDTA/EGTA pH 6,3 y se incubaron a $25^{\circ}C$ durante 30 min en agitación. Se realizaron cuatro lavados con PBS-T para eliminar los anticuerpos no unidos y minimizar reacciones inespecíficas. Luego se agregó el conjugado compuesto por un anticuerpo monoclonal (M23) anti-IgG bovina unida a la peroxidada (Nielsen y col., 1996) diluido 1/1000 en solución PBS-T, y se incubó a $25^{\circ}C$ durante 40 min en agitación. Luego de cuatro lavados, se agregó 100 μl del sustrato-cromógeno compuesto por agua oxigenada (H_2O_2) y ácido 2'2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico] (ABTS) y las placas se incubaron en agitación para realizar una lectura dinámica a 405 nm en un lector de ELISA (Labsystem Multiskan ®). La primera lectura se realizó a los 4 min utilizando el programa SPEIA 1.03 (© W. Kelly, Agriculture Canada, 1998) que calcula el tiempo necesario para que el C++ alcance una densidad óptica (DO) de 1.0 para realizar la lectura final. Los resultados se expresaron en porcentajes de positividad (PP) según la siguiente fórmula

PP= DO muestra x100/DO C++

Se trabajó con un punto de corte móvil según la estandarización de cada partida de antígeno con el panel de sueros conocidos para optimizar la sensibilidad ($\geq 95\%$) y especificidad ($\geq 95\%$) de la prueba. Para este trabajo se utilizaron dos partidas de antígenos de *B. bigemina* con puntos de corte de 35% y 28% respectivamente. Las muestras se consideraron positivas cuando su PP fue igual o superior al punto de corte y negativas cuando fue inferior.

PREVALENCIA REAL Y TASA DE INOCULACIÓN

La prevalencia real de *B. bigemina* para cada establecimiento se obtuvo según la siguiente fórmula (Lew y Levy, 1989):

$$\pi' = \frac{(d + S_p - 1)}{(S_e + S_p - 1)} \quad d = \frac{\int_{1-S_p}^{S_e} p^{x+1} * (1-p)^{n-x} dp}{\int_{1-S_p}^{S_e} p^x * (1-p)^{n-x} dp}$$

Donde π' representa el estimador de la prevalencia real de la enfermedad, d representa la proporción de sujetos detectados como positivos por la prueba empleada (prevalencia aparente), p representa la proporción de pruebas positivas asociada a cada punto del intervalo de $(1-S_p)$ a S_e , n es el número de casos evaluados, x es el número de casos positivos a la prueba evaluados. El procedimiento matemático de integración se realizó dividiendo el rango definido por la función en intervalos suficientemente pequeños para lograr una buena estimación del área bajo la curva estudiada (Stewart, 2005) utilizando el software R (<http://www.r-project.org/>) y se detalla en el apéndice II.

El valor de prevalencia real obtenido se usó para reemplazar I en la fórmula de cálculo de h :

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

donde h es la tasa de inoculación, definida como la proporción de la población diariamente infectada (Macdonald, 1950), I es la prevalencia real de la infección y t representa la edad en días de los animales. De acuerdo al valor obtenido de h , los rodeos se clasificaron en EE = $h \geq 0,005$, IE de alto riesgo = $0,0005 < h < 0,005$, o IE de bajo riesgo = $h < 0,0005$, siguiendo el criterio enunciado por Mahoney y Ross (1972). Para los análisis estadísticos y espaciales las situaciones de inestabilidad se unificaron, considerándose los rodeos que presentaron un valor de h inferior a 0,005 en una situación de inestabilidad enzoótica.

ENCUESTAS

Para cada tropa de la que se obtuvieron muestras se completó una encuesta diseñada en base al formulario propuesto por Guglielmone (Guglielmone, 1991a) (apéndice III). La encuesta se estructuró en 29 preguntas de tipo cerradas o semi-cerradas (Houe y col., 2002) concernientes a la estructura y al manejo del rodeo. La información obtenida se volcó en una planilla de cálculo donde se ordenó para su análisis estadístico.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables categóricas derivadas de las encuestas y utilizadas para el análisis fueron las siguientes: 1) Tipo de explotación (ganadera, agrícola-ganadera), 2) Otro ganado (si / no) 3) Biotipo de ganado bovino (< 49%, >50 % *Bos indicus*), 4) Forraje (pasturas permanentes, combinaciones de pasturas permanentes con pasturas anuales y/o suplementación), 5) Anegamiento (todos los años, algunos años, nunca), 6) Uso de acaricidas (si / no), 7) Uso de baño de inmersión (si / no), 8) Método de aplicación del acaricida (baño de inmersión, derrame dorsal *Pour On*, endectocidas, combinaciones). Además se consideraron como variables continuas: 9) superficie, 10) animales /ha, 11) cantidad de tratamientos garrapaticidas anuales.

La evaluación de la asociación entre los factores de riesgo (variables independientes incluidas en la encuesta) y el estatus epidemiológico de los rodeos dicotomizado en EE e IE (variable dependiente) se efectuó en dos etapas. En la primera, todas las variables independientes fueron comparadas con la presencia de EE o IE por medio de la Prueba de Chi-cuadrado (χ^2), Test Exacto de Fisher o t-student según el tipo de variable independiente (análisis bivariante). Antes de realizar el

análisis multivariante se analizó la existencia de colinealidad calculando la correlación entre pares de variables usando el coeficiente de correlación de Spearman. Cuando dos potenciales factores de riesgo se encontraron altamente correlacionadas (coeficientes de correlación $>0,6$), solamente se ofreció al modelo de regresión logística aquella variable con menor valor de p en el modelo bivariante. Sólo las variables asociadas con la variable dependiente luego del χ^2 con un $p < 0,20$ fueron ofrecidas, en una segunda etapa, a un modelo de regresión logística multivariante, utilizando como variable respuesta la presencia de EE o IE. El método de estimación fue el de las probabilidades máximas (*maximum likelihood*) con un criterio de convergencia de 0,01 para un máximo de 10 iteraciones. Las variables que resultaron no significativas a la regresión logística ($p > 0,05$) fueron excluidas del modelo saturado. El ajuste del modelo fue evaluado mediante estimación del estadístico de Hosmer-Lemeshow. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el paquete estadístico Infostat (Universidad Nacional de Córdoba).

ANÁLISIS ESPACIAL

La posibilidad de que diferentes niveles de transmisión de *B. bigemina* se relacionen con factores geográficos o espaciales se exploró en dos etapas. En primer lugar se realizaron tablas de contingencia como se describe en la sección anterior, utilizando como variables independientes: 1) Área de aptitud ecológica para garrapatas (Favorable, Intermedia, Desfavorable) de acuerdo a Guglielmone (1992b) y 2) región biogeográfica (Chaco semiárido, Chaco húmedo).

En segundo lugar, mediante el programa SatScan v8.1.1 se realizaron dos análisis puramente espaciales según el modelo de Bernoulli (Kulldorff, 1997), detectando agrupamientos con alta y baja frecuencia de casos, equivalentes a análisis estadísticos de una cola. El programa detecta los agrupamientos mediante la proyección de ventanas circulares sobre un mapa de distribución donde cada establecimiento es representado por un punto, y la comparación de los valores observados con los esperados en cada caso. Los puntos se definen como casos o controles. Las ventanas se proyectan centradas en las coordenadas definidas para cada punto, pero varían al azar en tamaño y ubicación para cada proyección. Un valor de p se obtiene mediante simulaciones de Monte Carlo. Para este trabajo se utilizaron 9999 réplicas y un nivel de significancia del 5%. Los establecimientos en EE fueron considerados casos y los establecimientos en IE fueron considerados controles. El

análisis con alta frecuencia de casos detecta entonces zonas con una alta concentración espacial de establecimientos en EE. El análisis con baja frecuencia de casos detecta zonas donde predominan los establecimientos en IE.

RESULTADOS

El 49 % (n 23) de los rodeos analizados se encontraban en una situación de EE al momento de realizar el estudio. Del restante 51% (n 24), que se encontraba en IE, el 34% (n 16) se ubicó en el área de IE de alto riesgo y el 17% remanente (n 8), en el área de IE de bajo riesgo.

Con respecto a las encuestas, no todos los cuestionarios fueron contestados en su totalidad, por lo que se presentan diferencias en el número de respuestas para cada variable considerada.

Un 75% (n 30) de los productores manifestaron la ocurrencia de brotes de “tristeza” en su establecimiento durante el último año. De estos, el 86% (n 24) reconocen que los animales enfermos provenían del mismo establecimiento o de zona de control (zona sucia) de garrapatas, mientras el 14 % (n 4) provenían de zona indemne. Veinticinco por ciento de los rodeos (n 10) no sufrieron brotes de “tristeza”. Solamente el 26% (n 8) de los rodeos que sufrieron brotes contaban con diagnóstico de laboratorio, y de éstos, tres correspondieron a casos de babesiosis, sin información sobre la especie de *Babesia* diagnosticada.

De los establecimientos analizados, el 49% (n 22) eran exclusivamente ganaderos y el 51% (n 23), agrícola-ganaderos. La superficie media dedicada a la ganadería fue de 2369 ha, con un mínimo de 40 ha y un máximo de 24000 ha (mediana: 1350 ha). La cantidad media de animales por establecimiento sin contar las categorías menores de un año de edad fue de 1512 (IC 845-2178), con un mínimo de 30 y un máximo de 12900 animales por establecimiento (mediana: 754 animales por establecimiento). La carga animal media fue de 1,1 animales / ha, con un mínimo de 0,275 animales / ha y un máximo de 7,769 animales / ha (mediana: 0,81 animales / ha). El 56% (n 25) de los establecimientos contaban con otro ganado además de bovinos. Las otras especies presentes en los establecimientos fueron ovinos (5 rodeos), caprinos (11 rodeos) y equinos (12 rodeos). La cantidad media de estas especies fue de 37 (máx. 60, min. 15), 59 (máx. 100, min. 12) y 39 (máx. 50, min. 2) cabezas por establecimiento, respectivamente. Un 44% (n 20) de los establecimientos no contaban con otro ganado además del bovino. Ningún rodeo estuvo compuesto por razas puras de ganado europeo o índico. La proporción de genes índicos fue menor a 49% en el 73% (n 27) de los rodeos e igual o mayor a 50 % en el 27% (n 10) de los rodeos. El 47% (n 21) de los establecimientos contaban exclusivamente con pasturas permanentes como base forrajera. En estos casos las pasturas estuvieron compuestas por *Panicum maximum* cv. Gatton panic. Cincuenta y tres por ciento (n 24) de

los establecimientos utilizaban combinaciones de pasturas permanentes con pasturas anuales, solamente pasturas anuales o combinaciones de pasturas anuales, uso de rastrojos o suplementos de concentrados. En estos casos las pasturas permanentes estuvieron representadas mayormente por pastizales naturales o montes compuestos por especies nativas de la región, como se detalla en la descripción del área de estudio. De estos 24 establecimientos, cinco utilizaban rastrojos agrícolas en algún momento del año. El 20% (n 8) de los establecimientos sufrieron anegamientos parciales todos los años o algunos años mientras que el 80% (n 32) de los establecimientos nunca sufrieron anegamientos. El 96% (n 43) de los establecimientos usaba acaricidas para controlar la carga de garrapatas mientras que solamente el 4% (n 2) no utilizaba ningún tipo de control químico. El 51% (n 22) de los establecimientos contaba con baño de inmersión como método de aplicación de acaricidas mientras el 49% restante (n 21) no contaba con este recurso. De los establecimientos que usaban acaricidas, el 23% (n 10) los aplicaba exclusivamente mediante baños de inmersión, un 38% (n 16) lo hacía solamente por derrame dorsal, el 2% (n 1) utilizaba exclusivamente endectocidas inyectables y el 37% (16) utilizaba combinaciones de estas tres formas de aplicación. Los grupos químicos de acaricidas y la cantidad de establecimientos que utilizaba cada uno se muestran en la figura 1.1 La cantidad de tratamientos en el año varió desde un mínimo de 2 hasta un máximo de 12, con una media de 4 tratamientos anuales. La distribución mensual de los tratamientos se muestra en la figura 1.2.

Mediante el análisis bivariante se detectaron cuatro variables asociadas al estatus epidemiológico de los rodeos: OTRO GANADO, FORRAJE, BAÑO y SUPERFICIE. Estas fueron las variables que se incorporaron al análisis multivariante. Si bien la variable APLICACIÓN tuvo un valor de $p = 0,140$ se decidió no incorporarla al análisis multivariante debido a que algunas de sus categorías no se encontraban bien representadas. Se consideró a la variable BAÑO, con un nivel de significancia mayor ($p= 0,094$), como un indicador del tipo de tratamientos que se realizaban en el establecimiento.

Las frecuencias de las variables estudiadas en relación con el estatus de los rodeos y los resultados del análisis bivariante se muestran en la tabla 1.1., mientras que los resultados del análisis de regresión se muestran en la tabla 1.2.

ANÁLISIS ESPACIAL

La distribución espacial de los rodeos analizados en relación con las áreas de aptitud ecológica para *R. (B) microplus* (Guglielmone, 1992b) se muestra en la figura 1.3. No se encontró relación estadísticamente significativa en las tablas de contingencia entre el estatus epidemiológico de los rodeos y las áreas de aptitud mencionadas, así como tampoco con la distribución por regiones biogeográficas descritas por Burkart y col. (1999) (Tabla 1.3)

Cuando se exploró la existencia de agrupamientos espaciales de rodeos con EE mediante el análisis puramente espacial según el modelo de Bernoulli, no se detectaron agrupamientos estadísticamente significativos ($p= 0,972$). De la misma manera, no se detectaron agrupamientos significativos de rodeos con IE ($p= 0,144$).

Tabla 1.1 Frecuencias, proporciones y valor de p para las variables vinculadas al manejo de los rodeos en relación con el estatus epidemiológico de los mismos

a)	EE		IE		p
VARIABLES CATEGÓRICAS (n)	Frec	%	Frec	%	
1.EXPLORACIÓN					0,652
Ganadera (22)	12	54,5	10	45,5	
Agrícola-ganadera (23)	11	47,8	12	52,2	
2.OTRO GANADO					0,023
Si (25)	9	36,0	16	64,0	
No (20)	14	70,0	6	30,0	
3.PROPORCIÓN CEBÚ					0,809
< 49% (27)	15	55,6	12	44,4	
>50% (10)	6	60,0	4	40,0	
4.FORRAJE					0,051
Pasturas permanentes (21)	14	66,7	7	33,3	
Combinaciones (24)	9	37,5	15	62,5	
5.ANEGAMIENTO					0,228
Todos los años (2)	2	100,0	0	0,0	
Algunos años (6)	2	33,3	4	66,7	
Nunca (32)	19	59,4	13	40,6	
6.USO ACARICIDAS					0,974
Si (43)	22	51,2	21	48,8	
No (2)	1	50,0	1	50,0	
7.BAÑO					0,094
Si (22)	14	63,6	8	36,4	
No (21)	8	38,1	13	61,9	
8.APLICACIÓN					0,140
Inmersión (10)	5	50,0	5	50,0	
Derrame dorsal Pour-on (16)	5	31,3	11	68,8	
Endectocidas (1)	1	100,0	0	0,0	
Combinaciones (16)	11	68,8	5	31,3	
b)					
VARIABLES CONTINUAS	Media	DE	Media	DE	p
9.SUPERFICIE	3234,5	5243,1	1457,8	1768,7	0,169
10.CARGA ANIMAL AN/ha	1,3	1,7	0,9	0,5	0,440
11.TRATAMIENTOS ANUALES	4,23	2,2	4,16	1,5	0,908

EE: Estabilidad Enzoótica. IE: Inestabilidad Enzoótica. DE: Desvío Estándar. a) Las variables categóricas se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher. b) Las variables continuas se analizaron mediante la prueba t de Student. Los valores en negrita fueron considerados significativos.

Tabla 1.2 Análisis de regresión de las variables de manejo significativas en las tablas de contingencia

Variable	<i>p</i>	OR	IC
OTRO GANADO	0,733	1,335	
FORRAJE	0,094	0,269	(0,058-1,251)
BAÑO	0,239	0,363	
SUPERFICIE	0,690	1,000	

OR: Odds ratio. IC: intervalos de confianza.

Tabla 1.3 Análisis de contingencia de las variables vinculadas con la distribución geográfica de los establecimientos

VARIABLES CATEGÓRICAS (n)	EE		IE		<i>p</i>
	Frec	%	Frec	%	
APTITUD					0,188
Favorable (17)	7	41,2	10	58,8	
Intermedia (24)	11	45,8	13	54,2	
Desfavorable (6)	5	83,3	1	16,7	
ÁREA BIOGEOGRÁFICA					
Chaco semiárido (36)	18	50,0	18	50,0	0,792
Chaco húmedo (11)	5	45,5	6	54,5	

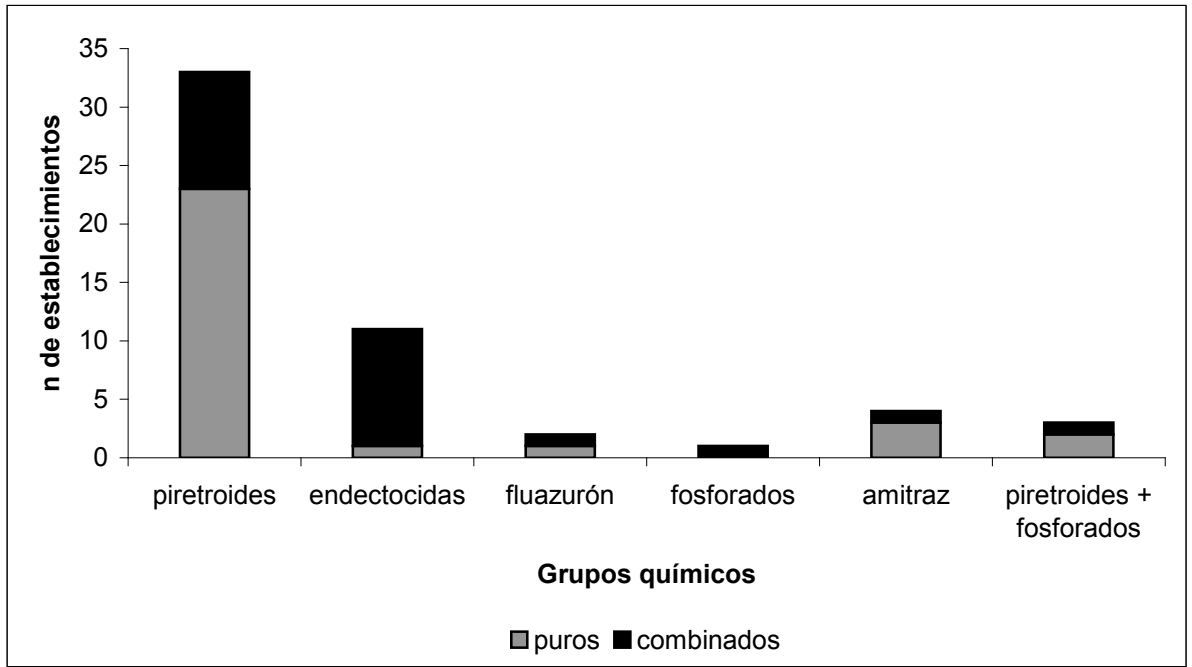


Figura 1.1 Grupos químicos de acaricidas utilizados y cantidad de establecimientos que utilizó cada uno.

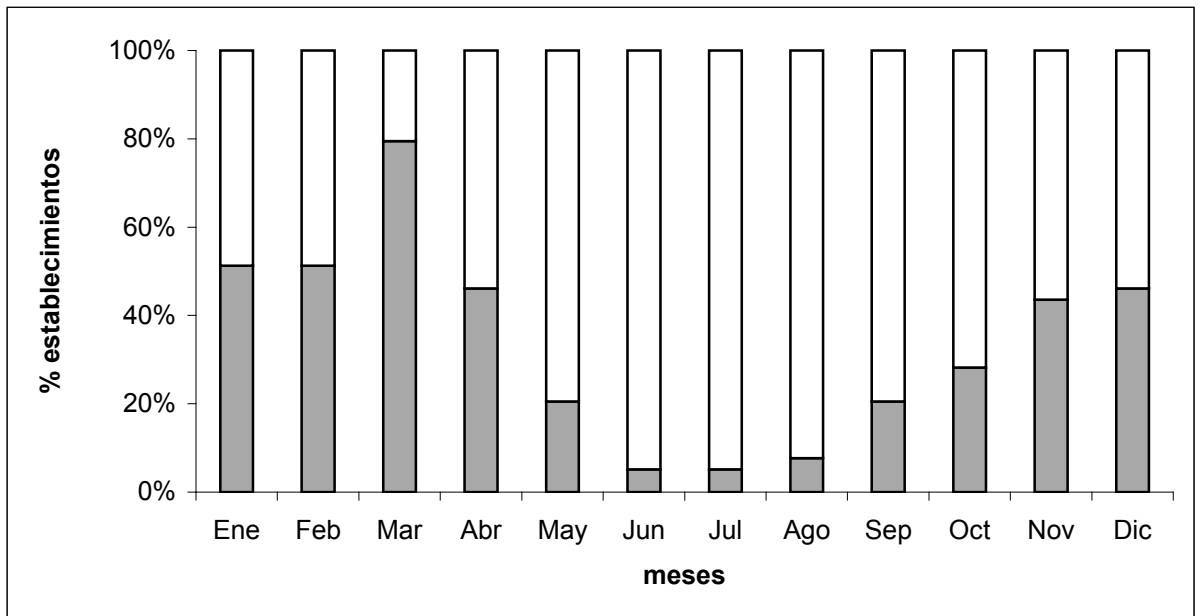


Figura 1.2. Proporción de establecimientos que realizaba tratamientos acaricidas en cada mes del año.

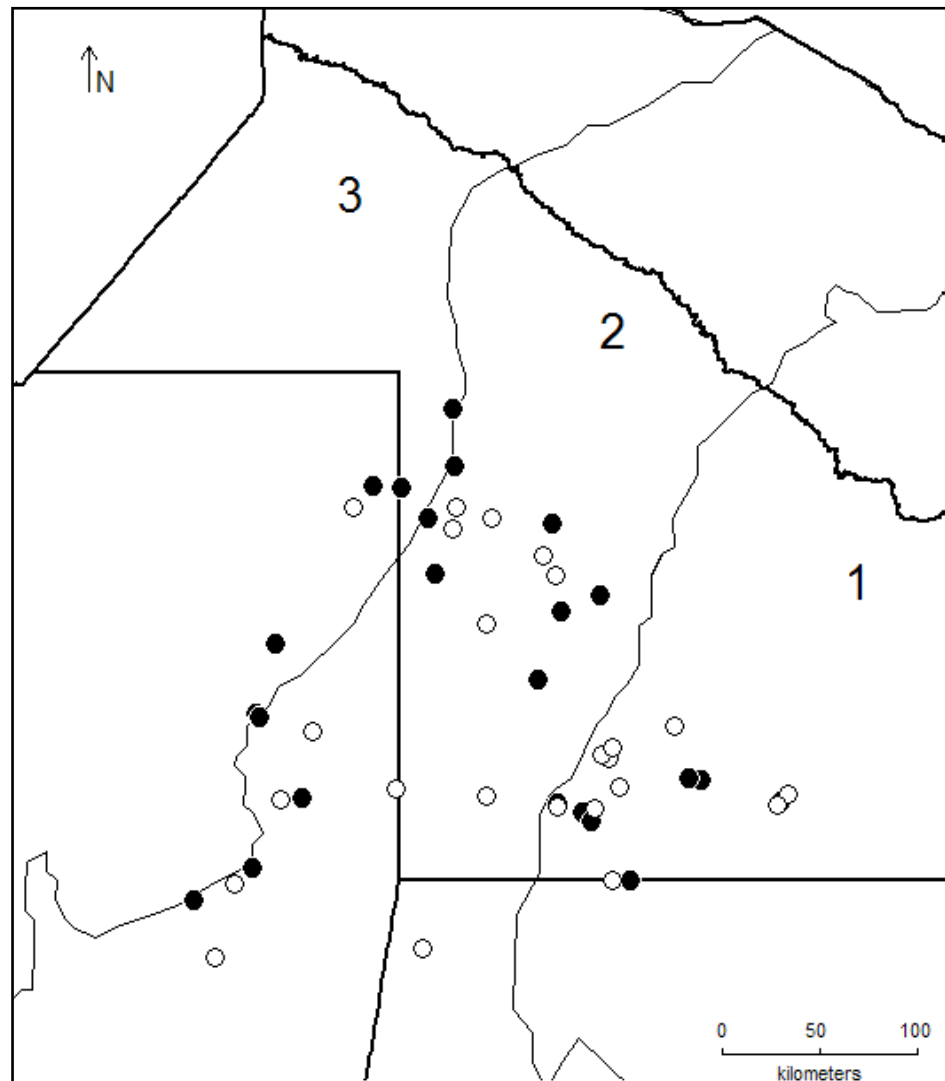


Figura 1.3 Distribución y estatus epidemiológico de los establecimientos analizados en relación con las áreas de aptitud ecológica para *R. (B) microplus* (Guglielmone, 1992b). Símbolos negros: estabilidad enzoótica, blancos: inestabilidad enzoótica. Aptitud ecológica 1: favorable, 2: intermedia, 3: desfavorable

DISCUSIÓN

Más de la mitad (51%) de los rodeos analizados en este trabajo se encontraban en IE en el momento de realizar el estudio, a pesar de estar localizados dentro del área de distribución de *R. (B.) microplus*. La proporción de establecimientos con estabilidad es mayor que la detectada en la región en 2003 (Mastropaolo y col., 2009b). La diferencia puede deberse a la mayor escala geográfica cubierta por el trabajo actual con respecto al anterior, pero también podría atribuirse a fluctuaciones temporales de la curva endémica por cambios en la tasa de inoculación de cada rodeo, como ocurre incluso en la zona de aptitud favorable para el desarrollo de *R. (B.) microplus* (Cetrá y col., 2000). Sin embargo aún se encontró una alta proporción de rodeos con riesgo de sufrir brotes de babesiosis por *B. bigemina*. Esta situación es coincidente con lo reportado por trabajos anteriores en las provincias de Corrientes (Cetrá y col., 2000; Vanzini y col., 1999), Tucumán (Aguirre y col., 1990), Salta (González de Ríos, 1987; Späth, 1986; Späth y col., 1987) y Catamarca (Guglielmone y col., 1997a), aunque para estas dos últimas provincias los resultados refieren principalmente a *B. bovis*. Trabajos realizados en Bolivia (Carrique Mas y col., 2000; Carrique y col., 2000) y Paraguay (Payne y Osorio, 1990) permiten suponer que la inestabilidad es un rasgo frecuente en los rodeos del Chaco Sudamericano.

Existe un gran volumen de trabajos publicados sobre prevalencias de babesiosis bovina en diferentes países de Sudamérica, lo que a primera vista permitiría una comparación más profunda entre los resultados del presente trabajo y los obtenidos en otras regiones o bajo diferentes sistemas de producción. Lamentablemente, por diferencias metodológicas eso no es posible. En primer lugar, para definir una situación de estabilidad o inestabilidad mediante el cálculo de la tasa de inoculación se deben obtener muestras de animales jóvenes, idealmente dentro del periodo de resistencia innata. En animales mayores los títulos de anticuerpos pueden caer en ausencia de reinfecciones, enmascarando situaciones de inestabilidad con riesgo en la población de terneros (Guglielmone, 1991a). El cálculo de la tasa de inoculación mediante la prevalencia serológica incluye a la edad como un factor intrínseco del modelo (Mahoney y Ross, 1972) y no debe ser estimado con muestras de animales adultos si se pretende evaluar el riesgo de ocurrencia de brotes (Barros y col., 2005; Madruga y col., 2001; Vidotto y col., 1997). Por otra parte son pocos los trabajos que analizan sus resultados en base a la prevalencia real, la cual puede ser sensiblemente diferente a la prevalencia

aparente (Karaagaoglu, 1999; Lew y Levy, 1989), dependiendo de la sensibilidad y especificidad de la prueba de diagnóstico utilizada (D'Andrea y col., 2006; de Souza y col., 2002; Guedes Junior y col., 2008). Los resultados expresados como tasa de inoculación estimada sobre la prevalencia real obtenida de animales jóvenes permitirían comparar los resultados obtenidos en cualquier región, independientemente de la prueba de diagnóstico utilizada.

La proporción de establecimientos que declararon tener problemas de “tristeza” fue superior a la proporción de establecimientos en IE. Como el síndrome “tristeza” incluye también a *B. bovis* y *A. marginale*, es posible que los problemas percibidos por algunos productores sean ocasionados por alguno de estos patógenos, que no se evaluaron en el presente trabajo. En este sentido resulta notoria la baja proporción de establecimientos que recurrieron al diagnóstico de laboratorio para confirmar el diagnóstico de los brotes, aún considerando a la “tristeza” como un problema relevante para la explotación. Dentro de los rodeos en IE, 16 de ellos estaban en una situación de IE de alto riesgo y 8 en IE de bajo riesgo. Esto puede explicar porqué algunos establecimientos no manifestaron tener problemas de “tristeza” a pesar de estar en una situación inestable. A los fines del análisis estadístico ambas situaciones se unificaron ya que se consideró de poco valor práctico discriminar entre una situación de inestabilidad de alto riesgo y una de bajo riesgo, al menos para las condiciones de la ganadería en la región bajo estudio. Si bien se considera que una tropa en IE de bajo riesgo no sufrirá brotes mientras las condiciones que llevaron a ella no se modifiquen, esta tropa estará absolutamente desprotegida en caso de traslado a otro establecimiento con dinámicas de transmisión diferentes, lo que ocurre normalmente con todos los animales machos y el excedente de hembras de reposición de los campos de cría (Rossanigo y col., 2012). Una gran proporción de los productores encuestados en el presente trabajo manifestaron que los brotes de tristeza se produjeron en animales provenientes de zona endémica de *R. (B). microplus*, que enfermaron luego de arribados al establecimiento, lo que indica que esto no es una situación infrecuente.

Como se puede inferir de la caracterización de los establecimientos mediante la información obtenida por los cuestionarios, las características de producción no son homogéneas en la región estudiada, encontrándose desde establecimientos pequeños dedicados a la cría extensiva sobre pastizales naturales y monte hasta grandes emprendimientos agrícola-ganaderos de ciclo completo sobre la base de pasturas implantadas y suplementación.

Del análisis estadístico del estatus epidemiológico de los rodeos con relación a diferentes variables de manejo se desprende que la transmisión de *B. bigemina* no estuvo relacionada con el tipo de explotación, ya sea ganadera o agrícola-ganadera. Estudios anteriores realizados en Salta asociaban la actividad agrícola con una menor tasa de inoculación, debido al uso de pasturas anuales y rastrojos de cosecha para la alimentación del ganado (Späth, 1986). Estos recursos forrajeros se consideran libres de larvas de garrapatas debido al laboreo necesario para la implantación de los mismos (Guglielmone, 1987). En el sudoeste del Chaco, sin embargo, se observó una separación muy clara entre la superficie agrícola y la superficie ganadera. Si bien en los establecimientos agrícola-ganaderos una parte o la totalidad del producto agrícola se destina a la alimentación del ganado, esto se realiza en forma de forrajes conservados y no de pastoreo directo. Solamente en 5 establecimientos se utilizaron rastrojos como recurso nutricional. Es posible que esto sea debido a diferencias regionales pero también a la adopción en los últimos años de la técnica de siembra directa, para cuya correcta aplicación se desaconseja el pastoreo de los rastrojos.

Tampoco se encontró relación entre la tasa de inoculación y la proporción de cruzamiento con razas índicas. Los rodeos estudiados en este trabajo estuvieron compuestos por cruzamientos Braford o Brangus $3/8$, $1/2$ y $5/8$, o alguna de estas cruzas con ganado criollo. Se ha postulado que la incorporación de razas índicas en la composición genética de los rodeos disminuye la tasa de inoculación y aumenta el riesgo de brotes de babesiosis (Guglielmone, 1994; Guglielmone, 1995; Späth y col., 1987). Esto se debe, por un lado, a que las razas índicas y sus cruzas son más resistentes a la infestación por garrapatas que las razas británicas y esta resistencia es directamente proporcional al grado de cruzamiento (Guglielmone y col., 1990b) lo que determina menores tasas de inoculación en una proporción similar (Aguirre y col., 1990). Por otro lado, si bien son más resistentes a la parasitación por garrapatas, los animales *Bos indicus* son susceptibles a la enfermedad causada por *B. bigemina* (Parker y col., 1985; Schiffo y Lombardero, 1964), por lo que pueden desarrollar un cuadro clínico si se exponen a condiciones que determinen una mayor transmisión una vez terminado el periodo de resistencia innata. Es probable que en el momento de la introducción y difusión de las razas índicas en la región se hayan producido cambios en la tasa de inoculación de los rodeos de la zona, aumentando la inestabilidad y el riesgo de brotes (Guglielmone, 1995). Esto no aparenta ser un factor determinante en la actualidad, ya que diferentes rodeos alcanzaron la estabilidad

independientemente de la proporción de genes índicos, probablemente debido a que los niveles de cruzamiento utilizados permiten una carga de garrapatas suficiente para alcanzar la estabilidad (Guglielmone y col., 1992b).

Se evaluaron cuatro variables relativas a control químico de garrapatas (uso de acaricidas; uso de baño de inmersión; método de aplicación del acaricida; cantidad de tratamientos anuales). Sin embargo, ninguna resultó significativamente asociada con el estatus epidemiológico de los rodeos, excepto la presencia de baño, que estuvo relacionada en forma inversa a la esperada, es decir, que los establecimientos que poseían baño tuvieron mayores probabilidades de estar en EE que los que no los tenían baño. Probablemente esta relación esté enmascarando otra situación. Esto se pone en evidencia al observar la variable aplicación, ya que los campos que usaban baño de inmersión como única forma de aplicación, se encontraron uniformemente distribuidos entre los estatus EE e IE. El baño de inmersión es el método de aplicación más efectivo y económico, pero requiere de una inversión inicial de infraestructura considerable (FAO, 1988). Es probable que los establecimientos que cuentan con este recurso sean aquellos en que las poblaciones de garrapatas alcanzan los mayores niveles, comparativamente. El espectro de principios activos y los niveles de utilización de cada uno fueron similares a los detallados en estudios previos para la región (Guglielmone y col., 2007). Ni el uso de acaricidas ni la cantidad de tratamientos resultaron significativos. En la figura 1.2 se puede observar que la mayoría de los establecimientos hace tratamientos en otoño en coincidencia con los picos poblacionales de garrapatas descritos para la zona (Mangold y col., 1985; Mangold y col., 1987). Los tratamientos en esta época del año no ejercen un control efectivo sobre las poblaciones de garrapatas (Nari, 1995). La media de la cantidad de tratamientos resultó ligeramente superior en los establecimientos con EE, es decir que los campos que más tratamientos hicieron mostraron mayores niveles de transmisión del patógeno. El hecho de que los campos alcanzaran la estabilidad independientemente del uso de acaricidas y de la cantidad de tratamientos indica que el control de garrapatas no fue efectivo (de Vos y Potgieter, 1983). No se descarta la existencia de casos donde se hubiera subdosificado o de resistencia a los acaricidas no detectados.

La variable anegamiento no estuvo bien representada en algunas de sus categorías, por lo que no se pueden sacar conclusiones por los resultados de este estudio. El anegamiento de los campos puede ser un factor que modifique negativamente las condiciones de aptitud ecológica para el

desarrollo de poblaciones de garrapatas (Guglielmone, 1992b). Sin embargo es notorio que los dos establecimientos que sufrieron anegamientos anuales se encontraban en EE.

No se encontró relación entre la carga medida en animales por ha y el estatus epidemiológico de los rodeos. La carga animal, definida como densidad de hospedadores en estudios ecológicos, es un factor determinante en el mantenimiento y dispersión de patógenos (Anderson y May, 1979), y de manera particular en enfermedades transmitidas por vectores (Knell y col., 1998; Smith, 1984). La falta de asociación puede deberse a que la información obtenida por las encuestas refiere a la cantidad total de animales sobre la superficie ganadera del establecimiento, pero no refleja la carga instantánea, es decir, la cantidad de animales con que se pastorea un lote determinado, lo que a su vez determina la cantidad de larvas de garrapatas que encontrará un hospedador (Guglielmone, 1994). Quizás esta variable esté absorbida por tipo de forraje, como se comentará mas adelante.

En relación con la superficie, los establecimientos que alcanzaron la estabilidad resultaron, en promedio, de mayor extensión que los establecimientos en inestabilidad y para esta relación se comprobó asociación estadística. Esto contrasta con lo reportado por Mastropaolo y col. (2009a) quienes, en un estudio de los factores relacionados con la epidemiología de la babesiosis en el sudoeste del chaco determinaron que los establecimientos de menor extensión eran más propensos a alcanzar una situación de estabilidad. Aparentemente, a menor superficie, mayor carga animal por ha, aunque esto no reflejaría la carga instantánea. En el presente trabajo el uso de pasturas permanentes (Gatton panic), que se pastorean con altas cargas instantáneas, fue mayor en los establecimientos más grandes. Las diferencias entre ambos resultados podrían deberse a las distintas escalas geográficas del área de muestreo, o a que los establecimientos analizados en el trabajo anterior fueron, en promedio, más pequeños que los del trabajo actual (Mastropaolo y col., 2009b).

Otra variable que resultó significativamente asociada en el análisis bivariado fue la presencia de otro ganado. Los establecimientos con otro ganado además del bovino fueron más proclives a la inestabilidad. La interacción de ganado bovino con rebaños ovinos de escala comercial en los mismos establecimientos fue considerada como un factor causante de IE en el sur de Brasil (Martins y col., 1994). En el presente estudio, sin embargo, ninguno de los establecimientos que respondió afirmativamente a la presencia de otro ganado tenía tropas comerciales, sino mas bien pequeñas majadas o piaras para consumo interno, o comercialización local a baja escala. Doce

establecimientos declararon tener caballos como otro ganado, aunque algunos de ellos en cantidades mínimas. Si bien los otros 35 establecimientos no declararon ganado equino, es probable que se deba a una mala interpretación de las encuestas, ya que es virtualmente inexistente una explotación ganadera sin caballos de trabajo en la región. En estas condiciones, se considera que esta variable puede estar enmascarando otra situación asociada con el manejo o la escala de los establecimientos, aunque la interpretación permanece oscura.

La utilización de pasturas permanentes, como categoría de la variable forraje, estuvo significativamente asociada a situaciones de EE en el análisis bivariado, pero además fue la variable con el menor valor de p en el análisis de regresión, donde se incluyeron además otro ganado, baño y superficie. Si bien en el análisis de regresión la variable forraje no alcanzó un valor de p significativo (0,094) al nivel de significancia utilizado, existen razones para inferir que ésta sería una variable de alta relevancia en la epidemiología de *B. bigemina* en la región estudiada. Ya se ha comentado, en la discusión relativa al tipo de explotación, el efecto nocivo sobre las poblaciones de garrapatas que tienen las pasturas anuales y los rastrojos. Sin embargo, la mayoría de los establecimientos que utiliza estos recursos los combina con pastizales naturales y/o monte, donde las poblaciones de garrapatas si pueden desarrollarse normalmente. La pastura permanente implantada mas utilizada fue el Gatton panic. El efecto positivo de esta pastura sobre la transmisión de babesias, en contraposición con los pastizales naturales y el monte, podría atribuirse a dos causas relacionadas principalmente con la abundancia de garrapatas. La primera sería que las pasturas de Gatton panic, que tienen un crecimiento explosivo en la temporada de lluvias, con una producción muy abundante de materia verde, podrían generar un ambiente favorable para la supervivencia de larvas de *R. (B) microplus*, manteniendo una humedad relativa ambiente alta, atenuando las temperaturas y protegiendo a las larvas de los efectos de la radiación solar directa. Sin embargo, en un estudio realizado en la misma región analizada en este trabajo, se determinó que no hay diferencias en la longevidad de las larvas y en la totalidad de la fase de vida libre de *R. (B.) microplus* que se desarrolla en pasturas de Gatton panic o en monte nativo (Nava y col., 2013), por lo tanto esta hipótesis debe ser descartada. La otra causa posible sería que las pasturas de Gatton panic toleran cargas instantáneas muy superiores a las pasturas naturales nativas y al monte. De esta manera, la variable forraje podría estar enmascarando la carga instantánea. El pastoreo con altas cargas permite

por un lado que una alta proporción de las larvas que esperan en la pastura encuentre un hospedador, pero además que el periodo de espera de las larvas sea mínimo, lo que asegura su supervivencia y la de las babesias que las infectan (Hodgson, 1992). Se ha demostrado que los bovinos pueden evitar el contacto con plantas en las que se encuentran cúmulos de larvas de garrapatas (Sutherst y col., 1986), comportamiento que probablemente se vea modificado por la menor selectividad que pueden expresar los bovinos en una situación de mayor presión de pastoreo. Esta posibilidad coincide con lo expuesto por Smith (Smith, 1984), quien sobre la base del modelado de la transmisión de *B. bovis*, concluye que la tasa de inoculación es muy sensible a los cambios en el éxito de hallazgo de hospedador por parte de las larvas de garrapatas y sugiere que pequeños cambios en la carga instantánea tienen un fuerte impacto en la transmisión de ese patógeno.

Por otro lado, las pasturas de Gatton panic frecuentemente se manejan con clausuras temporarias para reservar heno en pie. Esto, al igual que la rotación de pasturas y la utilización de pasturas anuales y rastrojos, ejerce un efecto de control sobre las poblaciones de garrapatas (Wharton y col., 1969; Wilkinson, 1957; Wilkinson, 1964). Un examen de la utilización de los recursos forrajeros indica que los campos que usaron pasturas anuales y rastrojos o suplementación con concentrados fueron en su mayoría las explotaciones agrícola-ganaderas, por lo que desde este punto de vista cobra importancia tener en cuenta el tipo de explotación de origen cuando se considere el estatus epidemiológico de una tropa.

Las condiciones ecológicas y el tipo de ambiente son factores de importancia en la transmisión de babesias (Carrique Mas y col., 2000; Rubaire-Akiiki y col., 2004), principalmente por su efecto sobre las poblaciones de garrapatas (Guglielmone, 1992b; Guglielmone, 1994). Mediante la exploración de las variables relacionadas con la distribución geográfica de los establecimientos no se encontraron asociaciones entre la tasa de inoculación y la región biogeográfica ni las áreas de aptitud ecológica para las poblaciones de garrapatas. Como se observa en la figura 1.3, los establecimientos en EE se encontraron uniformemente distribuidos en las 3 zonas de aptitud ecológica evaluadas. Probablemente esto se deba a que en la región estudiada no se vea un contraste definido entre ambientes, sino más bien una extensa área de ecotonía entre el chaco seco y el chaco húmedo, como se ha mencionado en la descripción del área de estudio. Esta área de ecotonía está sometida a condiciones climáticas muy variables, lo que afecta obviamente a las áreas de aptitud ecológica, que

en esta región no tienen límites definidos sino que varían con los años, por ejemplo, ampliando la zona de aptitud intermedia. Tampoco se encontraron agrupamientos que indiquen regiones con diferentes frecuencias de transmisión. Esto indica que la variación estaría explicada por factores no estructurados espacialmente, como serían los factores de manejo (Wakefield y Shaddick, 2006), que presentan grandes diferencias dentro de una misma región. También podría ocurrir que exista una estructura espacial más compleja que el algoritmo utilizado no llega a captar. Un análisis a mayor escala geográfica sería de utilidad para evaluar tanto el comportamiento de la tasa de inoculación en ambientes más contrastantes, como la ausencia de agregación espacial y la preponderancia de los factores de manejo sobre los factores espaciales.

Considerar la epidemiología de la enfermedad a una escala regional es de utilidad para evaluar si un rodeo podría alcanzar o no la estabilidad bajo condiciones de manejo apropiadas para una región determinada. Por los resultados de este estudio es evidente que los rodeos pueden alcanzar la EE en cualquiera de los ambientes evaluados. Por otro lado, considerar la situación epidemiológica de un rodeo solamente por su ubicación geográfica es caer en una falacia ecológica (Thrusfield, 2007). Se define como falacia ecológica a la inferencia realizada sobre individuos basándose en estudios ecológicos (Piantadosi y col., 1988). Incluso en el área favorable para el desarrollo de garrapatas el estatus epidemiológico de un rodeo estará condicionado por factores de manejo que afecten la ecología del vector en ese establecimiento en particular. En este sentido, los estudios epidemiológicos de babesiosis deberían considerar como unidad de muestreo al rodeo y no a la región (Carrique Mas y col., 2000). En caso contrario se incurriría en otra falacia ecológica, detectada en numerosos estudios realizados en Sudamérica, en los que se habla de regiones de estabilidad o inestabilidad enzoótica. Un ejemplo claro es el trabajo de Payne y Osorio (1990), en Paraguay, donde realizaron muestreos a escala de rodeos, pero expresan la prevalencia a escala regional, concluyendo que el país se encuentra en una situación de estabilidad para babesiosis y anaplasmosis. Del análisis de las figuras del mismo trabajo, donde se describe en forma gráfica la situación de cada establecimiento muestreado se puede inferir que esta conclusión debe ser considerada con cautela, ya que muchos de los rodeos ubicados en la zona más seca del país se encontraban en IE. Considerar que una región es estable puede tener consecuencias graves ya que induce a no adoptar medidas de prevención para atenuar las pérdidas producidas por estos

patógenos cuando se desplazan rodeos a zonas con diferentes dinámicas de transmisión (Guglielmo, 1992a).

PARTE II

DESCRIPCIÓN DE LOS ESTABLECIMIENTOS

Los trabajos correspondientes a los capítulos 2 y 3 de este trabajo de tesis se realizaron en dos establecimientos ubicados en la provincia del Chaco. Uno es “La Margarita” (26°40’S - 60°46’W) en la localidad de Avia Terai (AT) en el departamento Independencia y el otro es “Don Goyo” (27°34’S - 60°41’W) de la localidad de Villa Ángela (VA), departamento Mayor L. J. Fontana.

El primero, AT, es un establecimiento de 327 ha de superficie, que mantiene aproximadamente 450 vientres de raza Braford 3/8 sobre una base forrajera de *Panicum maximum* cv. *Gatton panic*, con suplementación estratégica con concentrados. No cuentan con baño de inmersión para tratamientos acaricidas.

El segundo establecimiento, VA, tiene una superficie de 505 ha, donde se alojan aproximadamente 300 vientres cruza, es decir, producto del cruzamiento indefinido de ganado criollo con razas índicas. Actualmente se da servicio con toros Braford 3/8. La base forrajera son las pasturas permanentes, con predominio de *Chloris gayana* (*Gramma rhodes*), distintas especies de *Paspalum* sp. y *Cynodon* sp. Parte de la superficie del establecimiento se destina a la producción de pasturas anuales, como sorgo forrajero. Un pequeño curso de agua atraviesa el sector norte del establecimiento, lo que determina anegamientos parciales durante las temporadas de lluvias. Cuenta con baño de inmersión para tratamientos acaricidas.

CAPITULO 2:

Detección por PCR de *Babesia bigemina* en glándulas salivales de hembras de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y cuantificación de la proporción de garrapatas infectadas en condiciones de campo

INTRODUCCIÓN

Un factor de importancia para el análisis epidemiológico de las enfermedades transmitidas por vectores es la proporción de los mismos que están infectados y que pueden transmitir el patógeno (Randolph y col., 2002). En teoría, este valor puede ser usado para calcular la tasa de inoculación, que por definición, es la probabilidad de que un animal del rodeo reciba una inoculación en un día. Esta probabilidad es función del producto del promedio diario de garrapatas por animal y la proporción de garrapatas infectadas (Mahoney y Ross, 1972). Se ha postulado que, para el caso de *B. bigemina*, conociendo la proporción de vectores infectados, solo sería necesario tener una estimación de la media diaria de garrapatas sobre los bovinos para calcular el ritmo de transmisión en el rodeo (Mahoney y Mirre, 1971). En un trabajo realizado en Australia mediante la observación microscópica de extendidos de larvas de vida libre, se determinó que la proporción de garrapatas infectadas en condiciones de campo era de 0,04% para *B. bovis* (mencionada como *B. argentina*) y de 0,23% para *B. bigemina* (Mahoney y Mirre, 1971). Estos valores llevaron a calcular que para mantener la circulación de *B. bovis* en el rodeo sería necesaria una media de 12 picaduras por animal y por día (Mahoney, 1973). De la misma manera se puede inferir que para *B. bigemina* serían necesarias 2,2 picaduras diarias. Estos valores se utilizaron como parámetros en diferentes modelos de simulación para la evaluación de situaciones epidemiológicas (Ross y Mahoney, 1974; Smith, 1984; Smith y Kakoma, 1989). La aplicación de estos parámetros en regiones diferentes a Australia arrojó resultados observados no concordantes con los estimados, sobre todo cuando se aplicó a rodeos con algún porcentaje de cruzamiento con *Bos indicus* (de Vos y col., 2006; Guglielmone, 1991a; Smith, 1984). La complejidad de la estimación de la proporción de garrapatas infectadas en condiciones de campo por este método llevó a intentar esta estimación con otras técnicas (Guglielmone, 1991a).

Un procedimiento que ha sido frecuentemente utilizado es el examen microscópico de muestras de hemolinfa de teleoginas, donde se pueden detectar los esporokinetos de *Babesia* (Cafrune y col., 1993; Cafrune y col., 1995; Gaido y Guglielmone, 1995; Guglielmone y col., 1985; Guglielmone y col., 1989b; Guglielmone y col., 1996; Guglielmone y col., 1997c; Mangold y col., 1993; Riek, 1964). Con este método, sin embargo, hay dificultades con la identificación de las especies de *Babesia* en garrapatas colectadas de campo (Guglielmone y col., 1996). Morzaria y Young (1977) lograron una mayor especificidad mediante el uso de inmunofluorescencia indirecta. Sin embargo, la cuantificación de esporokinetos en la hemolínfa de hembras ingurgitadas es un pobre indicador de la infección de la progenie de la garrapata examinada (Cafrune y col., 1995; Manop Muangyai, 1974) lo que limita su aplicación en estudios epidemiológicos.

Se han utilizado diferentes técnicas moleculares para la detección específica de babesias en garrapatas y hemolinfa (Adham y col., 2009; Hermans y col., 1994; Oliveira y col., 2005; Quintao-Silva y col., 2007; Sparagano y col., 1999; Yamada y col., 2009). La mayoría de estas detecciones fueron realizadas sobre garrapatas enteras y alimentadas, no siendo posible diferenciar entre tejidos infectados de la garrapata o contaminación con material de ingesta de los ciegos intestinales.

Babesia bigemina es transmitida por las ninfas y los adultos de *R. (B.) microplus*, pero no por las larvas (Friedhoff, 1988). La infección de las garrapatas puede ser alimentaria o vertical (Hodgson, 1992). Esto significa que el patógeno puede transmitirse de una generación de garrapatas a la próxima alimentándose en un hospedador infectado o un hospedador no infectado (Büscher, 1988; Potgieter y Els, 1977; Rosenbusch, 1927). Si bien los esporokinetos de *B. bigemina* invaden prácticamente todos los órganos de la garrapata (Hodgson y col., 1992; Potgieter y Els, 1977), las formas infectantes para el bovino solo se desarrollan en las glándulas salivales (GS), desde donde son inoculadas al hospedador vertebrado (Mehlhorn y Schein, 1984; Potgieter y Els, 1977; Riek, 1964; Rosenbusch, 1927). La infección alimentaria de la garrapata tiene lugar solamente durante las últimas 24 horas de ingurgitación de las hembras (Callow, 1968; Friedhoff, 1988; Riek, 1964), sin embargo, por ser ésta una garrapata de un solo hospedador, las ninfas y adultos sólo pueden ser colectados prendidos a un bovino, con lo cual existe la posibilidad de que haya formas libres de babesias en los ciegos intestinales del artrópodo. Una manera precisa de identificar y cuantificar las garrapatas que efectivamente transmiten la infección sería entonces la detección molecular de *B.*

bigemina en GS de ninfas o adultos de *R. (B.) microplus*. La búsqueda por PCR en GS se ha aplicado con éxito en la detección de *Theileria parva* en *Rhipicephalus appendiculatus* (Watt y col., 1997) y *T. ovis* en *R. bursa* (Aktas y col., 2006; Altay y col., 2008)

El objetivo de este capítulo fue la detección y la cuantificación (%) de las garrapatas con capacidad efectiva para transmitir *B. bigemina* mediante el diagnóstico molecular en las GS, en poblaciones de *R. (B.) microplus* infectadas naturalmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las garrapatas utilizadas en este trabajo se obtuvieron durante visitas mensuales por dos años consecutivos a los establecimientos “Don Goyo” (VA) y “Las Margaritas” (AT) según se detalla en el capítulo 3. En cada visita se revisaron terneros de los que se colectaron hembras de *R. (B.) microplus* de 4,5 a 8 mm. Éstas fueron transportadas vivas a 4°C en viales de 50 cm³ con tapa perforada. En el laboratorio fueron almacenadas vivas a 4°C hasta el momento de la disección. Las disecciones fueron realizadas desde dos hasta 23 días post-colecta (DPC). Inmediatamente antes de las disecciones las garrapatas fueron sumergidas en etanol 70% a 4°C y secadas con papel absorbente. Treinta hembras de *R. (B.) microplus* obtenidas de una colonia libre de *Babesia spp.* (provistas por el Dr. Daniel Aguirre, EEA Cerrillos, INTA), fueron también sometidas a disección y las glándulas salivales se usaron como controles negativos.

DISECCIÓN DE GLÁNDULAS SALIVALES

Las disecciones se realizaron bajo lupa estereoscópica sobre placas de Petri de 45 mm de diámetro rellenas previamente con 15 ml de parafina derretida y conservadas a temperatura ambiente hasta su uso. Cada garrapata fue montada sobre una placa de Petri derritiendo la parafina con un soldador eléctrico de punta fina en un área de aproximadamente 10 mm en el centro de la placa (Figura 2.1 A). Una vez montada, la garrapata se cubrió con agua bidestilada. Se practicó un corte alrededor del idiosoma (Figura 2.1 B) con un fragmento de hoja de afeitado manipulada mediante una pinza hemostática del tipo *Halstead*. La incisión comenzó y terminó en la cavidad del camerostoma. La cutícula dorsal se separó utilizando pinzas de punta fina modelo 5SA. El tejido hemocelómico expuesto, así como los tubos de Malpighi fueron retirados. Los divertículos intestinales d.3 y d.4 (Douglas, 1943; Till, 1961) que cubren parcialmente las GS (Figura 2.1 C) fueron desplazados deslizando por debajo los brazos cerrados de las pinzas. Siguiendo el cuerpo de la GS en dirección postero-anterior se seccionó el conducto salival principal y tirando desde su extremo anterior se retiró la GS completa.

Después de cada disección se descartó el fragmento cortante y las pinzas fueron lavadas en una secuencia de hipoclorito de sodio al 10%, agua destilada y finalmente etanol 96% y secadas con papel absorbente. Los ciegos intestinales de algunas garrapatas resultaron lesionados

accidentalmente y su contenido entró en contacto con las GS. Este evento fue registrado para un análisis posterior. Con propósitos ilustrativos algunos especímenes fueron sometidos a microscopia electrónica de barrido siguiendo el protocolo propuesto por Mastropaolo y col. (2011).

EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES.

Una vez retiradas, las GS fueron lavadas una vez en agua bidestilada, en tubos de policarbonato de 2 ml. Cada tubo fue utilizado una vez y descartado. Las GS fueron transferidas a tubos eppendorf de 1.5 ml con 400 µl de solución de lisis II (Apéndice I) y congeladas a -20°C por al menos 24 horas. Para la extracción de ADN genómico (ADNg), a cada muestra se le adicionó 8 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) (Invitrogen®) y 100 µl de NaCl 5M y se incubó a 60°C durante 2 h. Luego se añadió un volumen de solución fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1 v/v), se mezcló con un agitador (Vortex) y se centrifugó a 13000 xg durante 10 min. La fase superior acuosa se trasladó a un tubo limpio y se precipitó mediante adición de 2 volúmenes de isopropanol frío (-20°C). A continuación las muestras se centrifugaron a 13000 xg a 4°C durante 15 min. Los sedimentos fueron lavados con 400 µl de etanol 75 % frío (-20°C), y centrifugados a 13000 xg durante 10 min. Se realizó un lavado final con etanol absoluto frío (-20°C). Los sedimentos de ADN se secaron a temperatura ambiente y fueron resuspendidos en 100 µl de buffer TE (Apéndice I).

Para la detección de ADNg de *B. bigemina*, las muestras fueron sometidas a una prueba de PCR. Las reacciones de amplificación fueron realizadas en volúmenes de 25 µl, en tubos Eppendorf de 0,2 ml de capacidad. Los reactivos usados para cada reacción incluyeron: 10X solución de PCR, 0,2 mM deoxinucleótidos (dNTPs), 2,2 mM MgCl_2 , 1,25 U *recombinant Taq DNA polymerase* (Invitrogen®), 0,2 mM DMSO y 0,8 mM de cada cebador. Se utilizaron dos cebadores, Big18sF (CGAGGCCTTTTGGCGGCGTTTATTAG) y Bab18sR (ACAAATCTAAGAATTTACCTCTGAC), que amplifican un fragmento de 642 pares de bases del gen 18s rARN (Thompson, 2013) y se utilizó un programa de PCR consistente de un periodo de desnaturalización inicial de ADN de 5 min a 94°C y 35 ciclos con las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 30 seg, hibridación a 62°C por 30 seg y polimerización a 72°C por 30 seg, mas un ciclo de polimerización final de 10 min a 72°C . En todas las reacciones de PCR, se incorporó un tubo de control de contaminación, al que se adicionó agua libre de nucleasas (® Gibco) en lugar de ADN, un control positivo de ADNg de *B.*

bigemina y un control de ADNg de *B. bovis*. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador modelo TC-412 (®Techne). Los productos de PCR fueron utilizados inmediatamente o conservados a -20°C hasta su uso.

ELECTROFORESIS PARA ADN

Se prepararon geles de agarosa con una concentración de 1,5 %. La suspensión de agarosa se realizó en solución TBE (1X) (Apéndice I) a la que se añadió bromuro de etidio en una concentración final de 0,5 $\mu\text{g/ml}$. La separación electroforética se realizó en cubas horizontales (BioRad®), a un voltaje constante de 60 V, empleando la solución TBE (1X). Se utilizó la solución de carga para ADN (3X) (Apéndice I) y se sembraron 12 μl de muestra por columna. Una columna se sembró con un marcador de peso molecular para ADN de 100 pares de bases (Invitrogen®). Los fragmentos amplificados fueron observados mediante exposición a luz ultravioleta en un transiluminador y el resultado interpretado como positivo (presencia de una banda de 642 pares de bases) o negativo (ausencia de banda)

SENSIBILIDAD DE LA PCR Y PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

La sensibilidad de la PCR en las condiciones habituales del laboratorio se evaluó utilizando ADNg extraído de cultivos de *B. bigemina* mantenidos en glóbulos rojos bovinos. Partiendo de una concentración original de ADNg de 169 $\mu\text{g/ml}$ se realizaron diluciones 1:10 en Buffer TE. Las concentraciones de ADNg fueron medidas con un espectrofotómetro Smartspec Plus (BioRad ®). Se consideró como límite de detección de la reacción de PCR la última dilución en la que se detectó una banda visible en el gel de electroforesis.

Para confirmar la presencia de ADNg amplificable, cada muestra fue sometida a una reacción de PCR usando cebadores que amplifican un fragmento del gen 12S rADN de garrapatas, usando las condiciones de reacción descritas por Szabó y col. (2005). A los fines de descartar resultados falsos positivos por contaminación con parásitos presentes en el contenido intestinal de las garrapatas, todas las muestras en las que se detectó ADN de *B. bigemina* fueron sometidas a otra reacción de PCR utilizando los cebadores bPL1 F - bPL4 R para Lactógeno Placentario Bovino (LPB) según las condiciones descritas por Torioni de Echaide y col. (1998). Esta PCR detecta la presencia de ADNg

bovino, lo que se consideró un indicador de contaminación con material ingerido por la garrapata. Las muestras positivas a esta última reacción no fueron consideradas en el análisis de proporción de garrapatas infectadas.

Con el propósito de evaluar una posible inhibición de la reacción de PCR por parte de los tejidos de garrapatas, 10 µl del ADN obtenido de cada garrapata libre de *Babesia sp.* fueron mezclados con 2 µl de un control positivo de ADNg de *B. bigemina* y sometidos a las mismas condiciones de análisis que las muestras de campo.

Se determinó la presencia de garrapatas infectadas por *B. bigemina* para las dos cohortes en cada una de las localidades (AT y VA). Los resultados se analizaron mediante tablas de contingencia por el estadístico de Chi-cuadrado para determinar la existencia de diferencias entre las cohortes y localidades estudiadas. Se determinó la correlación entre la prevalencia de infección y los datos climáticos obtenidos en los establecimientos (detallados en el capítulo 3) se analizó mediante el test de Spearman.

RESULTADOS

Las GS se presentan como dos órganos con aspecto de racimo que se extienden desde la cara interna de los espiráculos hasta su entrada en el hipostoma (Figura 2.1 D). Siguiendo el protocolo de disección propuesto fue posible obtener GS limpias y libres de otros tejidos (Figura 2.1 E).

Se analizaron en total 302 garrapatas de VA y 383 de AT, obteniéndose una prevalencia de 9,3% y 19,8% de garrapatas infectadas para cada localidad respectivamente. En algunos muestreos no se obtuvieron garrapatas. La tabla 2.1 muestra las cantidades analizadas por localidad y fecha de muestreo. Se observa que la prevalencia de infección fue variable para cada localidad y entre localidades. Las figuras 2.2 y 2.3 muestran las prevalencias con relación a las fechas de muestreo para AT y VA respectivamente. La prueba de Chi-cuadrado arrojó diferencias significativas entre localidades, con una mayor proporción de garrapatas infectadas en AT ($p < 0,0001$) pero no entre cohortes ($p = 0,275$). Un segundo análisis estratificando por cohortes mostró una diferencia significativa entre localidades para la cohorte 1 ($p = 0,001$) pero no para la cohorte 2 ($p = 0,107$). No se encontró relación estadística entre las prevalencias de infección y las variables climáticas analizadas.

Las GS de las 30 garrapatas de la colonia libre de *Babesia spp.* fueron negativas a la PCR específica para *B. bigemina*. Cuando estas muestras fueron mezcladas con un control de *B. bigemina* derivado de cultivo, todas resultaron positivas, indicando que no hay inhibición de la PCR por parte de los tejidos de esta garrapata. El límite de detección de la PCR para *B. bigemina* fue de 169×10^{-7} μg de ADNg /ml. Todas las muestras analizadas fueron positivas a la PCR del gen 12S rADN de garrapatas.

Se detectaron GS positivas desde el día 2 al día 22 post colecta. Siete muestras resultaron positivas a la PCR para LPB indicando contaminación con sangre de bovino proveniente de los ciegos intestinales. Estas siete muestras provenían de disecciones en las que se lesionaron los ciegos intestinales. Ninguna muestra en la que el intestino permaneció intacto durante la disección resultó positiva en el PCR para LPB. La proporción de disecciones en las que se lesionaron los ciegos intestinales fue relativamente alta cuando las garrapatas fueron procesadas dentro de los primeros tres DPC. Entre el 4^{to} y 10^{mo} día estos valores fluctuaron entre 85,7 y 98%, alcanzando el 100% en la mayoría de las muestras analizadas a partir del día 12 post colecta (Tabla 2.2).

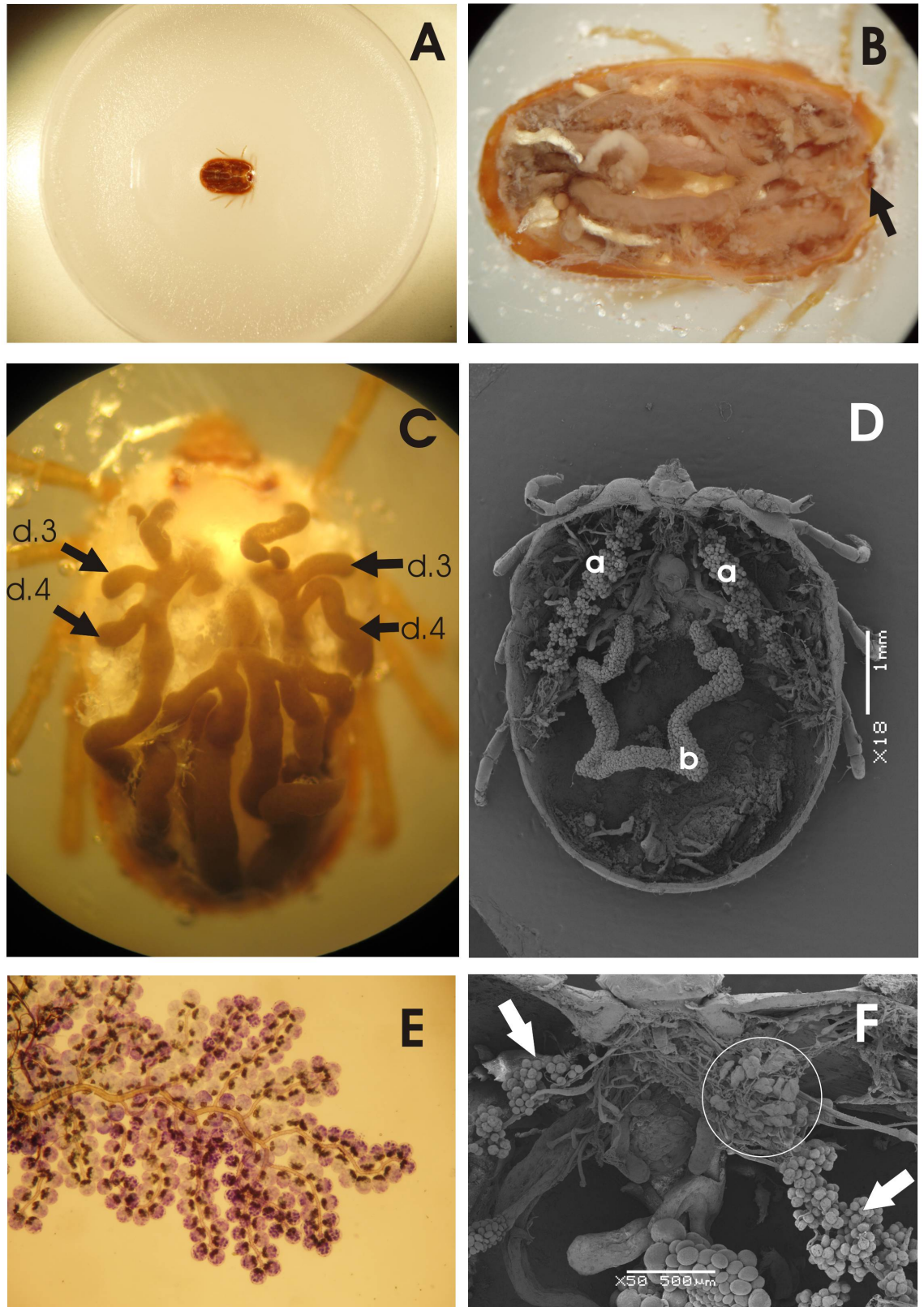


Figura 2.1. Disección de glándulas salivales de *Rhipicephalus (B.) microplus*. Leyenda en la página siguiente

Figura 2.1.

- A- Hembra de *Rhipicephalus (B.) microplus* montada en parafina.
- B- Sección de la cubierta dorsal del idiosoma. La flecha indica el inicio de la incisión, en la cavidad del camerostoma, inmediatamente sobre el capítulo.
- C- Divertículos intestinales d.3 y d.4 (Till, 1961) (flechas) cubriendo parcialmente las glándulas salivales.
- D- Detalle de la ubicación anatómica y morfología de las glándulas salivales (a) y su relación con el ovario (b).
- E- Detalle de las glándulas salivales libres de otros tejidos. Coloración con Azul de Metileno.
- F- Relación anatómica entre las glándulas salivales (flechas) y las glándulas anexas al órgano de Gene (círculo) (Booth y col., 1984). La porción izquierda de éste órgano se retiró para mostrar la porción anterior de la glándula salival.

Tabla 2.1. Cantidad de glándulas salivales de *R. (B.) microplus* analizadas, cantidad de positivas y prevalencia (%) de la infección con *B. bigemina* en relación con la localidad y fecha de colecta.

	Fecha colecta	VA			AT		
		n	positivas	prevalencia(%)	n	positivas	prevalencia(%)
Cohorte 1	Sep-06	sm	sm	sm	19	0	0,0
	Oct-06	sm	sm	sm	20	0	0,0
	Nov-06	sm	sm	sm	22	13	59,1
	Dic-06	20	2	10,0	43	26	60,5
	Ene-07	19	1	5,3	50	13	26,0
	Feb-07	26	0	0,0	41	5	12,2
	Mar-07	sm	sm	sm	sm	sm	sm
	Abr-07	44	3	6,8	sm	sm	sm
	May-07	5	0	0,0	21	0	0,0
	Jun-07	4	0	0,0	24	1	4,2
	Jul-07	sm	sm	sm	27	1	3,7
	Ago-07	sm	sm	sm	10	0	0,0
	Sep-07	sm	sm	sm	10	0	0,0
	Oct-07	7	3	42,9	7	1	14,3
Cohorte 2	Nov-07	sm	sm	sm	20	6	30,0
	Dic-07	25	7	28,0	11	0	0,0
	Ene-08	10	0	0,0	sm	sm	sm
	Feb-08	8	3	37,5	16	2	12,5
	Mar-08	12	7	58,3	12	6	50,0
	Abr-08	20	0	0,0	10	2	20,0
	May-08	23	0	0,0	10	0	0,0
	Jun-08	20	0	0,0	sm	sm	sm
	Jul-08	15	0	0,0	sm	sm	sm
	Ago-08	14	1	7,1	10	0	0,0
Sep-08	30	1	3,3	sm	sm	sm	
Oct-08	sm	sm	sm	sm	sm	sm	
TOTAL		302	28	9,3	383	76	19,8

VA: Villa Ángela. AT: Avia Terai. sm: sin muestra

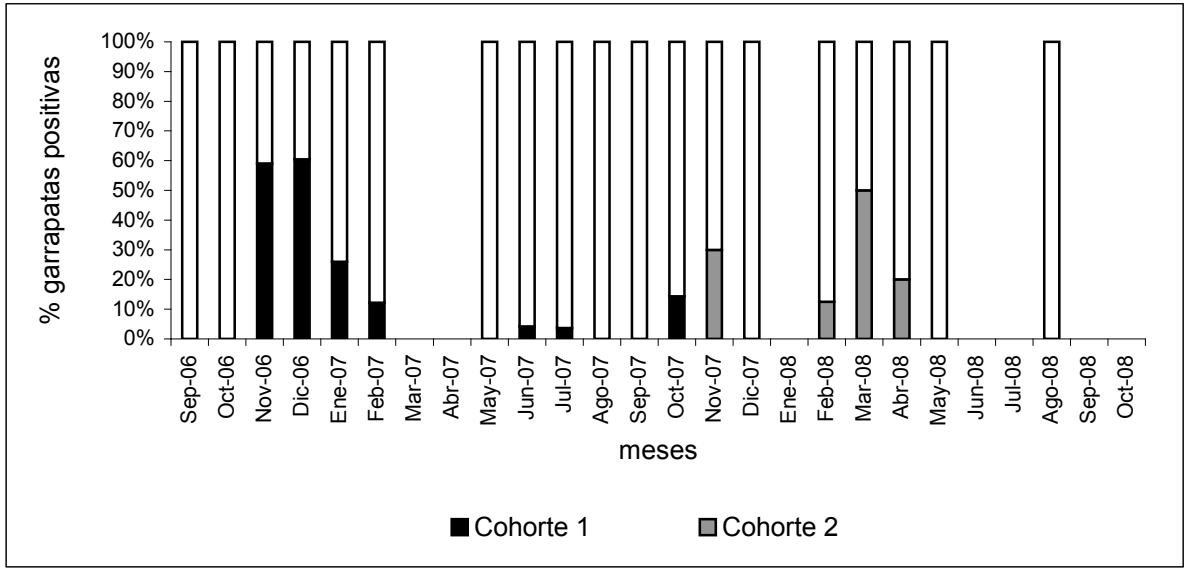


Figura 2.2. Avia Terai. Proporción de garrapatas infectadas con *B. bigemina* con relación a las fechas de colecta.

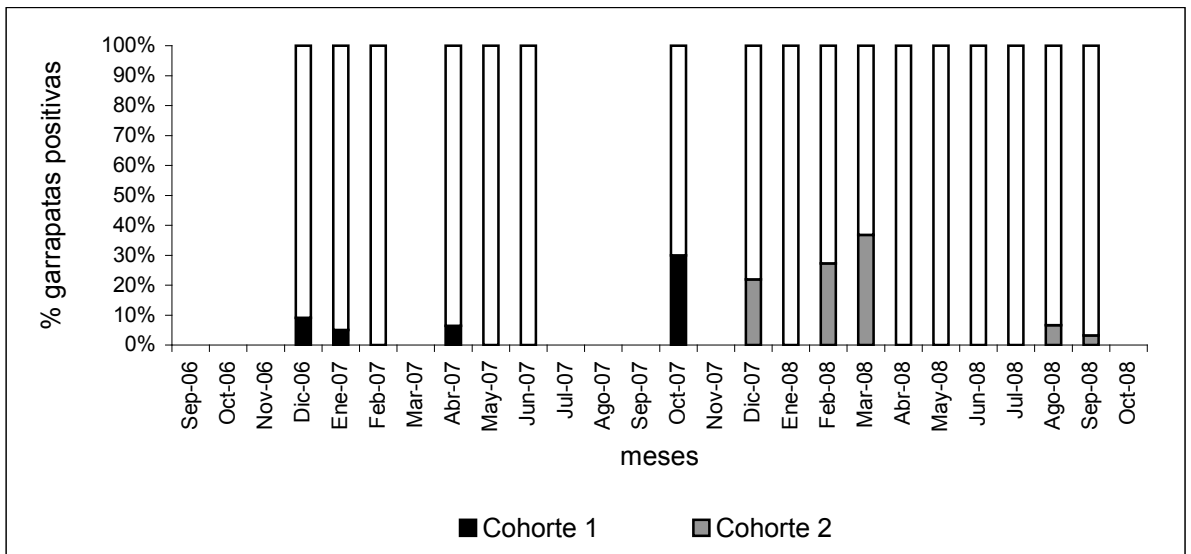


Figura 2.3. Villa Ángela. Proporción de garrapatas infectadas con *B. bigemina* con relación a las fechas de colecta

Tabla 2.2 Efecto del tiempo post colecta sobre la fragilidad de los ciegos intestinales de las garrapatas sometidas a disección y contaminación de la muestra con material de ingesta de la garrapata.

DPC	Garrapatas analizadas	Positivas B. big.	%	IA	%	Positivas LPB
2	59	22	37,3	35	59,3	1
3	62	0	0,0	51	82,3	
4	43	5	11,6	41	95,3	1
5	51	7	13,7	50	98,0	
6	76	18	23,7	66	86,8	
7	66	16	24,2	64	97,0	2
8	63	5	7,9	57	90,5	
9	37	7	18,9	35	94,6	
10	28	5	17,9	24	85,7	
12	25	1	4,0	25	100,0	
13	11	0	0,0	11	100,0	
14	25	2	8,0	24	96,0	2
16	20	0	0,0	20	100,0	
17	20	0	0,0	18	90,0	1
19	29	1	3,4	29	100,0	
20	22	2	9,1	22	100,0	
21	24	5	20,8	24	100,0	
22	15	8	53,3	14	93,3	
23	10	0	0,0	10	100,0	
Total	686	104	15,2	620	90,4	7

DPC: Días post colecta. Positivas B.big: PCR 18s rRNA. IA: Intestino abierto durante la disección.

Positivas LPB: Indicador de contaminación con material de ingesta.

DISCUSIÓN

La estructura de las GS se corresponde con descripciones previas de este órgano para la familia Ixodidae (Binnington, 1978; Coons y Roshdy, 1973; Douglas, 1943; Megaw y Beadle, 1979; Takagi Nunes y col., 2005; Takagi Nunes y col., 2006; Till, 1961). Debe diferenciarse el órgano de Gene (Booth, 1989), que mediante la técnica propuesta se elimina junto con la cutícula dorsal. Durante la disección se debe evitar extraer las glándulas anexas al órgano de Gene (Booth y col., 1984), que se encuentran inmediatamente por encima de las GS, antes de la entrada al hipostoma (Figura 2.1 F).

Se ha reportado que pueden existir inhibiciones de la reacción de PCR cuando se utiliza ADN extraído de GS tanto en garrapatas alimentadas como sin alimentar, arrojando resultados falsos negativos (Sparagano y col., 1999). En el presente estudio se evaluó la posible inhibición de la reacción de PCR mediante la adición de ADNg extraído de cultivos de Babesias a las muestras extraídas de garrapatas no infectadas. Todas las muestras evaluadas resultaron positivas a la PCR, por lo que se descarta la presencia de sustancias inhibidoras. Asimismo la PCR para el gen 12S rDNA de garrapatas fue positiva para todas las muestras evaluadas, lo que demuestra también la ausencia de inhibiciones pero además, sirvió como control adicional de la técnica de extracción, minimizándose así la posibilidad de resultados falsos negativos. Se ha sugerido también que la contaminación con contenido intestinal de las garrapatas puede arrojar falsos positivos debido a la presencia de organismos presentes en el material de ingesta, pero que no necesariamente continuarán su ciclo en la garrapata (Sparagano y col., 1999; Watt y col., 1997). Por este motivo las muestras que evidenciaron contaminación con sangre bovina al ser sometidas a la PCR para LPB fueron descartadas del análisis. La contaminación con material de ingesta se produjo luego de la lesión de los ciegos intestinales, por lo que no habría riesgo de contaminación cuando estos órganos permanecen ilesos durante la disección. Se comprobó que la fragilidad de las paredes intestinales aumenta con relación al tiempo post colecta. Para minimizar el riesgo de lesionar los ciegos intestinales las disecciones deberían realizarse dentro de los tres DPC.

Si se considera el total de garrapatas analizadas, la proporción de garrapatas infectadas para cada rodeo (VA= 9,3% y AT= 19,8%) es sustancialmente superior a la reportada por Mahoney y Mirre (1971) para larvas de *R. (B.) australis* colectadas en Australia (0,23%). Estos autores, sin embargo,

en el mismo trabajo señalan que en condiciones experimentales obtuvieron prevalencias de $23\% \pm 24,6\%$ y $10\% \pm 4\%$ al analizar ninfas en diferentes periodos de alimentación, lo que es consistente con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis y con la información generada por otros autores. Así, analizando los huevos de *R. (B.) microplus* de Tailandia y *R. (B.) australis*, alimentadas sobre terneros inoculados con *B. bigemina* procedente de Tailandia, otro autor señala una prevalencia de infección de los huevos de $32,4\%$ y $37,7\%$ para garrapatas de cada origen respectivamente (Manop Muangyai, 1974). Un trabajo realizado por Ouhelli y Schein (1988) utilizando *R. (B.) annulatus* de Marruecos y *B. bigemina* aislada en Turquía, muestra en forma gráfica que obtuvieron valores de prevalencia similares. En los tres trabajos mencionados se observa a la vez un amplio rango de variación entre la proporción de progenies infectadas provenientes de hembras con la misma fuente de infección y mantenidas en condiciones similares durante la oviposición. Considerando que la infección de *B. bigemina* solo se transmite por ninfas y adultos de *R. (B.) microplus* y que solo una pequeña fracción de las larvas que encuentran un bovino consiguen mudar a ninfa (Roberts, 1968), parece probable que una gran proporción de garrapatas estén infectadas a los fines de perpetuar la transmisión

La prevalencia de infección fue mayor en AT que en VA para el primer año de estudio. En el segundo año de estudio no se encontraron diferencias significativas entre ambas localidades. Si se analizan las prevalencias mensuales, se observa una gran variación entre la proporción de garrapatas infectadas entre los diferentes muestreos incluso para una misma localidad.

Se ha demostrado que la temperatura ambiental tiene una fuerte influencia sobre la transmisión y la persistencia de las babesias en las garrapatas en sus fases de vida libre. En *R. (B.) annulatus* la transmisión transovárica de las hembras ingurgitadas a los huevos ocurre a partir de los 16°C y aumenta en forma proporcional con temperaturas crecientes, aunque a 35°C se produce un efecto negativo sobre la transmisión y la sobrevivencia de la hembra (Ouhelli y Schein, 1988). En la garrapata *R. (B.) australis* el umbral mínimo de temperatura sería 20°C (Riek, 1964). Por otro lado, las bajas temperaturas no solo no disminuyen la infección en los huevos y larvas infectados, sino que prolongan la persistencia de la infección en estos estadios (Ouhelli y col., 1987). Temperaturas ambientales de 35 a 37°C activan el ciclo de las babesias en las larvas de vida libre e inducen la

producción de formas infectantes, lo que conduce a la depleción y a la eliminación prematura de la infección en la garrapata (Dalglish y Stewart, 1978; Hodgson, 1992).

El sudoeste del chaco es una región de gran amplitud térmica, con heladas en invierno y temperaturas máximas superiores a 40°C en verano (ver Parte I: Descripción el área de estudio), por lo que es esperable una gran variación en la proporción de garrapatas infectadas solamente por efecto de la temperatura. Sin embargo en éste trabajo no se encontró relación entre la prevalencia de infección y las variables climáticas medidas en los establecimientos. Esto puede deberse a que la información climática no se obtuvo a nivel del suelo y por lo tanto no se analizaron las condiciones micro-climáticas a las que estuvieron expuestas las garrapatas (Nava y col., 2013; Randolph y Storey, 1999). Es necesario considerar también que la infección de las garrapatas colectadas sobre un bovino en un mes determinado puede haberse producido varios meses antes, dependiendo de la sobrevivencia de las larvas y la tasa de encuentro de hospedadores, lo que a su vez es función del clima y de la carga animal (Guglielmone, 1994; Nava y col., 2013). En este sentido se ha demostrado que las babesias no permanecen viables a lo largo de toda la vida de las larvas y que la infección se pierde luego de un período variable, aún a temperaturas tan bajas como 15°C (Dalglish y Stewart, 1982; Ouhelli y Schein, 1988), por lo que la proporción de garrapatas que transmiten babesias es también una función inversa de la edad de las larvas. En este trabajo de tesis las menores prevalencias se encontraron en invierno y principio de primavera. Debido a que en estos meses disminuyen también la oviposición y la eclosión de *R. (B.) microplus*, las garrapatas encontradas en esta época del año deben derivar de las larvas nacidas a fines de otoño (Ivancovich y col., 1984; Nava y col., 2013; Nuñez y col., 1987). Es probable entonces que las bajas prevalencias encontradas en los meses fríos no estén relacionadas con la inhibición de la transmisión por bajas temperaturas, sino a la pérdida de la infección por envejecimiento. No se han realizado trabajos experimentales que caractericen la relación de la edad de las larvas con la temperatura ambiente y la infección con babesias, por lo que se desconoce como se comporta esta dinámica en condiciones de campo. Asimismo, el mayor volumen de información disponible no fue generado para *R. (B.) microplus*, sino para otras especies de garrapatas como *R. (B.) australis* o *R. (B.) annulatus* (Dalglish y Stewart, 1982; Hodgson, 1992; Ouhelli y col., 1987; Ouhelli y Schein, 1988). *Babesia bigemina* puede ser transmitida por diferentes especies de garrapatas, pero la dinámica de infección y la capacidad

vectorial varían sensiblemente de una especie a otra (Büscher, 1988; Potgieter y Els, 1977), por lo que cualquier comparación debe ser realizada con cautela. En resumen, para poder interpretar la situación observada en condiciones de campo es crucial generar nueva información que permita cuantificar los factores que determinan la transmisión de *B. bigemina* de la garrapata hembra a su progenie y la duración de la infección en los estadios de vida libre.

Independientemente de las condiciones que conduzcan a ello, es claro que la proporción de garrapatas infectadas puede variar considerablemente, incluso dentro de un mismo rodeo, dependiendo de las condiciones a las que estuvieron expuestos los estadios de vida libre antes de encontrar un hospedador. Los resultados de este capítulo concuerdan con las conclusiones obtenidas experimentalmente por Dalgliesh y Stewart (1982) y con el modelo utilizado por Smith y col. (2000), indicando que el uso de un valor constante de prevalencia de infección en garrapatas obtenido de un muestro transversal no es apropiado para valorar la tasa de inoculación.

CAPITULO 3:

Incidencia de infección y análisis de los factores relacionados con la transmisión de *Babesia bigemina* en dos rodeos de cría del sudoeste del Chaco

INTRODUCCIÓN

Las relaciones entre patógeno, vector y hospedador definen dinámicas de transmisión diferentes que solo pueden ser interpretados luego de identificar y cuantificar sus componentes (Randolph, 2004). La dinámica de transmisión de babesia depende de un número de variables que afectan a los tres componentes principales del ciclo: la garrapata vectora, la babesia y el hospedador bovino. Tradicionalmente la investigación apuntó a una combinación limitada de estas variables, como la ecología de las garrapatas, el ciclo de la babesia en el hospedador vertebrado e invertebrado, el rol de la inmunidad individual y de rodeo en la resistencia a la enfermedad, estrategias de control de garrapatas o quimioprofilaxis y terapéutica (Smith y Kakoma, 1989).

Un esquema teórico clásico supone que las poblaciones de *R. (B.) microplus* hacen picos de abundancia creciente desde la primavera al otoño. Cada pico corresponde a una nueva generación y la cantidad de generaciones es regulada por la duración de la fase de vida libre, que a su vez es función de la temperatura a la que se incuban los huevos (Campos Pereira y col., 2008; Solari y Quintana, 1994). Siguiendo este esquema se puede inferir que en el sudoeste del Chaco se pueden dar cuatro generaciones anuales (Späth y col., 1994a). Este esquema conceptual se ha desarrollado sobre la base de la estimación de la carga de garrapatas, o cantidad de garrapatas observada sobre los hospedadores. Es necesario aclarar que el término "carga" se ha usado en la literatura relativa a babesias y garrapatas de los bovinos para referirse indistintamente a abundancia media (cantidad de garrapatas /total de hospedadores) e intensidad media de parasitación (cantidad de garrapatas /hospedadores con garrapatas) (Bush y col., 1997). Estudios sobre distribución estacional realizados en el noroeste de nuestro país indicaron que *R. (B.) microplus* tiene una mayor abundancia en el otoño (Guglielmone y col., 1981; Mangold y col., 1985; Mangold y col., 1987). Sin embargo en el Chaco semiárido y el Chaco Serrano se encontraron picos de parasitismo en la primavera (Guglielmone y col., 1990a; Mangold y col., 1985; Mangold y col., 1987), lo cual fue inesperado ya

que en esa estación es cuando el déficit hídrico es más acentuado e incidiría negativamente en la biología de los estadios no parasitarios de esta garrapata. Los autores postulan que esta situación podría deberse a una mayor concentración de bovinos en los alrededores de las aguadas lo cual permitiría que las larvas tengan mayores probabilidades de encontrar un hospedador o bien podría deberse a la pérdida de resistencia natural contra *R. (B.) microplus* por baja calidad del alimento en la primavera o a una combinación de ambos factores (Guglielmo, 1989). Estos trabajos se realizaron en establecimientos ganaderos con una explotación extensiva, con pastizales naturales nativos y monte, sin rotación de parcelas ni tratamientos acaricidas y con cargas animales muy bajas (1 bovino cada 7,5 hectáreas en (Guglielmo y col., 1990a)).

Se ha postulado también que la dinámica de transmisión de babesias acompaña estas fluctuaciones estacionales, aumentando la tasa de inoculación en forma proporcional a la abundancia de garrapatas (Smith y col., 2000) y que el riesgo de infección con babesias está directamente relacionado con dicha abundancia (Smith, 1984). Estudios llevados adelante en rodeos lecheros en Bolivia y Argentina muestran, sin embargo, que se puede alcanzar la estabilidad con abundancias relativamente bajas (González de Ríos y col., 1989; Ribera Cuéllar y col., 2000). En Bolivia, mediante un estudio longitudinal en explotaciones lecheras, Ribera Cuéllar y col. (2000) no encontraron correlación entre la abundancia de garrapatas y la tasa de inoculación para *B. bigemina*. En Argentina, González de Ríos y col. (1989), analizando dos establecimientos lecheros del valle de Lerma, Salta, detectaron picos de abundancia en primavera y verano pero no en otoño. En este caso no puede atribuirse esta situación a malas condiciones nutricionales ni a la concentración de hacienda por factores climáticos. De cualquier manera estos picos poblacionales no se vieron acompañados por un aumento en la tasa e inoculación de *B. bigemina*, que en cambio alcanzó su máximo cuando la prevalencia de parasitación por garrapatas fue alta, es decir, cuando muchos bovinos hospedaron garrapatas, a pesar de que la abundancia media en esa época fue baja.

Lo expuesto indica que en ciertas circunstancias la dinámica poblacional de las garrapatas no puede ser explicado por el esquema de generaciones determinadas por la temperatura ambiente y que probablemente otros parámetros relativos a la relación parásito-hospedador sean más relevantes que la abundancia media para definir la dinámica de transmisión de *B. bigemina*. En este sentido, la experiencia de enfermedades transmitidas por vectores en poblaciones silvestres indica que la

prevalencia de parasitación por los vectores y la distribución de los vectores en la comunidad de hospedadores jugarían un rol mas preponderante en la transmisión de patógenos que la proporción de vectores infectados o la cantidad de vectores que se alimentan sobre un hospedador (Begon y col., 2006; Randolph y col., 2002; Randolph, 2004). Estos aspectos, que han sido pobremente estudiados en poblaciones de animales domésticos en relación con las enfermedades transmitidas por garrapatas, no pueden extrapolarse en forma directa a explotaciones agropecuarias debido a características intrínsecas a estas últimas, como la alta densidad de hospedadores, segregación sexual y etaria, límites espaciales discretos, disponibilidad de recursos nutricionales, inmunización contra enfermedades transmisibles, heterogeneidad genética, translocación abrupta de poblaciones, ausencia de predación y modificación de jerarquías sociales (Wilson y col., 2002). Por esto se torna necesario explorar los factores mencionados bajo las condiciones impuestas por los sistemas productivos. Los objetivos de este capítulo fueron describir aspectos cuantitativos del ciclo parasitario de *R. (B.) microplus* así como cuantificar aspectos de la dinámica de transmisión de *B. bigemina* y explorar la interacción entre ambos componentes bajo condiciones reales de manejo de establecimientos ganaderos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las actividades relativas al estudio longitudinal se realizaron desde septiembre de 2006 hasta octubre de 2008 en los establecimientos “Don Goyo”, (VA) y “Las Margaritas”, (AT). En cada establecimiento se seleccionaron e identificaron entre 25 y 30 terneros que fueron examinados y muestreados mensualmente, a partir del primer mes de nacimiento y por el término de un año. Esta metodología se siguió durante dos cohortes consecutivas de terneros. En ambos establecimientos se instalaron además sendas colectoras de datos con sensores de temperatura y humedad modelo HOBO H08-032-08 ONSET®. Estos dispositivos almacenaron cada 30 minutos la temperatura medida en grados centígrados y la humedad, como porcentaje de humedad relativa ambiente, durante todo el periodo bajo estudio. Con fines comparativos y de control, los mismos parámetros, además del régimen de precipitaciones mensuales, se obtuvieron de los registros de la EEA INTA Sáenz Peña (<http://inta.gob.ar/unidades/411000/agrometeorologia-saenz-pena/view>).

TOMA DE MUESTRAS

Mediante punción de la vena yugular, de cada ternero se obtuvieron aproximadamente 9 ml de sangre que fueron fraccionados en dos tubos. Cuatro ml se depositaron en un tubo conteniendo 1ml de citrato como anticoagulante y se refrigeraron inmediatamente a 4°C, hasta la llegada al laboratorio, donde fueron almacenados a -20°C hasta su procesamiento. Los restantes 5 ml de sangre fueron transferidos a tubos de vidrio que fueron mantenidos a temperatura ambiente hasta la consolidación del coágulo y luego refrigerados a 4 °C hasta la llegada al laboratorio. Allí fueron centrifugados a 5000 rpm por 30 min y el suero fue separado y almacenado en tubos de 2 ml de policarbonato (Polistor®) a -20°C hasta su procesamiento.

ESTIMACIÓN DE LA CARGA DE GARRAPATAS

En cada visita se estimó la carga de garrapatas contando las hembras de *R. (B.) microplus* de 4,5 a 8 mm de longitud sobre la mitad izquierda de cada animal según la metodología propuesta por Wharton y Utech (1970). La presencia de larvas y/o ninfas fue registrada pero no cuantificada. Con los valores obtenidos para cada ternero en cada uno de los muestreos se calculó la prevalencia de larvas, ninfas y hembras (cantidad de animales parasitados con cada estadio / cantidad total de

animales muestreados), la abundancia media (cantidad total de garrapatas / cantidad total de animales muestreados) y la intensidad media (cantidad total de garrapatas / cantidad de animales parasitados) de acuerdo a Bush y col. (1997). La distribución de la abundancia de garrapatas sobre la población de terneros se estimó por la relación de la variancia de la abundancia media (s^2M) con la abundancia media (M) es decir s^2M/M (Anderson y Gordon, 1982; Zar, 1999), que se interpreta de la siguiente manera: $s^2M/M > 1$ distribución agregada (distribución binomial negativa); $s^2M/M = 1$ distribución al azar (distribución de Poisson); $s^2M/M < 1$ distribución regular (todos los hospedadores tienen el mismo n de parásitos). El grado de agregación del parasitismo por hembras *R. (B.) microplus* en los terneros se analizó mediante el índice de discrepancia (D) (Poulin, 1993), expresado como:

$$D = 1 - [2(n)/xN(N + 1)]$$

donde n es el número total de parásitos en todos los hospedadores, N es el número total de hospedadores y x es la abundancia media. Cuando $D = 0$ no hay agregación y todos los hospedadores muestran el mismo nivel de infestación. Cuando $D = 1$ la agregación es total, es decir que todos los parásitos de una población infestan un solo individuo de la especie hospedadora.

Las distribuciones para cada cohorte y localidad se graficaron mediante histogramas de frecuencia.

SEROLOGÍA

Las muestras de suero fueron analizadas mediante una prueba de ELISA según la metodología descrita en el capítulo 1. Para cada muestreo se analizaron las muestras de todos los terneros incluidos en la cohorte correspondiente. A los fines de evitar falsos positivos resultantes de títulos altos de anticuerpos calostrales cada animal fue considerado positivo cuando una muestra mostró un valor superior de PP con respecto a la muestra del mes anterior. Con los valores obtenidos se calculó la prevalencia ($P =$ cantidad de positivos / cantidad total de animales muestreados) y la incidencia acumulada ($IA =$ cantidad de nuevos positivos / cantidad inicial de animales en riesgo) (Thrusfield,

2007) para cada muestreo. Ambos parámetros fueron utilizados para calcular h siguiendo el modelo presentado en el capítulo 1.

EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE

La extracción de ADN total de *Babesia* se realizó a partir de 1000 μ l de sangre entera previamente congelada a -20°C . El paquete de eritrocitos se suspendió en 800 μ l de solución de lisis I (Apéndice I), se agitó con agitador (Vortex) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. El lisado se centrifugó a 13000 xg , a temperatura ambiente, durante 10 min. y el sobrenadante se eliminó. El sedimento fue sometido a lavados con agua bidestilada libre de nucleasas (Gibco®) hasta obtener un sobrenadante claro y luego se resuspendió en 400 μ l de solución de lisis II (Apéndice I), se adicionó 8 μ l de Proteinasa K (20 mg/ml) (Invitrogen®) y 100 μ l de NaCl 5M y se incubó a 60°C durante 2 h.

Para extraer el ADN, se añadió un volumen de solución fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1 v/v), se mezcló con agitador (Vortex) y se centrifugó a 13000 xg durante 10 min. La fase superior acuosa se trasladó a un tubo limpio y se precipitó mediante adición de 2 volúmenes de isopropanol frío (-20°C). A continuación las muestras se centrifugaron a 13000 xg a 4°C durante 15 min. Los sedimentos fueron lavados con 400 μ l de etanol 75 % frío (-20°C), y centrifugados a 13000 xg durante 10 min. Se realizó un lavado final con etanol absoluto frío (-20°C). Los sedimentos de ADN se secaron a temperatura ambiente y fueron resuspendidos en 200 μ l de buffer TE (Apéndice I).

DETECCIÓN DE ADN DE *B. bigemina*

Para la detección de ADN de *B. bigemina* las muestras fueron sometidas a una reacción de PCR y posterior electroforesis en las condiciones que se detallan en el capítulo 2. Este procedimiento se aplicó para detectar el momento de infección, por lo que cada ternero fue evaluado hasta obtener un resultado positivo. Los valores obtenidos fueron usados para calcular la incidencia acumulada y su respectivo valor de h .

ESTADÍSTICA

La relación entre las observaciones para garrapatas (prevalencia de ninfas, prevalencia de hembras e intensidad media de hembras) y la información climática obtenida (temperatura, humedad relativa ambiente y precipitaciones) se exploró mediante el coeficiente de correlación de Spearman ($p= 0.05$). La diferencia entre cohortes de una misma localidad en cuanto a presencia / ausencia de ninfas y hembras de garrapatas en cada ternero se analizó mediante tablas de contingencia (Chi-cuadrado). Las diferencias entre intensidad de parasitación se evaluaron mediante una prueba t de Student. Debido al tiempo necesario para montar una respuesta humoral detectable por el ELISA, el análisis de este parámetro se realizó desfasando un mes el resultado con respecto a los valores relativos a garrapatas, es decir, los resultados de ELISA de cada muestreo se compararon con las cuentas de garrapatas del mes anterior. Los resultados de PCR se compararon con las cuentas de garrapatas del mismo mes de muestreo.

Para la comparación de las tasas de incidencia estimadas tanto por PCR como por ELISA entre las dos localidades y entre las dos cohortes estudiadas para una misma localidad se realizó un análisis de supervivencia mediante el test de Kaplan-Meier, empleando el estadístico de Breslow. Este análisis tiene en cuenta la edad de cada individuo al momento de la infección. Como variable independiente dicotómica se utilizó el estatus positivo / negativo a cada prueba diagnóstica aplicada hasta los nueve meses de edad de los animales, momento en que se considera que se pierde la resistencia innata.

Luego de analizar los resultados de supervivencia se indagó en los factores relativos a garrapatas que pudieran explicar diferencias en las tasas de incidencia entre localidades y entre cohortes tomando como variable respuesta tanto los resultados de ELISA como los de PCR. Con este fin se realizaron análisis de contingencia estratificados por localidades y cohortes. Las variables independientes consideradas fueron presencia / ausencia de ninfas de *R. (B.) microplus*, presencia / ausencia de hembras de *R. (B.) microplus* (Chi-cuadrado), cantidad de hembras de *R. (B.) microplus* (T-student). La magnitud y dirección de las asociaciones se estimó mediante la razón de productos cruzados u *odds ratio* (OR). Las variables significativamente asociadas ($p<0,5$) se sometieron a un análisis de regresión logística.

RESULTADOS

Los muestreos en AT para la cohorte 1 se realizaron desde septiembre de 2006 hasta septiembre de 2007 y para la cohorte 2, desde agosto de 2007 hasta septiembre de 2008. En VA las actividades relativas a la cohorte 1 tuvieron lugar desde octubre de 2006 hasta noviembre de 2007 y las de la cohorte 2, desde noviembre de 2007 hasta octubre de 2008. En AT no se realizó el muestreo correspondiente a junio de 2008, pero para ese momento ya se había detectado infección por *B. bigemina* en todos los animales bajo estudio. En VA no se realizó el muestreo correspondiente a noviembre de 2006. En el muestreo posterior no se encontraron cambios en ningún parámetro evaluado con respecto al muestreo anterior, por lo que la falta de este muestreo no se consideró relevante para el análisis. Los grupos de terneros se empezaron a armar con los primeros animales disponibles en cada temporada de parición y se completó el número necesario durante las visitas sucesivas. Por este motivo la cantidad de terneros puede diferir entre muestreos de una misma cohorte, así como también puede diferir la cantidad de muestreos entre cohortes. Las fechas y el número de terneros correspondientes a cada cohorte y localidad se muestran en las tablas 3.1 (AT) y 3.2 (VA). A los fines de facilitar la comparación entre localidades y cohortes, todos los gráficos se realizaron abarcando el período total de trabajo, desde septiembre de 2006 hasta octubre de 2008.

Las variables climáticas obtenidas en AT y VA, así como las registradas en la estación meteorológica de la EEA INTA Sáenz Peña, se muestran en la figura 3.1. En la figura 3.1.C se observa la marcada estacionalidad de las lluvias, concentradas en primavera y verano y escasas o inexistentes en los meses de invierno.

Las tablas 3.1 y 3.2 muestran los tratamientos acaricidas y cambios de parcelas junto a los porcentajes de prevalencia de larvas, ninfas y hembras de *R. (B) microplus*, así como la abundancia media y la intensidad media de parasitación por hembras de esta garrapata para cada cohorte en AT y VA respectivamente. Para la cohorte 1 de AT no se registró la información sobre presencia de larvas.

En la cohorte 1 de AT se aplicaron tres tratamientos acaricidas. El 17/01/2007 se aplicó una avermectina 1%, el 18/03/2007 se aplicó una avermectina de larga acción combinada con un organofosforado por derrame dorsal y el 12/09/07 se aplicó una avermectina 1%. Al momento del destete se realizó un cambio de parcela, coincidente con el tratamiento del 18/03/2007. La cohorte 2

recibió también tres tratamientos. Se aplicó una avermectina 1% al nacimiento, una avermectina larga acción el 14/01/2007 y una avermectina de larga acción combinada con un piretroide por aspersión el 08/04/2008. El tratamiento del 14/01/2007 coincidió con un cambio de parcela relativo al destete.

En VA la cohorte 1 experimentó cuatro cambios de parcela (10/02/2007, 10/05/2007, 01/07/2007 y 05/09/2007) sin tratamientos acaricidas intermedios y se le aplicaron dos tratamientos acaricidas mediante baño de inmersión con piretroides (01/10/2007 y 15/11/2007). La cohorte 2 recibió cinco tratamientos. Se realizó un baño de inmersión con piretroides el 12/11/2007 y otro el 16/02/2008. El 18/03/2008 se aplicó una avermectina 1%, el 04/07/2008 una avermectina 1% combinada con un piretroide por derrame dorsal y el 17/09/2008 se aplicó una avermectina 3,15%. Este último tratamiento coincidió con un cambio de parcela.

En AT la proporción de terneros con ninfas y hembras de garrapatas fue significativamente superior ($p < 0,001$) para la cohorte 1 que para la cohorte 2. De igual forma la intensidad de parasitación o cantidad de garrapatas por ternero parasitado fue superior para la primera cohorte ($p < 0,001$). En VA se observó una situación diferente ya que tanto la proporción de terneros con ninfas o hembras como la intensidad de parasitación fue significativamente mayor ($p < 0,001$) para la cohorte 2 que para la cohorte 1. La prevalencia de ninfas y adultos para ambas cohortes y de larvas para la cohorte 2 en AT se graficó en la figura 3.2. La prevalencia de larvas, ninfas y hembras para ambas cohortes en VA se graficó en la figura 3.3. La figura 3.4 muestra la relación de la intensidad media y la abundancia media de hembras de garrapatas para cada cohorte de ambas localidades. Para preservar una escala que permita la comparación entre gráficos el eje de ordenadas se restringió a la cifra de 20 garrapatas, quedando fuera del gráfico los valores de intensidad y abundancia para mayo y septiembre del 2008 en VA, los cuales se observan en la tabla 3.2.

En la figura 3.2 se observa que en AT tanto la prevalencia de ninfas como de hembras alcanzó niveles altos desde octubre a febrero y desde mayo a julio y fue nula durante marzo y abril del primer año evaluado. En el segundo año se observa una situación más fluctuante. Las larvas mostraron picos puntuales de prevalencia en octubre, diciembre, febrero y mayo, aunque en magnitudes decrecientes. No hay información sobre la situación del mes de junio, pero de los valores adoptados por la población de ninfas y hembras se puede inferir que también hubo un pico de prevalencia en dicho mes. En efecto, las ninfas tuvieron picos en octubre, diciembre y febrero, pero expresaron una

alta prevalencia también agosto. Mientras tanto para los adultos se observan aumentos de la prevalencia de octubre a diciembre, de febrero a abril y de mayo a septiembre. En este caso la curva muestra variaciones mensuales menos abruptas que para las larvas y ninfas. La intensidad y la abundancia media de hembras, graficadas en la figura 3.4.A, muestran para la cohorte 1, una curva ascendente desde septiembre, con un pico en diciembre y que desciende paulatinamente hasta febrero y otra curva a partir de mayo que alcanza su máximo en julio. En la cohorte 2 se dio un primer pico de escasa magnitud en noviembre y diciembre, otro pico en marzo, otro en mayo y otro en julio y agosto.

En VA, según se observa en la figura 3.3, durante el primer año las larvas y las ninfas tuvieron picos de prevalencia en enero, marzo y octubre mientras que las hembras mostraron picos en enero, marzo y mayo, aunque de escasa magnitud. Durante el segundo año la prevalencia de larvas aumentó en enero, mientras que la de las ninfas y hembras lo hizo en diciembre. Todos los estadios experimentaron un pico máximo en mayo y otro en septiembre. Como se observa en la figura 3.4.B. la intensidad y la abundancia medias tuvieron picos durante el primer año en enero, marzo y mayo aunque de baja magnitud y durante el segundo año adoptaron valores bajos hasta abril, para crecer bruscamente en mayo, descender en julio y agosto para hacer un nuevo pico en septiembre y desaparecer en octubre.

La relación s^2M/M demostró una distribución al azar o de Poisson para la cohorte 1 de AT, es decir que las garrapatas estuvieron distribuidas aleatoriamente entre todos los terneros, mientras la cohorte 2 y las dos cohortes de VA evidenciaron una distribución agregada, en la que la mayoría de las garrapatas parasitaba pocos terneros (Figura 3.5). El índice de discrepancia obtenido en AT para la cohorte 1 fue de 0,275 y para la cohorte 2, 0,445. En VA este parámetro alcanzó un valor de 0,752 para la cohorte 1 y de 0,290 para la cohorte 2.

Las tablas 3.3 y 3.4 muestran los resultados relativos a la dinámica de infección por *B. bigemina* y la conversión serológica en cada cohorte evaluada en AT y VA respectivamente. La relación de *P* e *IA* serológicas así como la *IA* obtenida con los resultados de PCR para cada cohorte y cada localidad se observa en la figura 3.6. En la cohorte 1 de AT se observó que para el mes de enero todos los animales se habían infectado, de acuerdo a la *IA* calculada con los resultados de la prueba de PCR. La *IA* obtenida mediante serología mostró un comportamiento similar, aunque

desfasada un mes con respecto a la anterior. A pesar de haberse detectado infección y conversión de anticuerpos en todos los animales evaluados, la P serológica no fue del 100% en ningún muestreo. Este parámetro aumentó en forma gradual hasta enero y se mantuvo constante hasta abril, momento en que descendió para volver a aumentar en julio. En la cohorte 2 el comportamiento de las tres variables fue similar al descrito para la cohorte 1, pero la máxima IA se alcanzó en marzo y abril para los resultados de PCR y serología, respectivamente. En este caso la P también acompañó a la IA y al igual que para la cohorte 1, descendió en abril para aumentar nuevamente en julio. En VA se observó una situación diferente ya que para la cohorte 1 hubo evidencias de infección recién en el mes de febrero, momento en que aumentó la IA por PCR. A partir de marzo ésta se mantuvo constante hasta septiembre, cuando se detectaron nuevas infecciones. La IA calculada a partir de los resultados del ELISA se comportó de manera similar aunque de manera más gradual. En esta cohorte no se infectaron el 100% de los animales bajo estudio. La P serológica fue variable, mostrando picos en abril, agosto y noviembre. La cohorte 2 evidenció un aumento constante de los tres parámetros evaluados desde diciembre hasta que se detectó infección en todos los animales en el mes de septiembre.

La figura 3.7 muestra la relación de h estimada sobre P e IA serológicas e IA obtenida por PCR para cada cohorte y localidad con el valor crítico de $h = 0,005$. Para preservar una escala que permita la comparación entre los gráficos el eje de ordenadas se restringió a $h = 0,025$, por lo que algunos valores máximos extremos no están representados. Estos valores pueden encontrarse en las tablas 3.3 y 3.4. En AT, para las dos cohortes evaluadas, la tasa de inoculación estimada sobre la IA por ELISA y PCR superó el valor crítico y se mantuvo por encima de este hasta el final de estudio, lo que significa que ambas tropas alcanzaron la estabilidad enzoótica para *B. bigemina*. Cuando se estimó h a partir de la P serológica en cambio, se observó una curva fluctuante que descendió incluso hasta niveles correspondientes a la inestabilidad enzoótica. En la cohorte 1 de VA la tasa de inoculación estimada sobre la base de la IA por PCR ascendió hasta superar el umbral crítico en marzo pero luego descendió y permaneció por debajo de ese valor hasta el final del estudio. Solamente en el último muestreo los valores de h estimados sobre la IA y la P serológicas alcanzaron nuevamente dicho valor, aunque la tropa se consideró en inestabilidad ya que este evento ocurrió después de los 9 meses de vida de los animales evaluados. La cohorte 2 alcanzó la

estabilidad ya que la *IA* estimada por PCR superó el valor crítico el mes anterior a que los terneros alcancen los 9 meses de vida, aunque los valores de *IA* y *P* serológicas solo lo hicieron uno y dos meses después respectivamente.

Los resultados del análisis de sobrevivencia en función de las localidades bajo estudio se muestran en la figura 3.8, mientras que el análisis en función de las cohortes estudiadas se presenta en la figura 3.9. Los resultados obtenidos para la cohorte 1 mediante la prueba de PCR así como la de ELISA muestran que el ritmo de infección fue significativamente diferente entre localidades ($p < 0,001$). Mediante PCR se detectó que en AT los animales se infectaron en promedio en 81 días (IC = 71,5 – 89,9) y antes de los nueve meses fueron todos positivos mientras que en VA el 37,9% de los animales permaneció negativo pasado ese periodo de tiempo, requiriendo en promedio 204 días (IC = 184,3 – 224,2) para adquirir la infección (Fig. 3.8.A). En cuanto a la conversión serológica evaluada mediante la prueba de ELISA, en AT el 96,4 % de los animales eran positivos a los 9 meses de edad, requiriendo en promedio 119 días (IC = 104,8 – 132,8) para la seroconversión, mientras que en VA requirieron en promedio 250 días (IC = 236,7 – 262,2) y solamente fueron positivos al ELISA el 31% de los animales a los 9 meses (Fig. 3.8.B). El ritmo de infección resultó significativamente diferente ($p < 0,001$) entre localidades también para la cohorte 2 tanto en la prueba de PCR como la de ELISA. Mediante la primera prueba se detectó que en AT todos los animales evaluados se infectaron antes de los nueve meses, con promedio de 132 días (IC = 114,4 – 150,2) de edad al momento de la infección. En VA, a los nueve meses aun quedaban 20,7% de los terneros negativos y los que se infectaron lo hicieron, en promedio, a los 222 días (IC = 204,3 – 240,7) de vida (Fig. 3.8.C). La prueba de ELISA mostró que a los nueve meses solo quedaba el 3,3% de los animales de AT negativos mientras que en VA se encontraba en esa situación el 27,6% de los terneros. Los animales requirieron 139 días (IC = 122,8 – 155,6) y 221 días (IC = 201,9 – 240,1) en promedio para ser positivos al ELISA en AT y VA respectivamente (Fig. 3.8.D).

Cuando se analizó lo sucedido en AT en función del año considerado la tasa de infección resultó ser superior para la cohorte 1 respecto de la cohorte 2, siendo las diferencias significativas, tanto para la prueba de PCR ($p < 0,001$) (Fig. 3.9.A) como la de ELISA ($p = 0,047$) (Fig. 3.9.B). En VA, mediante la prueba de PCR se observó que el tiempo promedio para que los animales se infecten fue menor para la cohorte 1 que para la cohorte 2 pero al final del estudio la proporción de animales

positivos fue mayor el segundo año (Fig 3.9.C). Estas diferencias, sin embargo no resultaron estadísticamente significativas ($p = 0,517$). Mediante la prueba de ELISA si se detectó una diferencia significativa ($p = 0,003$) en la velocidad de infección, siendo esta mas lenta para la cohorte 1 que para la cohorte 2, resultando también menor la cantidad de animales seropositivos para la cohorte 1 al final de periodo evaluado (Fig 3.9.D).

En cuanto al análisis los factores relativos a garrapatas que puedan ser determinantes de infección se observó que en AT, independientemente del año bajo estudio, la presencia de hembras y de ninfas estuvo significativamente asociada con la positividad del PCR. A la regresión logística resultó que el año y la presencia de garrapatas estuvieron significativamente asociadas a la positividad de PCR ($p = 0,003$ y $p = 0,004$) pero no el número de hembras o la presencia de ninfas. También se encontró relación significativa entre la presencia de hembras y los resultados del ELISA en las dos cohortes evaluadas. A la regresión logística, solamente la presencia de hembras estuvo asociada significativamente con el resultado del ELISA ($p = 0,014$). Tanto el número de hembras como el año de estudio no resultaron asociados con la positividad al ELISA ($p = 0,067$ y $p = 0,478$ respectivamente). En VA, independientemente del año de estudio, la presencia de hembras en los animales estuvo asociada con la positividad al PCR. La presencia de ninfas estuvo asociada a un resultado positivo de PCR solamente en el segundo año. A la regresión, el número de hembras ($p = 0,03$) y la presencia de hembras ($p < 0,001$) resultaron significativamente asociadas a la positividad del PCR. La magnitud de la significancia es muy superior para presencia de hembras comparada con el número de hembras, evidenciado por el OR. Con respecto al ELISA, la presencia de hembras estuvo asociada con la positividad del ELISA solamente en el año dos. A la regresión logística, tanto el año de estudio como la presencia de hembras estuvieron significativamente asociadas al ELISA ($p < 0,001$). No así el número de hembras, que resultó no significativo.

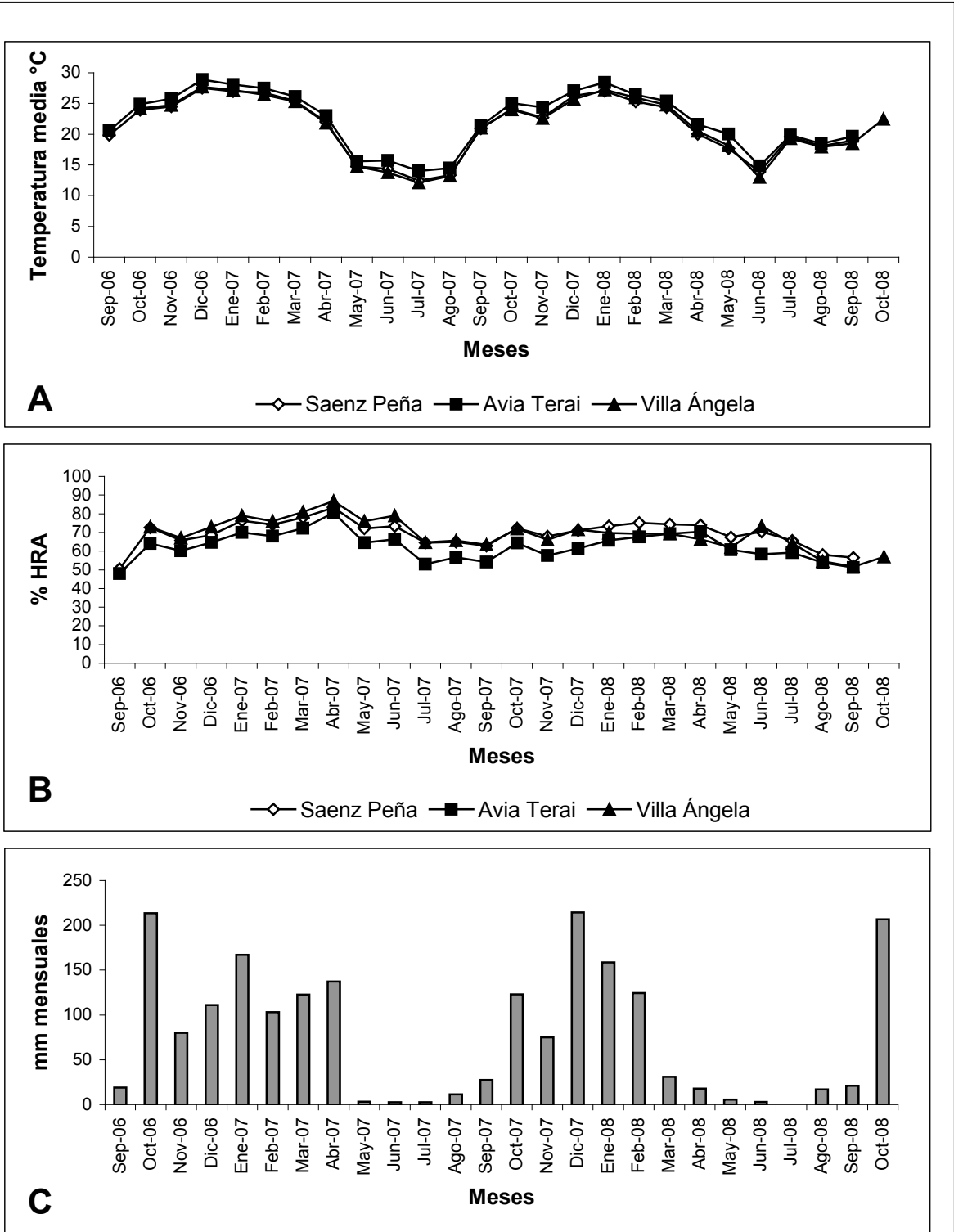


Figura 3.1 A) Temperatura media mensual (°C) y B) Humedad relativa ambiente (%) registradas en Avia Terai, Villa Ángela y EEA INTA Sáenz Peña. C) Precipitaciones mensuales (mm) registradas en la estación meteorológica de EEA INTA Sáenz Peña.

Tabla 3.1 Avia Terai. Prevalencia (%) de larvas y ninfas y prevalencia (%), abundancia media e intensidad media de hembras de *R. (B.) microplus* en dos cohortes consecutivas de terneros.

Cohorte	Fecha muestreo	n Terneros	Prevalencia larvas (%)	Prevalencia ninfas (%)	Prevalencia hembras (%)	Abundancia media (DE)	Intensidad media (DE)
Cohorte 1	06-09-06	15	sm	60,0	40,0	2,1 (3,2)	5,3 (2,9)
	12-10-06	28	sm	53,6	42,9	2,4 (5,9)	5,6 (8,1)
	09-11-06	27	sm	100	77,8	4,1 (5,3)	5,3 (5,5)
	12-12-06	28	sm	100	96,4	9,4 (8,5)	9,8 (8,4)
	17-01-07	28	sm	85,7	92,9	5,8 (5,4)	6,3 (5,3)
	<u>21-02-07</u>	28	sm	82,1	42,9	1,9 (3,0)	3,0 (1,9)
	21-03-07	28	sm	0	0	0	0
	10-04-07	27	sm	0	0	0	0
	22-05-07	28	sm	82,1	60,7	2,4 (4,2)	3,9 (4,8)
	20-06-07	26	sm	73,1	88,5	5,2 (3,8)	5,8 (3,5)
	18-07-07	26	sm	0	88,5	15,6 (11,9)	17,7 (11,1)
	<u>22-08-07</u>	26	sm	0	50,0	1,5 (2,0)	2,9 (1,9)
	19-09-07	11	sm	0	18,2	1,0 (2,7)	5,5 (4,9)
	Cohorte 2	22-08-07	12	0	0	0	0
19-09-07		21	0	0	0	0	0
17-10-07		30	66,7	66,7	13,3	0,1 (0,3)	1,0 (0)
28-11-07		30	6,7	20,0	33,3	0,6 (1,2)	1,8 (1,6)
<u>19-12-07</u>		30	16,7	46,7	30,0	0,6 (1,2)	2,1 (1,4)
30-01-08		30	10,0	0	0	0	0
20-02-08		29	58,6	58,6	17,2	0,8 (2,5)	4,4 (4,9)
<u>12-03-08</u>		29	0	34,5	34,5	5,0 (10,9)	14,5 (12,0)
24-04-08		28	7,1	0	17,9	0,2 (0,5)	1,2 (0,4)
28-05-08		28	50,0	10,7	50,0	2,3 (5,8)	4,6 (2,1)
18-06-08		sm	sm	sm	sm	sm	sm
23-07-08		28	28,6	39,3	85,7	9,2 (8,0)	10,8 (8,0)
15-08-08		17	5,9	64,7	88,2	5,4 (4,5)	6,1 (4,4)
17-09-08		5	20,0	60,0	60,0	0,6 (0,5)	1,0 (0)

Prevalencia = cantidad de animales parasitados / cantidad total de animales muestreados.

Abundancia media = cantidad total de garrapatas / cantidad total de animales muestreados.

Intensidad media = cantidad total de garrapatas / cantidad de animales parasitados.

Líneas entre las fechas de muestreo indican tratamiento acaricida entre dos fechas.

Doble línea indica tratamiento acaricida y cambio de parcela.

La presencia de larvas no se registró para la cohorte 1.

El 18-06-08 no se realizó el muestreo.

Tabla 3.2 Villa Ángela. Prevalencia (%) de larvas y ninfas y prevalencia (%), abundancia media e intensidad media de hembras de *R. (B.) microplus* en dos cohortes consecutivas de terneros.

Cohorte	Fecha muestreo	n Terneros	Prevalencia larvas (%)	Prevalencia ninfas (%)	Prevalencia hembras (%)	Abundancia media (DE)	Intensidad media (DE)
Cohorte 1	12-10-06	5	0	0	0	0	0
	09-11-06	sm	sm	sm	sm	sm	sm
	12-12-06	28	0	0	0	0	0
	17-01-07	29	62,1	65,5	20,7	0,9 (2,4)	4,0 (3,9)
	21-02-07	29	0	31,0	6,9	0,1 (0,3)	1,0 (0)
	21-03-07	27	40,7	44,4	48,1	0,9 (1,8)	2,0 (2,3)
	03-05-07	29	24,1	24,1	3,4	0,0 (0,2)	1,0 (0)
	22-05-07	28	0	21,4	46,4	5,4 (11,7)	11,3 (15,0)
	20-06-07	27	0	3,7	11,1	0,2 (0,6)	1,7 (1,2)
	18-07-07	28	0	0	14,3	0,4 (1,1)	2,5 (1,9)
	22-08-07	29	0	0	0	0	0
	19-09-07	29	48,3	31,0	0	0	0
	17-10-07	29	100	100	0	0	0
	27-11-07	24	45,8	66,7	20,8	0,2 (0,4)	1,0 (0)
Cohorte 2	27-11-07	27	0	0	0	0	0
	20-12-07	27	3,7	66,7	22,2	0,5 (1,2)	2,2 (1,6)
	29-01-08	29	37,9	51,7	10,3	0,1 (0,3)	1,0 (0)
	19-02-08	29	17,2	13,8	13,8	0,3 (1,3)	2,5 (3,0)
	18-03-08	27	59,3	81,5	18,5	0,4 (1,2)	2,3 (2,5)
	22-04-08	27	74,1	88,9	85,2	4,1 (7,6)	5,0 (8,2)
	27-05-08	29	100	100	100	50,1 (34,6)	50,1 (34,6)
	17-06-08	29	10,3	65,5	89,7	14,6 (8,7)	16,3 (7,6)
	22-07-08	29	6,9	3,4	48,3	2,3 (3,9)	4,8 (4,5)
	14-08-08	29	0	0	55,2	1,4 (2,1)	2,6 (2,3)
	16-09-08	25	100	92,0	100	35,7 (35,4)	35,7 (35,4)
	15-10-08	24	0	0	0	0	0

Prevalencia = cantidad de animales parasitados / cantidad total de animales muestreados.

Abundancia media = cantidad total de garrapatas / cantidad total de animales muestreados.

Intensidad media = cantidad total de garrapatas / cantidad de animales parasitados.

Líneas entre las fechas de muestreo indican un evento entre dos fechas. Línea continua = tratamiento acaricida; línea cortada = cambio de parcela; doble línea, tratamiento y cambio de parcela.

El 09-11-06 no se realizó el muestreo.

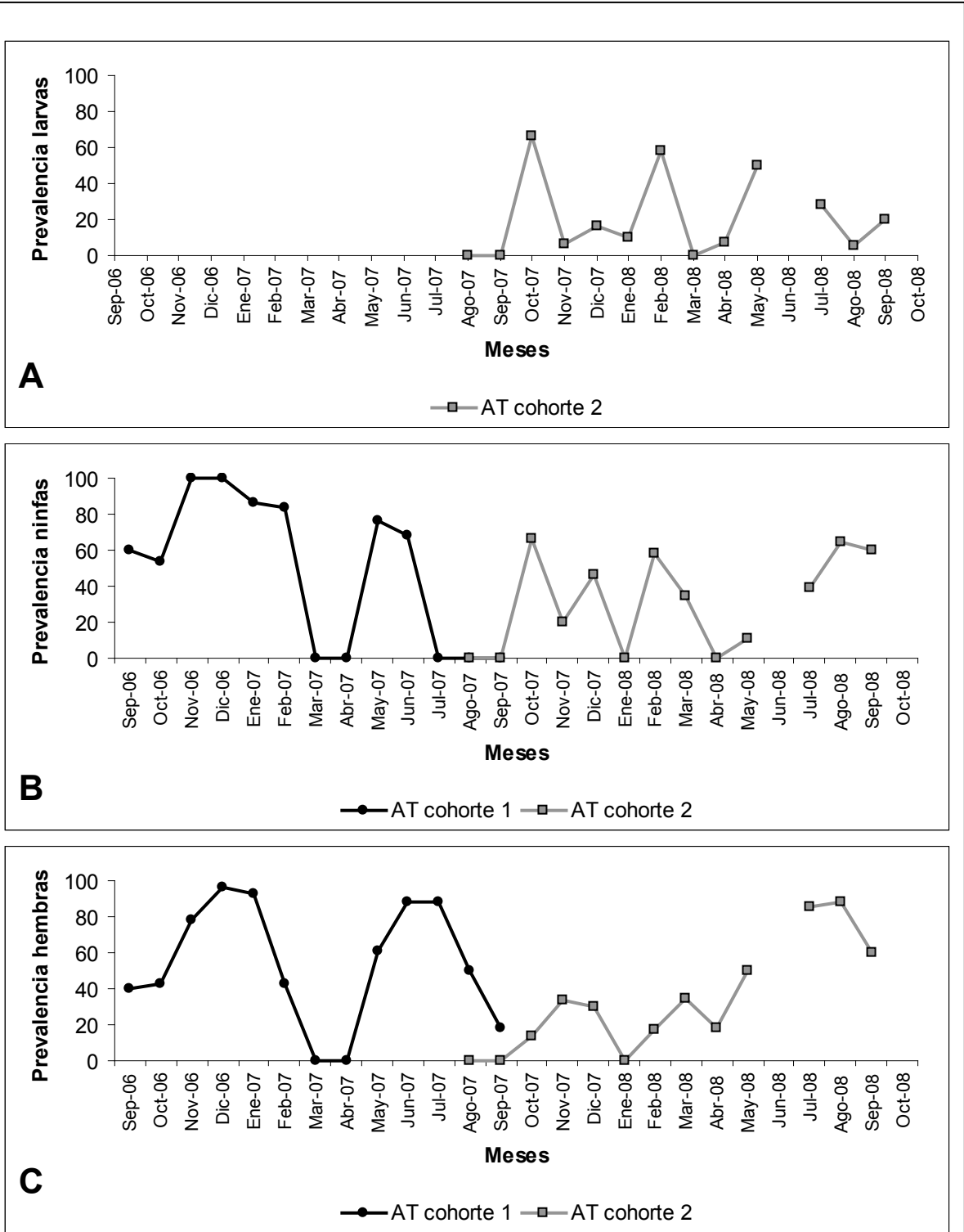


Figura 3.2 Avia Terai. Prevalencia de parasitación por A) larvas, B) ninfas y C) hembras de *R.* (B.) *microplus* en dos cohortes consecutivas de terneros. Para la primera cohorte no se obtuvo información relativa a las larvas. En junio de 2008 no se obtuvieron muestras.

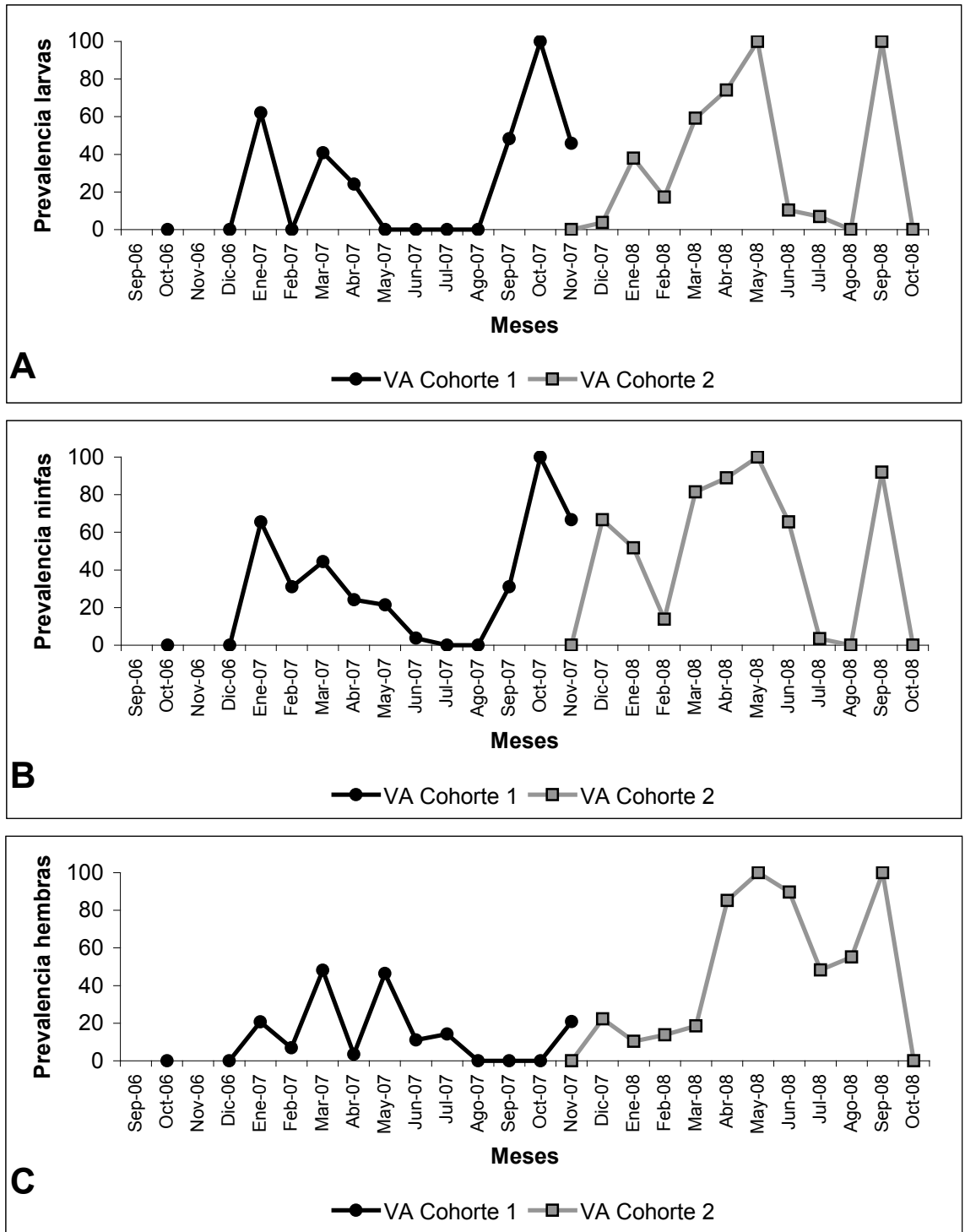


Figura 3.3 Villa Ángela. Prevalencia de parasitación por A) larvas, B) ninfas y C) hembras de *R.* (B.) *microplus* en dos cohortes consecutivas de terneros. En noviembre de 2006 no se obtuvieron muestras.

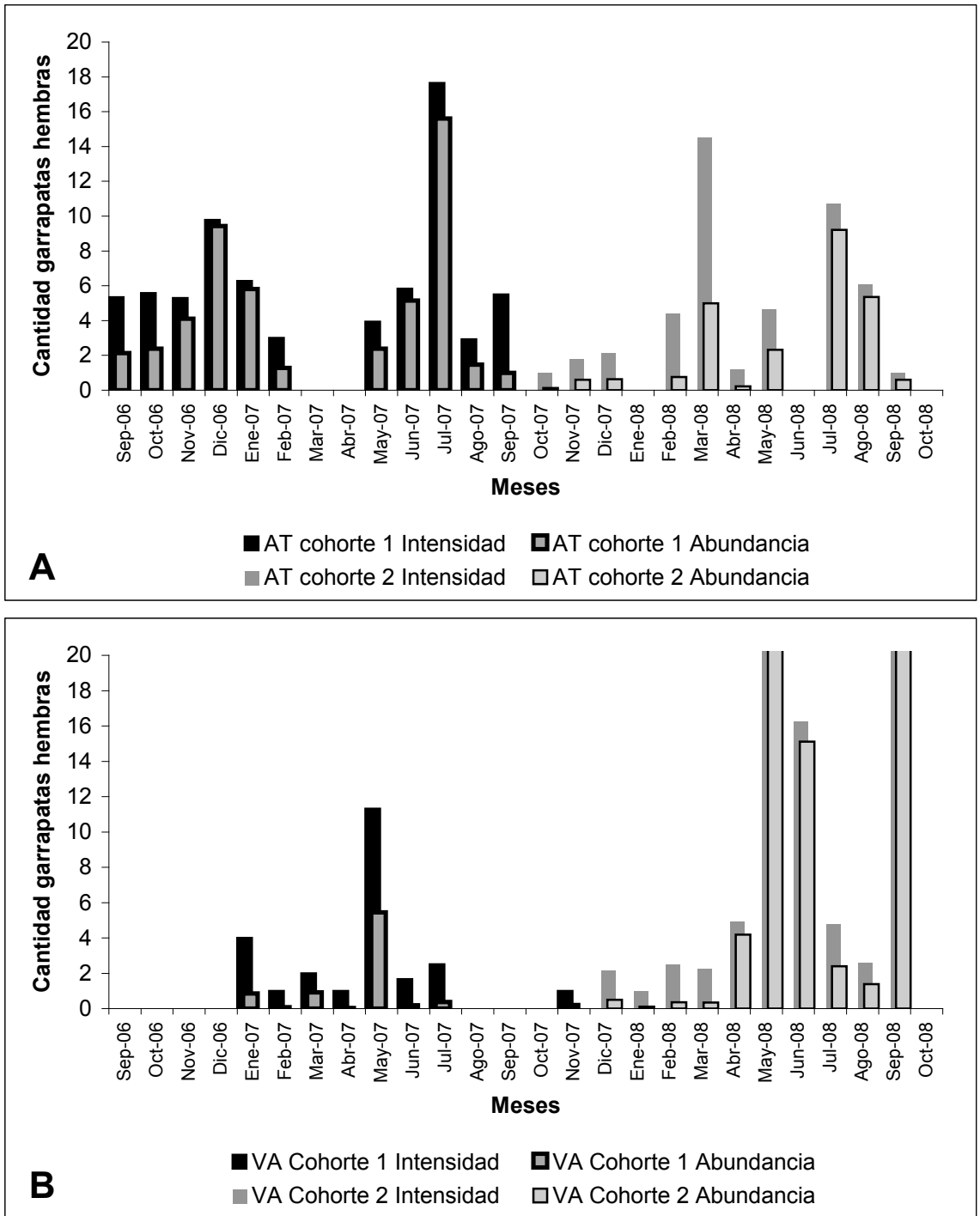


Figura 3.4 Intensidad media y abundancia media de la parasitación por hembras de *R. (B.) microplus* en dos cohortes consecutivas de terneros en A) Avia Terai y B) Villa Ángela.

Intensidad media = cantidad total de garrapatas / cantidad de animales parasitados

Abundancia media = cantidad total de garrapatas / cantidad total de animales muestreados

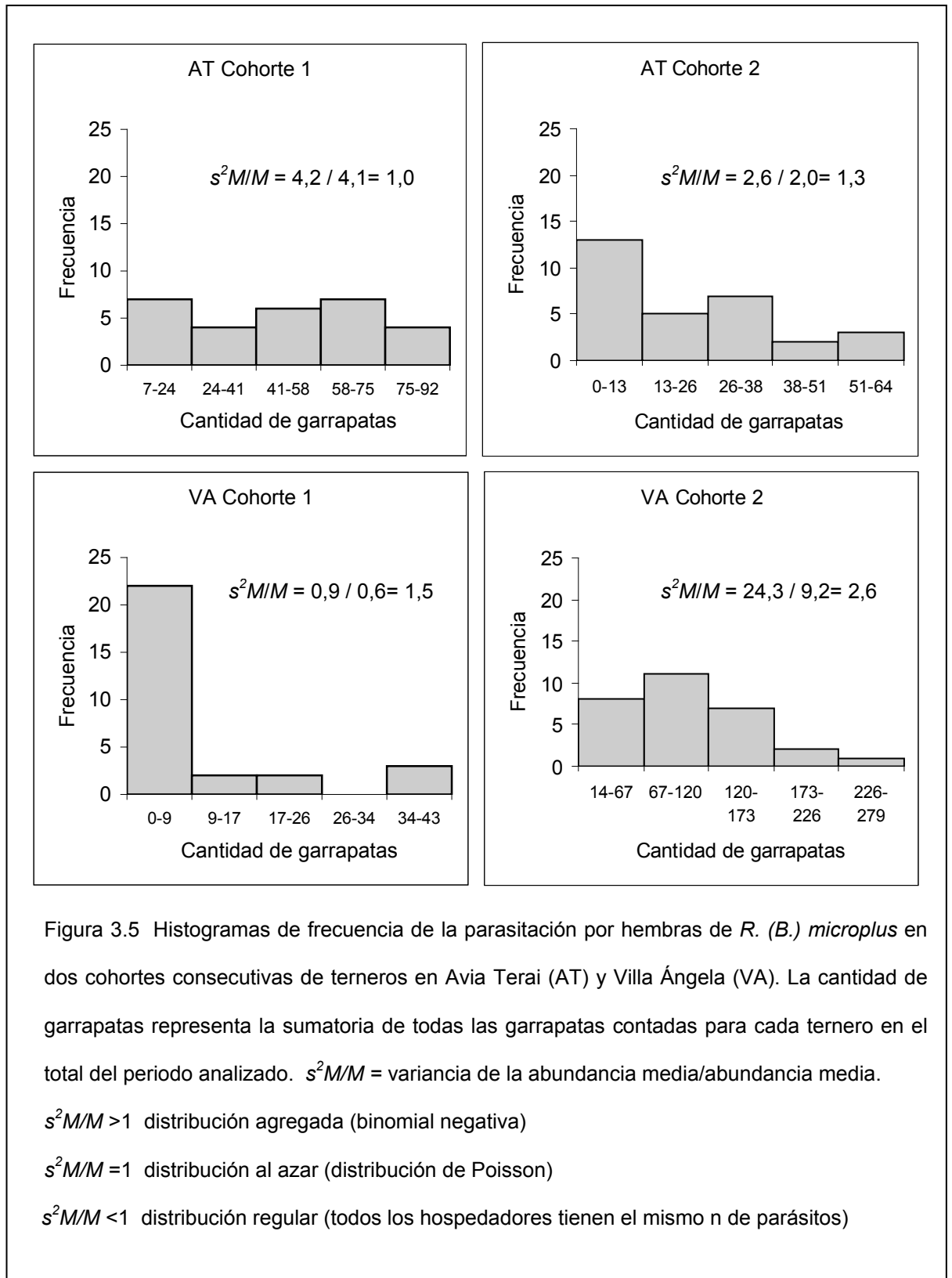


Tabla 3.3 Avia Terai. Prevalencia serológica (%) (*P*) estimado mediante la prueba de ELISA, incidencia acumulada (*IA*) estimada mediante las pruebas de ELISA y PCR y tasa de inoculación (*h*) estimada para los parámetros anteriores en dos cohortes consecutivas de terneros.

Cohorte	Fecha muestreo	n Terneros	Edad (días)	<i>P</i> ELISA (%)	<i>IA</i> ELISA	<i>IA</i> PCR	<i>h P</i> ELISA	<i>h IA</i> ELISA	<i>h IA</i> PCR
Cohorte 1	06-09-06	15	37	0	0	0	0.0000	0.0000	0.0000
	12-10-06	28	52	4	4	32	0.0007	0.0007	0.0074
	09-11-06	27	80	26	26	81	0.0037	0.0037	0.0211
	12-12-06	28	113	79	79	93	0.0136	0.0136	0.0233
	17-01-07	28	149	93	96	100	0.0177	0.0223	0.1081
	21-02-07	28	184	93	100		0.0143	0.0875	
	21-03-07	28	212	93			0.0124		
	10-04-07	27	232	67			0.0047		
	22-05-07	28	274	75			0.0051		
	20-06-07	26	303	42			0.0018		
	18-07-07	26	331	96			0.0098		
	22-08-07	26	366	81			0.0045		
	19-09-07	11	369	91			0.0065		
Cohorte 2	22-08-07	12	33	0	0	0	0.0000	0.0000	0.0000
	19-09-07	21	47	0	0	0	0.0000	0.0000	0.0000
	17-10-07	30	61	0	0	3	0.0000	0.0000	0.0006
	28-11-07	30	103	37	37	50	0.0044	0.0044	0.0067
	19-12-07	30	124	60	60	67	0.0074	0.0074	0.0089
	30-01-08	30	166	90	90	77	0.0139	0.0139	0.0088
	20-02-08	29	187	90	93	97	0.0121	0.0143	0.0180
	12-03-08	29	208	97	97	100	0.0162	0.0162	0.0443
	24-04-08	28	251	86	100		0.0078	0.0367	
	28-05-08	28	285	61			0.0033		
	18-06-08	sm	sm	sm			sm		
	23-07-08	28	341	93			0.0077		
	15-08-08	17	347	94			0.0082		
17-09-08	5	364	100			0.0317			

Tabla 3.4 Villa Ángela. Prevalencia serológica (%) (*P*) estimado mediante la prueba de ELISA, incidencia acumulada (*IA*) estimada mediante las pruebas de ELISA y PCR y tasa de inoculación (*h*) estimada para los parámetros anteriores en dos cohortes consecutivas de terneros.

Cohorte	Fecha muestreo	n Terneros	Edad (días)	<i>P</i> ELISA (%)	<i>IA</i> ELISA	<i>IA</i> PCR	<i>h P</i> ELISA	<i>h IA</i> ELISA	<i>h IA</i> PCR
Cohorte 1	12-10-06	5	25	0	0	0	0.0000	0.0000	0.0000
	09-11-06	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm
	12-12-06	28	71	0	0	0	0.0000	0.0000	0.0000
	17-01-07	29	107	0	0	0	0.0000	0.0000	0.0000
	21-02-07	29	142	0	0	31	0.0000	0.0000	0.0026
	21-03-07	27	170	15	14	59	0.0009	0.0009	0.0052
	03-05-07	29	213	24	28	59	0.0013	0.0015	0.0041
	22-05-07	28	232	21	31	59	0.0010	0.0016	0.0038
	20-06-07	27	261	7	31	59	0.0003	0.0014	0.0034
	18-07-07	28	289	32	41	59	0.0013	0.0018	0.0031
	22-08-07	29	324	48	59	59	0.0020	0.0027	0.0027
	19-09-07	29	352	21	59	59	0.0007	0.0025	0.0025
	17-10-07	29	380	21	69	62	0.0006	0.0031	0.0026
27-11-07	24	419	88	97	83	0.0050	0.0080	0.0042	
Cohorte 2	27-11-07	27	91	0	0	0	0.0000	0.0000	0.0000
	20-12-07	27	114	7	7	7	0.0007	0.0007	0.0007
	29-01-08	29	149	21	28	24	0.0016	0.0022	0.0019
	19-02-08	29	170	24	31	28	0.0016	0.0022	0.0019
	18-03-08	27	198	41	41	38	0.0026	0.0027	0.0024
	22-04-08	27	233	37	45	48	0.0020	0.0026	0.0028
	27-05-08	29	268	62	69	90	0.0036	0.0044	0.0085
	17-06-08	29	289	72	79	97	0.0045	0.0054	0.0116
	22-07-08	29	324	90	93	97	0.0070	0.0083	0.0104
	14-08-08	29	347	90	93	97	0.0065	0.0077	0.0097
	16-09-08	25	380	92	93	100	0.0066	0.0070	0.0303
15-10-08	24	409	96	97		0.0078	0.0082		

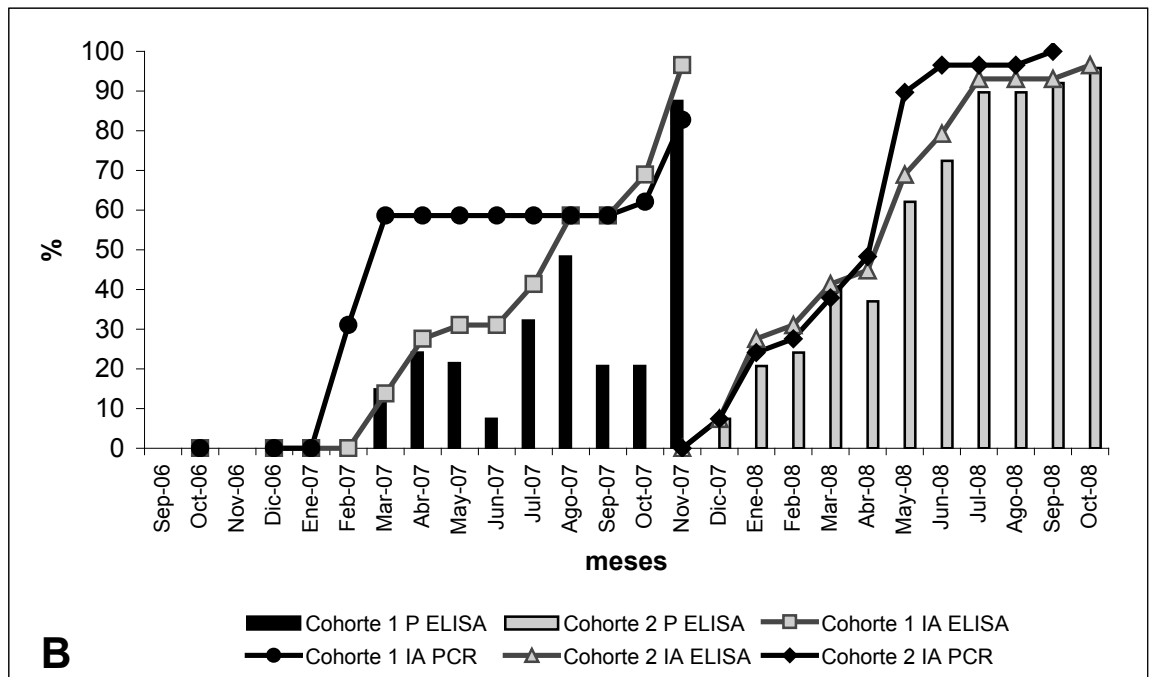
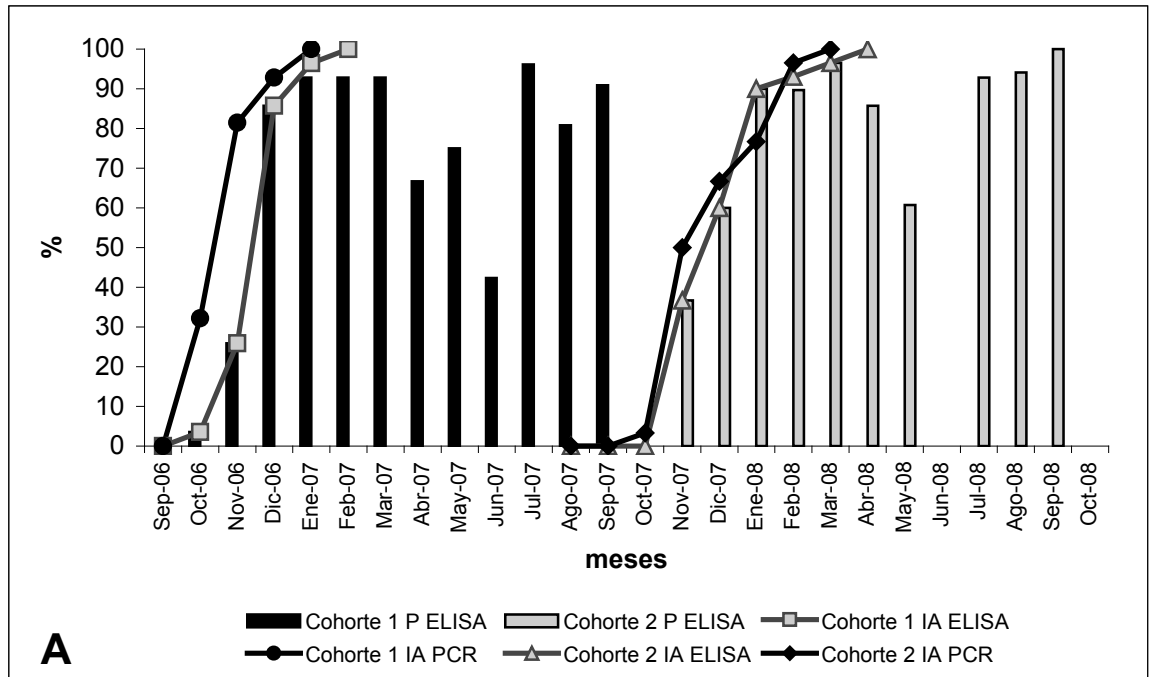


Figura 3.6 Prevalencia (%) (P) e incidencia acumulada (IA) por ELISA e incidencia acumulada por PCR en dos cohortes consecutivas de terneros en A) Avia Terai y B) Villa Ángela.

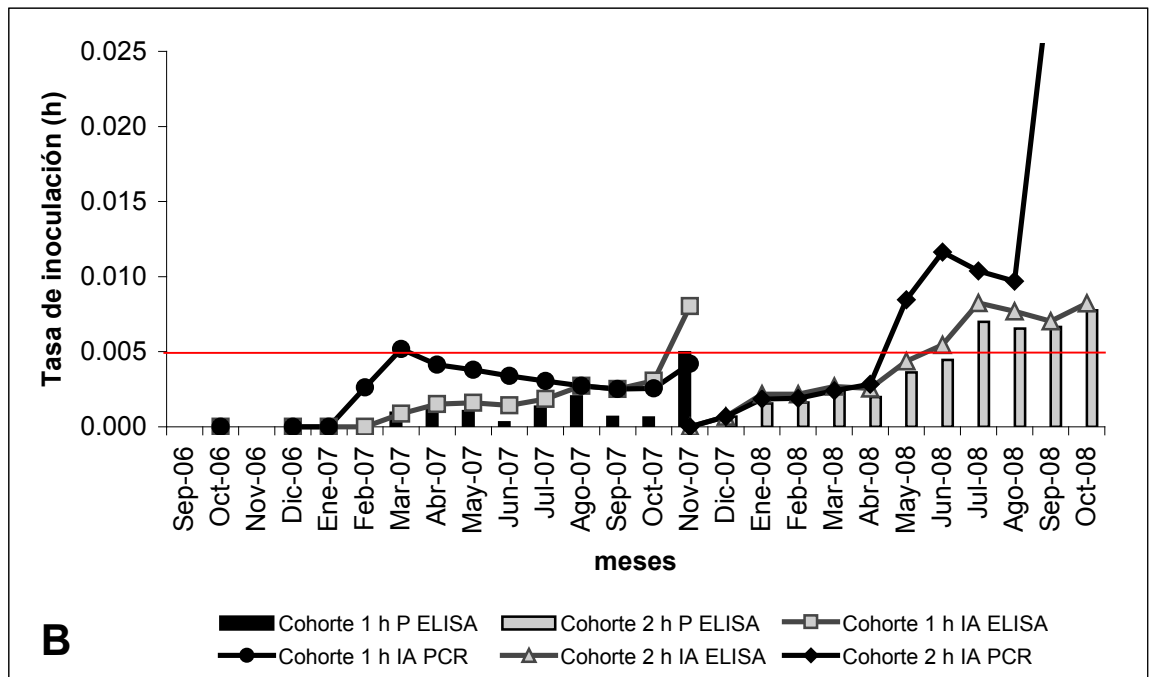
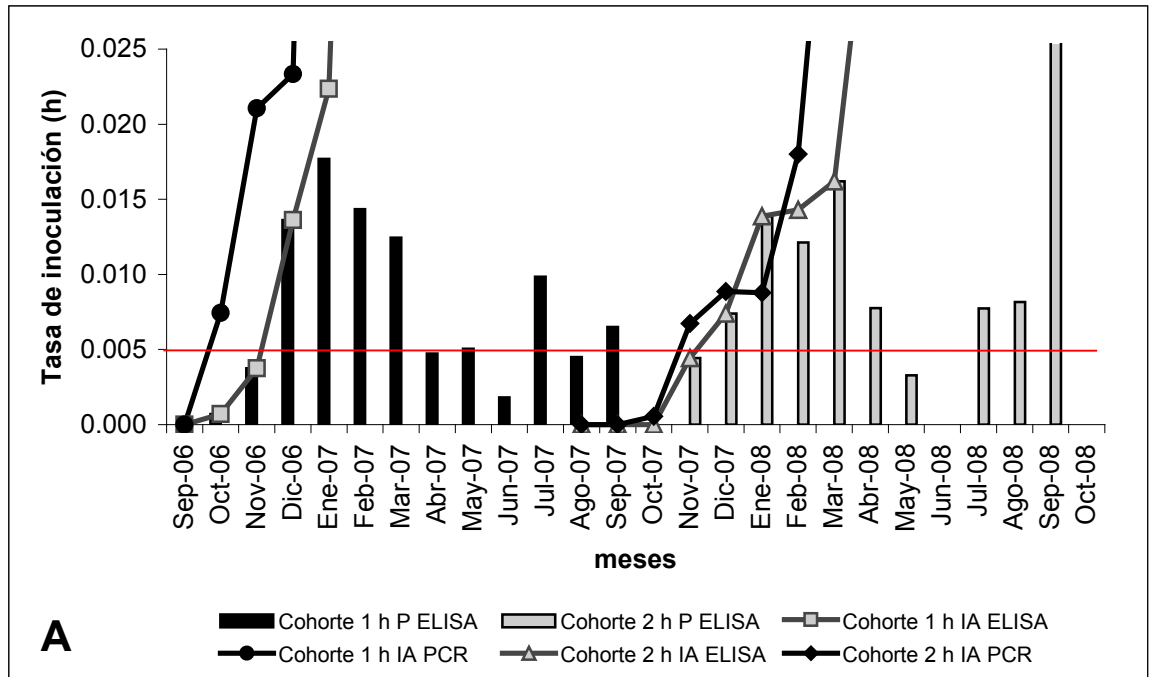
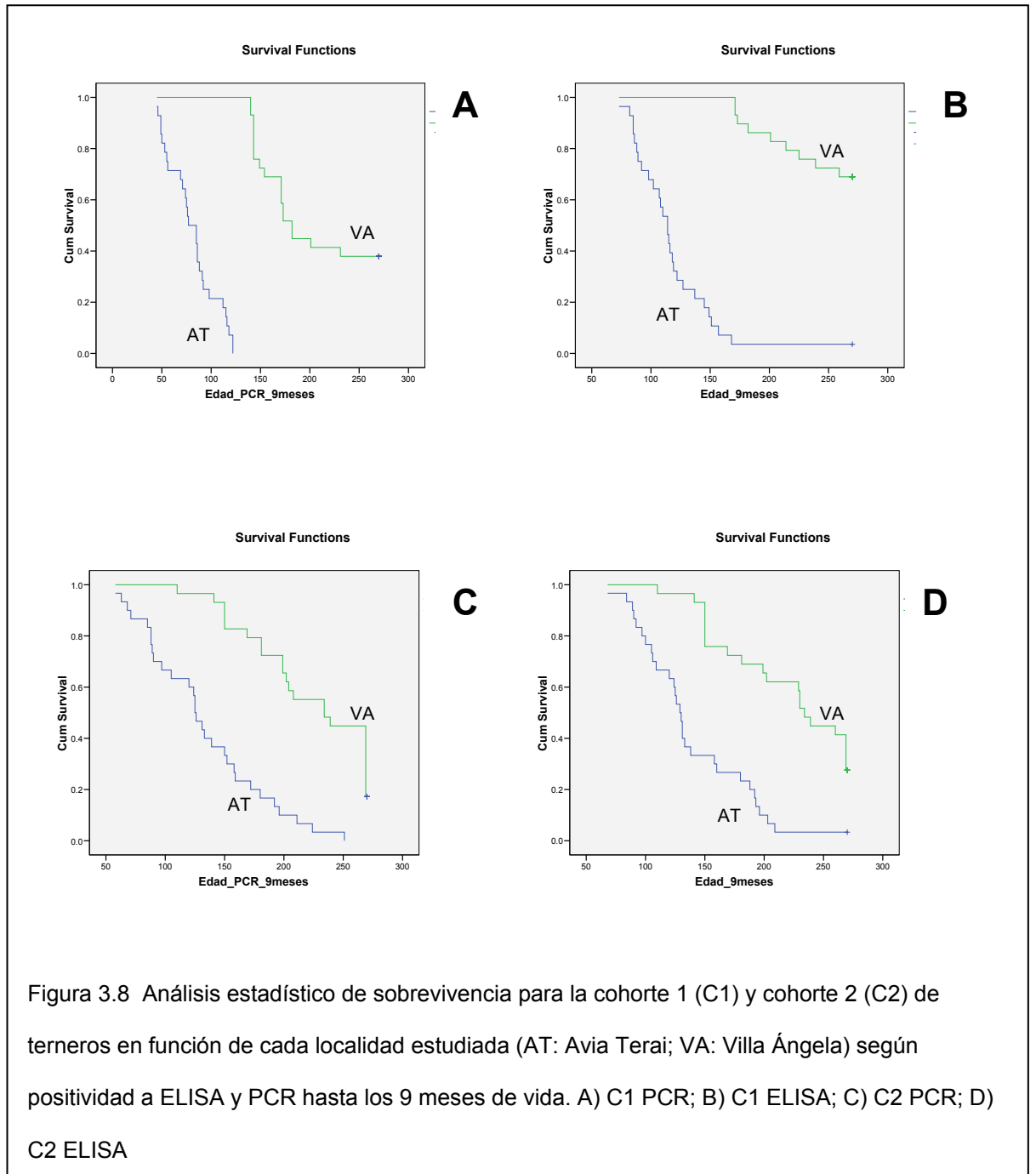
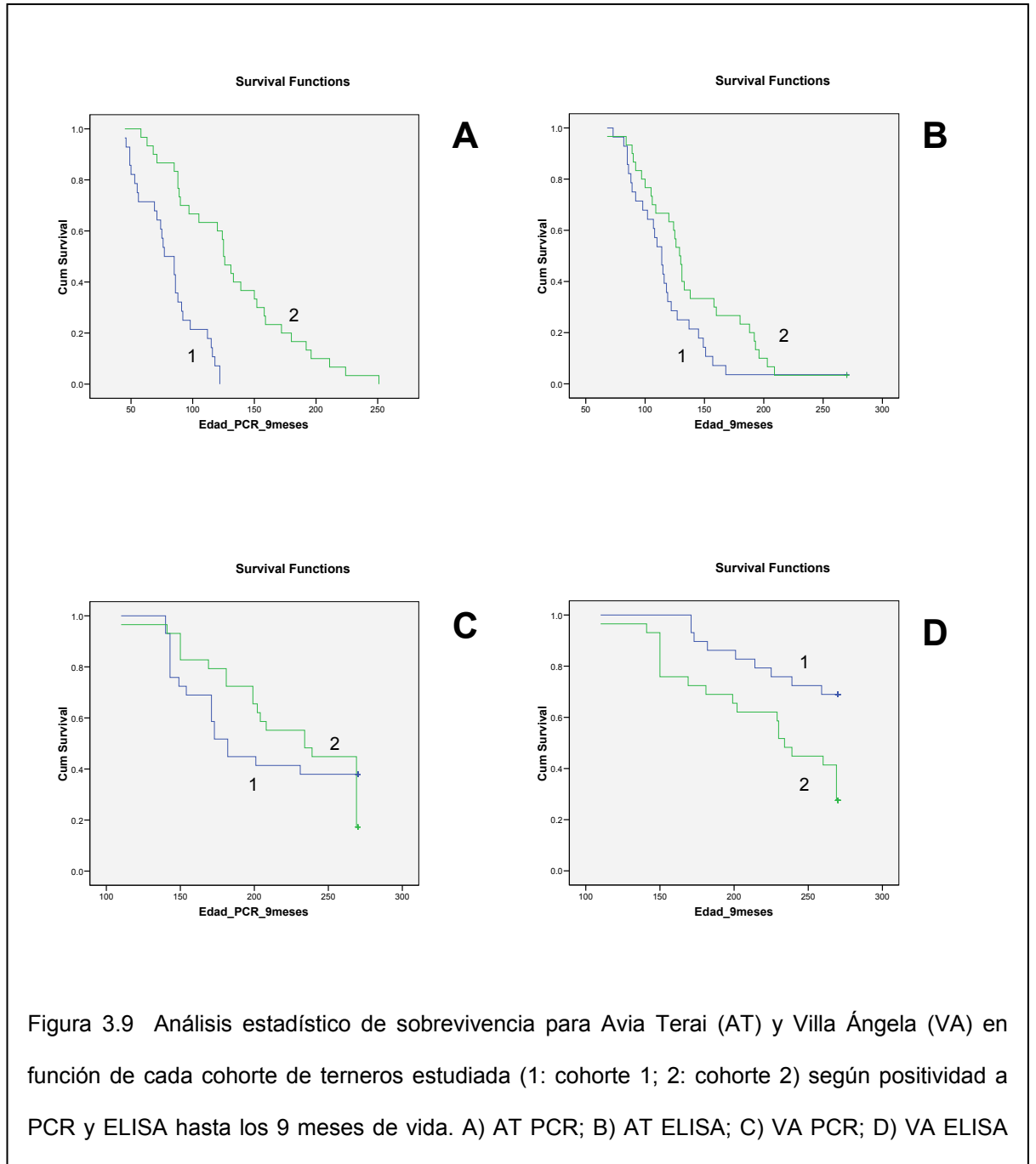


Figura 3.7 Tasa de inoculación (h) estimada sobre la prevalencia serológica (P ELISA), incidencia acumulada serológica (IA ELISA) e incidencia acumulada por PCR (IA PCR) para dos cohortes consecutivas de terneros en A) Avia Terai y B) Villa Ángela.

La línea horizontal indica el valor crítico de 0,005 de h .





DISCUSIÓN

En este capítulo se analizaron factores concernientes tanto a la dinámica de parasitación por *R. (B.) microplus* como a la transmisión de *B. bigemina*, así como aspectos de la interacción de estos dos componentes sobre el hospedador bovino. Es necesario destacar que durante el año 2008 se registró en el norte de Santa Fe, suroeste de Chaco y noreste de Santiago del Estero la peor sequía registrada desde 1960, sumada a cinco años previos con precipitaciones por debajo de la media (Sosa y col., 2009). La ganadería de toda la región se vio seriamente afectada por la falta de oferta forrajera. Los establecimientos bajo estudio adoptaron diferentes estrategias para afrontar esta contingencia climática. En AT los rodeos permanecieron en sus parcelas, es decir, se mantuvo la carga de cada parcela y se racionaron con rollos de heno de Gatton panic y suplementos concentrados administrados en comederos dispuestos en cada parcela. En VA, al no contar con reservas de heno en cantidades suficientes se descargó un camión de semillas de algodón en un sector cercano a la aguada y se abrieron las tranqueras internas del establecimiento, permaneciendo toda la hacienda del campo concentrada alrededor de este recurso desde marzo hasta septiembre aproximadamente.

La dinámica poblacional de la fase parasitaria de *R. (B.) microplus* se evaluó mediante la prevalencia de larvas, ninfas y adultos y de la abundancia e intensidad medias de adultos. La presencia de garrapatas mostró situaciones contrastantes entre ambos establecimientos y entre las cohortes evaluadas para cada establecimiento. El mayor volumen de trabajo realizado en la Argentina en cuanto a la parasitación de los bovinos por *R. (B.) microplus* fue obtenido mediante la estimación de la abundancia media de hembras y este es, por lo tanto, el único parámetro sobre el que se pueden hacer comparaciones con información disponible para la región. El análisis de la abundancia media evaluada en diferentes localidades del este de Salta y en Santiago del Estero demostró que la mayor abundancia de *R. (B.) microplus* ocurre en otoño (Guglielmone y col., 1981; Guglielmone y col., 1990a; Mangold y col., 1985; Mangold y col., 1987; Mangold y col., 1994). Sin embargo, los mismos autores en algunas localidades del chaco seco observaron que las máximas abundancias se dieron en primavera (Guglielmone y col., 1981; Mangold y col., 1987), evento que fue considerado ocasional y vinculado a factores climáticos adversos (Guglielmone, 1987).

En el presente trabajo la abundancia fluctuó de manera diferente según las diferentes cohortes estudiadas. Así, en el primer año de AT se observaron picos en verano y en invierno, siendo notoria la ausencia total de garrapatas en otoño. El segundo año se observó un pequeño aumento de la abundancia en verano y un pico en otoño, pero la máxima abundancia se dio en el invierno. En VA en cambio, durante el primer año se observó un pico en verano y otro de mayor magnitud en otoño, mientras que en el segundo año se dieron picos en otoño y en primavera. En ninguna de las cohortes evaluadas se observó el patrón poblacional con pequeños picos en primavera y verano y un máximo en otoño. Los trabajos anteriormente mencionados fueron realizados en su mayoría en explotaciones extensivas sin rotación de parcelas ni tratamientos acaricidas, mientras que en el presente análisis se puede observar cierto efecto del manejo zootécnico en la expresión de la abundancia media. En efecto, la ausencia de garrapatas en AT durante marzo y abril del primer año evaluado coincide con el destete, tratamiento con acaricidas y cambio de parcela de la tropa bajo estudio (ver tabla 3.1). El mismo efecto, se observa para enero del segundo año. Los tratamientos acaricidas en cambio tuvieron un efecto más errático, ya que si bien disminuyeron ligeramente la abundancia media, el efecto sobre la intensidad media no fue tan drástico y en septiembre del primer año ésta incluso aumentó luego de un tratamiento. Esta situación también se observó en VA. En esta localidad sin embargo no se observa un efecto tan marcado de los cambios de parcelas y el destete, ya que esta práctica se realiza mediante pendientes nasales o "latas", que impiden al ternero mamar, pero permaneciendo en la misma parcela que la madre. El fuerte aumento en la abundancia e intensidad medias para los meses de mayo y septiembre del segundo año evaluado en esta localidad coincidió con la concentración de la hacienda en los alrededores del recurso forrajero y la aguada lo que concuerda con observaciones previas (Guglielmone y col., 1990a). En octubre se vuelve a apreciar el efecto del cambio de parcela. Las precipitaciones registradas en dicho mes (Fig. 3.1.C) permitieron el ingreso de los animales en una parcela que había permanecido cerrada por más de seis meses, lo que se refleja en la ausencia de garrapatas en todos los animales examinados. Una situación similar fue descrita en establecimientos lecheros del Valle de Lerma, donde se determinó la mayor abundancia y prevalencia de garrapatas en primavera y verano (González de Ríos y col., 1989). Los autores lo atribuyen a la rotación de la tropa por parcelas con historias de uso desconocidas y descartan que pueda deberse a deficiencias nutricionales estacionales. Entre los factores que

modifican la abundancia de garrapatas se reconocen, además de la temperatura y la humedad, la densidad de hospedadores (Anderson, 1993; Randolph, 2004) ya que la cantidad de parásitos que consigan establecerse en un hospedador será función de la longevidad de los parásitos y la densidad de hospedadores (Anderson, 1993). En efecto, cuanto mas escasos sean los hospedadores, mas tiempo estarán sometidas las larvas a condiciones ambientales adversas y su supervivencia se verá reducida proporcionalmente (Randolph, 2004). Es probable que las diferencias de abundancia de garrapatas observadas entre las diferentes cohortes estén relacionadas con la abundancia de hospedadores, como se discutirá luego, en relación con la distribución de garrapatas y con la dinámica de transmisión de *B. bigemina*.

El estudio de la dinámica poblacional de garrapatas mediante la abundancia media de adultos está justificado desde el punto de vista de la aplicación de tratamientos acaricidas ya que permite establecer umbrales de abundancia y determinar los momentos mas apropiados para dichos tratamientos, así como evaluar la efectividad de las medidas de control (Nari, 1995; Nuñez y col., 1987; Shaw y col., 1998). Esta metodología asume que la duración del ciclo parasitario de *R. (B.) microplus* dura 23 días ya que el desarrollo de las garrapatas es dependiente de la temperatura corporal del bovino y por lo tanto la cantidad de generaciones anuales esta condicionada por la temperatura ambiental (Campos Pereira y col., 2008; Davey y col., 1982; Nuñez y col., 1972; Nuñez y col., 1987). Mediante el estudio de la prevalencia de los diferentes estadios del ciclo parasitario se puede observar, sin embargo, que en la cohorte 1 de AT durante julio, agosto y septiembre no hay ninfas pero si adultos y en una prevalencia de 88,5% que va decreciendo gradualmente (Tabla 3.1), lo que sería esperable en un ciclo de 60 días o más en el que no se incorporan nuevas garrapatas. Este fenómeno coincide con los meses invernales de temperaturas medias inferiores a 15°C (Fig 3.1.A). Este efecto se observa de manera mas acentuada para la cohorte 1 de VA, ya que en este caso se registró también la presencia de larvas. Éstas se registraron sobre los terneros a principios del mes de mayo. Sin embargo se siguieron encontrando ninfas hasta finales del mes de junio y adultos hasta julio (Tabla 3.2) independientemente de los cambios de parcela experimentados por el rodeo. En la cohorte 2 de VA se observa algo similar. En mayo hay una alta prevalencia que va decreciendo gradualmente hasta no observarse mas larvas y ninfas en agosto, pero si adultos, hasta que en septiembre se observa una infestación masiva. Esta situación coincide con un invierno muy corto, con

un solo mes con temperatura media de 15°C, en contraste con el año anterior, con cuatro meses con temperaturas medias inferiores a 15°C.

En Argentina no se realizaron estudios que permitan interpretar las variaciones estacionales de la fase parasitaria de *R. (B.) microplus*, asumiéndose que esta etapa del ciclo biológico esta sujeta a variaciones muy limitadas. En un estudio sobre los estadios de vida libre llevado adelante en AT, Nava et al. (Nava y col., 2013) demostraron que durante el invierno los huevos de *R. (B.) microplus* no eclosionan, por lo que no hay incorporación de larvas a la pasturas, lo que coincide con las observaciones sobre los estadios parasitarios realizadas en este trabajo. Diferentes autores concuerdan en que el ciclo parasitario tiene una duración constante (Davey y col., 1982; Nuñez y col., 1972). Por el contrario, existe evidencia de que en algunas regiones el ciclo parasitario tendría una variabilidad estacional (Hooker y col., 1912), lo que permite suponer un gradiente latitudinal, aunque se ignora si podría ser un efecto de la temperatura o del fotoperíodo. De cualquier manera, la presencia prolongada de garrapatas adultas sin incorporación de larvas tiene que dar por fuerza una imagen equivocada de la dinámica de trasmisión de babesias, si ésta se evalúa en términos de abundancia mensual de garrapatas hembras ya que se sobreestimaré la cantidad de picaduras que sufre cada animal y a la vez se subestimaré la proporción de garrapatas que transmiten el patógeno.

Por lo otro lado el análisis de otros parámetros relativos a la asociación parásito-hospedador como la prevalencia y la distribución de las garrapatas sobre la población de bovinos probablemente sea de mayor utilidad que la abundancia media para explicar la dinámica de transmisión de patógenos. Como se observa en la figura 3.4, cuando se estima la abundancia se subestima la cantidad de garrapatas y se sobreestima la cantidad de animales parasitados, por lo que este parámetro no expresa la cantidad de hospedadores que están siendo picados. Estudios enfocados en la ecología de enfermedades transmitidas por vectores postulan que la distribución de vectores en la población de hospedadores juega un rol central en la dinámica de infección y transmisión de patógenos (Anderson, 1991; Perkins y col., 2003; Woolhouse y col., 1997). Dichos estudios demuestran que los parásitos tienden a concentrarse en pocos hospedadores, asumiendo una distribución binomial negativa (Anderson, 1993; Anderson y May, 1979; May y Anderson, 1979; Shaw y col., 1998), es decir, que en una población de hospedadores muchos individuos tendrán pocos parásitos y una pequeña proporción de la población hospedaré la mayoría de los parásitos, lo que se

conoce también como distribución agregada. Este tipo de distribución maximiza la persistencia de los patógenos ya que favorece la infección de los vectores, aunque no la transmisión a una gran proporción de los hospedadores vertebrados (Harrison y Bennett, 2012; Randolph y Storey, 1999; Rosa y col., 2003).

En este trabajo se observó que en la cohorte 1 de AT las garrapatas se distribuyeron al azar entre los animales examinados, mientras que en la cohorte 2 de AT y ambas cohortes de VA la distribución fue agregada, con pocos terneros soportando las mayores intensidades de infestación (Figura 3.5). El máximo de agregación se dio en la cohorte 1 de VA.

La agregación de los parásitos en la comunidad de hospedadores puede ser causada por factores relativos al ambiente, a los parásitos y a los hospedadores (Shaw y col., 1998). Entre éstos, se pueden contar las diferencias individuales en la exposición a estadios infectantes de parásitos y por diferencias individuales en la susceptibilidad a la infestación (Wilson y col., 2002). En este sentido se ha demostrado que los bovinos son capaces de eludir las matas de pasto con cúmulos de larvas (Sutherst y col., 1978) y que la jerarquía de los bovinos en un rodeo induce diferentes intensidades de parasitación (Aguilar y Solis, 1984). Probablemente un factor determinante sea la densidad de hospedadores (Anderson, 1991) ya que a altas densidades se minimizan las diferencias individuales entre los hospedadores a nivel de exposición a estadios parasitarios que buscan un hospedador (Poulin, 1998). Este fenómeno fue observado por Nava et al. (Nava y col., 2006) al analizar la aptitud de distintas especies de mamíferos y aves como hospedadores de estadios inmaduros de la garrapata *Amblyomma tigrinum*.

Existen diferentes procedimientos para evaluar la agregación de parásitos (Morand y Deter, 2009). Para este trabajo se utilizaron la relación de la variancia de la abundancia media con la abundancia media y el índice de discrepancia D . El primer procedimiento permite determinar el tipo de distribución estadística que adoptan los datos (Zar, 1999) mientras que el segundo se utiliza para cuantificar la agregación y es útil para comparar poblaciones que difieren en prevalencia o abundancia (Poulin, 1993). Estos métodos no son mutuamente excluyentes, sino complementarios. En este trabajo, por ejemplo, los valores de D obtenidos para la cohorte 1 de AT y la cohorte 2 de VA son similares (0,275 y 0,290 respectivamente), pero en la primera se observa una distribución al azar y en la segunda una distribución binomial negativa (Fig 3.5). Los modelos matemáticos sobre

babesias se concentran en la relación entre la abundancia media de garrapatas y la presentación de enfermedad (Smith y Kakoma, 1989), sin tener en cuenta que en casos de alta agregación la prevalencia es una medida más útil que la abundancia o la intensidad media (Begon y col., 2006).

La dinámica de transmisión de *B. bigemina* se evaluó mediante la incidencia acumulada estimada sobre la base de las pruebas de PCR y ELISA y la prevalencia mensual estimada por medio de la prueba de ELISA. El objetivo de este trabajo no fue comparar técnicas de diagnóstico, por lo que no se pretende establecer una concordancia entre las pruebas utilizadas. De cualquier manera es válido mencionar que todos los animales que arrojaron un resultado positivo a la reacción de PCR también lo hicieron para la prueba de ELISA, aunque la mayoría de ellos en muestreos posteriores. Esto era esperable debido al tiempo necesario para montar una respuesta inmune humoral detectable mediante pruebas serológicas (Guglielmone y col., 1997d). No obstante, en AT, luego de haberse detectado la infección por ambos métodos en todos los animales de las tropas evaluadas las prevalencias estimadas por ELISA no permanecieron constantes, alcanzando un mínimo en junio (Fig. 3.6.A) en coincidencia con las menores temperaturas medias (Fig. 3.1.A). En la cohorte 1 se podría sugerir que coincide también con la baja prevalencia y abundancia de garrapatas observada en marzo y abril. González de Ríos y col. (1989) observaron una curva similar de prevalencia en terneros de explotaciones lecheras, con prevalencias mínimas en agosto y septiembre. Esto no podría afirmarse para la cohorte 2 pero lamentablemente la falta de información para junio del 2008 impide esbozar conclusiones al respecto. En la cohorte 1 de VA también se observó una prevalencia serológica fluctuante (Fig. 3.6.B) que no parece vinculada a la temperatura ni a la abundancia media de garrapatas aunque sí a la prevalencia de estas sobre los bovinos (Fig. 3.3), lo que también se observa para la cohorte 2.

Estas variaciones en la prevalencia se vieron reflejadas en el cálculo de h (Fig. 3.7). En AT, si bien las tropas habían alcanzado la condición de EE estimada por la IA en ambas cohortes, h cayó por debajo del umbral crítico de 0,005 en los meses en que la prevalencia serológica fue menor. Notablemente este evento coincidió con los nueve meses de edad de la tropa. En VA ninguna de las cohortes alcanzó el valor de 0,005 antes de los nueve meses cuando h se estimó según los resultados de ELISA. Cuando h se estimó utilizando la IA obtenida por PCR, el valor crítico de 0,005 fue superado en el muestreo correspondiente al mes de marzo para la cohorte 1. En dicho muestreo

los animales tenían cinco meses y medio de edad y la incidencia acumulada correspondió al 59% de la tropa (Tabla 3.4). Este valor permaneció constante hasta septiembre, no registrándose nuevas infecciones hasta los 12 meses y medio de la tropa. La edad entra como denominador en el cálculo de h , por lo que si la cantidad de animales infectados permanece constante el valor de h disminuirá en forma proporcional al aumento de la edad de la tropa. Este efecto se observa claramente en la figura 3.7.B. Para los nueve meses de edad la cantidad de animales infectados no superó el 75% por lo que se consideró que la tropa estaba en IE. Lo mismo se determinó para la cohorte 2. Los valores de h se mantuvieron por debajo del umbral hasta los nueve meses de la tropa, momento en que hubo un aumento abrupto de la transmisión, coincidente con el fuerte aumento en la prevalencia y abundancia de garrapatas. Esto podría considerarse un ejemplo del riesgo de brotes de babesiosis en una situación de IE. Debido a que en este periodo toda la hacienda del establecimiento permaneció concentrada se estima que el abrupto aumento en la transmisión podría haber desencadenado un brote si no se vacunara anualmente a las hembras de reposición.

El cálculo de la tasa de inoculación estimada mediante la prevalencia de anticuerpos es el mejor estimador del riesgo de brotes de babesiosis (Guglielmo, 1991a; Smith, 1984). Si bien puede incurrirse en la sobreestimación del riesgo por la determinación de IE debido a bajas estacionales en la prevalencia, difícilmente se determine una situación de EE cuando la transmisión de babesia es baja. En el contexto de la evaluación de la vacunación como medida profiláctica esto significa que podrían ser vacunadas tropas que alcanzarían la inmunidad por transmisión natural, pero que no se dejarían de vacunar tropas que tienen niveles de transmisión insuficiente. Para minimizar el efecto de sobreestimación de riesgo se podría sugerir evaluar el estatus de la tropa a los seis meses de edad, probablemente en coincidencia con el destete, que es cuando la prevalencia serológica reflejó más acertadamente la proporción de animales infectados. En ausencia de otra información estos conceptos deberían aplicarse solo a establecimientos ganaderos de la región evaluada ya que en otro tipo de explotaciones u otras regiones ecológicas las dinámicas de transmisión pueden resultar sustancialmente diferentes (Gaido y col., 1997; González de Ríos, 1987; González de Ríos y col., 1989).

El análisis de supervivencia mostró que las diferencias en la dinámica de transmisión fueron significativas, tanto en la velocidad de transmisión como en la cantidad de animales infectados a los

nueve meses de edad, entre las localidades evaluadas. Independientemente del año evaluado la transmisión de *B. bigemina* fue superior en AT con respecto a VA (Fig. 3.8). Las diferencias también fueron significativas entre las cohortes de AT. La cantidad de animales infectados a los nueve meses fueron similares entre ambas cohortes pero la cohorte 2 requirió un tiempo sustancialmente superior para alcanzar ese nivel (Fig. 3.9 A y B). En VA no se registraron diferencias significativas entre cohortes ya que si bien en las figuras 3.6.B y 3.7.B se pueden observar aumentos en la transmisión diferentes en ambas cohortes, éstos se dieron después de los nueve meses de edad de la tropa (Tabla 3.4) por lo que no modifican los resultados del análisis de supervivencia.

Mediante análisis de regresión logística se determinó que el factor determinante para la infección de los bovinos fue la presencia de garrapatas y no la cantidad de garrapatas sobre cada animal, independientemente de la prueba utilizada para detectar la infección. Esto significa que para la dinámica de transmisión de *B. bigemina* no sería tan importante la cantidad de garrapatas que pican a cada animal, sino cuantos animales son picados. El estimador de la cantidad de garrapatas por animal es la abundancia media, mientras que el estimador de la presencia/ausencia de garrapatas en los animales es la prevalencia. Se infiere entonces que la prevalencia sería un parámetro más útil que la abundancia a los fines de evaluar la relación entre las poblaciones de garrapatas con la transmisión de *B. bigemina*. Conclusiones similares pueden extraerse del trabajo de González de Ríos y col. (1989), donde los máximos títulos de anticuerpos para *B. bigemina* se dieron en coincidencia con la máxima prevalencia de garrapatas, aunque con una baja abundancia media. Ribera Cuéllar y col. (2000) tampoco encontraron relación entre la abundancia media de garrapatas y la tasa de inoculación para *B. bigemina* en explotaciones lecheras del este de Bolivia. Estos autores señalan que la estabilidad endémica se alcanzó con abundancias medias de garrapatas inferiores a dos garrapatas por animal. Lamentablemente en dicho estudio no se detallan datos de prevalencia de parasitación. A similares conclusiones arribaron Swai y col. (2005) en Tanzania, en cuyo estudio la cantidad de garrapatas sobre los animales no tuvo relación con la seroconversión para *Babesia sp.* Estudios extensivos sobre la relación entre la abundancia media y la prevalencia indican que si bien existe una cierta dependencia entre ambos parámetros, se pueden encontrar altas abundancias con bajas prevalencias y viceversa, por lo que no es posible predecir una en base a la otra (Shaw y col., 1998).

Las diferencias en el ritmo de transmisión podrían adjudicarse a la mayor proporción de garrapatas infectadas en AT, como se indica en el capítulo 2 de esta tesis. Sin embargo en ese caso se debería esperar un efecto de la intensidad de parasitación, es decir que si las diferencias en la dinámica de transmisión estuvieran relacionadas con la proporción de garrapatas infectadas debería esperarse que los animales con más garrapatas contraigan la infección antes que los que tienen menos garrapatas. Sin embargo lo que se observó es que la presencia de garrapatas fue determinante de la infección, sin importar la cantidad de garrapatas observada, por lo que la proporción de garrapatas infectadas no sería una limitante en ninguno de los rodeos evaluados. En otras palabras, las situaciones de baja transmisión no se deberían a la escasez de garrapatas infectadas ni a pocas garrapatas sobre los animales, sino a pocos animales con garrapatas.

Como ya se ha comentado, los parásitos adoptan distribuciones agregadas entre la población de hospedadores. En este trabajo se puede observar que la agregación de garrapatas es determinante de la dinámica de transmisión de *B. bigemina* y que a mayor agregación del vector, menor transmisión del patógeno. Esa relación es clara en la cohorte 1 de ambas localidades analizadas. En VA se observó la mayor agregación y la menor transmisión de la babesia mientras que en AT, donde se alcanzó rápidamente la estabilidad, no se registró agregación, sino que las garrapatas adoptaron una distribución aleatoria entre la población de bovinos. La cohorte 2 de VA evidenció un nivel de agregación similar al de la cohorte 1 de AT, cuando se estimó mediante el índice de discrepancia. Es necesario resaltar que en este valor influyen las altas prevalencias y abundancias registradas para la cohorte 2 de VA sobre el final del periodo bajo estudio, que son desproporcionadas con respecto a los valores alcanzados para las otras cohortes, pero durante los primeros meses de muestreo, que determinaron bajos valores de h el nivel de agregación fue mayor, como se puede inferir de la comparación entre la abundancia y la intensidad media en la tabla 3.2.

Los motivos de las diferencias en la agregación no pueden ser claramente analizados con la información disponible en este estudio. Como se ha comentado previamente, un factor determinante de la agregación de parásitos sería la densidad de hospedadores, que en términos ganaderos es equivalente a la carga animal (Cocimano y col., 1975). Se ha postulado que esta relación dependiente de la densidad tiene mas importancia en la estabilidad de las poblaciones parasitarias que los disturbios climáticos o antrópicos (Anderson, 1993). La carga animal en términos de animales por

hectárea fue superior en AT con respecto a VA. Este parámetro sin embargo puede expresarse de distintas formas, ya que dentro de una explotación agropecuaria pueden existir límites internos que determinen mayores concentraciones temporales de ganado, lo que se denomina carga instantánea. Si bien este parámetro no se cuantificó a lo largo de este estudio, el efecto del aumento de la densidad de hospedadores es claro en los últimos meses evaluados para la cohorte 2 de VA, cuando la prevalencia de parasitación alcanzó el 100% de la tropa, la agregación se diluyó y se infectaron con *B. bigemina* todos los animales que no lo habían hecho hasta el momento. Esto confirmaría además las observaciones realizadas en Salta y Santiago del Estero, donde los aumentos en la abundancia de garrapatas coincidieron con la concentración estacional de los rodeos en torno a las aguadas (Guglielmone, 1987). Este evento correspondió a una contingencia climática, que ilustra por un lado, que las poblaciones de *R. (B.) microplus*, al igual que otras garrapatas, no serían tan sensibles a condiciones climáticas que se consideran adversas (Randolph, 2004) y por otro lado, que las perturbaciones climáticas tendrían mas efecto en el comportamiento de los hospedadores o en el manejo de los rodeos, que en la biología de las garrapatas en si. (Anderson, 1993). Lo mismo podría concluirse analizando la situación de AT. En dicho establecimiento los animales permanecieron en las mismas parcelas y con la misma carga, a pesar de no haber cobertura vegetal, es decir, se mantuvo la densidad de hospedadores prácticamente constante pero en un ambiente que podría considerarse inhóspito para las larvas de *R. (B.) microplus*. En estas condiciones se observó un aumento en la agregación de garrapatas para el segundo año con respecto al primero, pero que no modificó significativamente la transmisión de *B. bigemina*.

En el capítulo 1 de esta tesis se observó una diferencia en la transmisión de *B. bigemina* entre los campos con Gatton panic y los que utilizan otras pasturas. Se planteó entonces que las diferencias no estarían dadas por la mayor aptitud de la pastura para sustentar poblaciones de garrapatas, sino porque el Gatton panic permite altas cargas instantáneas, lo que concuerda con los resultados de este capítulo. El hecho de que la carga animal no haya resultado significativa en el análisis del capítulo 1 podría deberse, como se mencionó anteriormente, a que el parámetro analizado (cantidad total de animales / cantidad de hectáreas ganaderas) no refleja la carga instantánea, es decir la densidad de hospedadores, con la que interactúa la población de garrapatas.

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo de tesis permitirían esbozar dos conclusiones principales. La primera es que una gran proporción de los rodeos de la región estudiada estaría en inestabilidad enzoótica, con alto riesgo de padecer brotes de babesiosis de importancia económica y que la inestabilidad parece un rasgo frecuente en los rodeos del Chaco Sudamericano. La segunda conclusión es que la transmisión de *B. bigemina* no estaría regulada por la cantidad de garrapatas que parasitan a los bovinos ni por la proporción de éstas que están infectadas, sino por la cantidad de bovinos que son parasitados por garrapatas, es decir, la distribución de las garrapatas en la población de hospedadores.

Si bien algunos autores señalan que en condiciones naturales o extensivas la transmisión de babesia tiende a la estabilidad (Callow y Dalglish, 1982; Mahoney, 1962), en realidad, es probable que la incidencia de transmisión sea dependiente de la densidad de hospedadores. En regiones como el chaco semiárido las condiciones ecológicas para el sustento de poblaciones de bovinos son pobres (Guglielmone, 1992b), la densidad de bovinos es baja y la agregación de garrapatas sobre los bovinos debe ser máxima, con muy pocos animales hospedando la mayoría de las garrapatas de la población parasitaria. Estos hospedadores serían a su vez los que sustenten las poblaciones de babesias, con repetidas superinfecciones. Solamente en casos de aumentos de la densidad de hospedadores (cíclicos, por crecimiento de la población o puntuales, por ejemplo por concentración en las fuentes de agua durante sequías prolongadas, o en terreno seco durante anegamientos) se produciría un aumento de la prevalencia de parasitación por garrapatas, con una disminución de la agregación y un aumento de la incidencia de babesiosis clínica.

Tradicionalmente el chaco semiárido constituyó un área ganadera marginal basada en la explotación extensiva. En los últimos años se han dado en la región bajo estudio profundos cambios en la dinámica ganadera, vinculados principalmente con el avance de la frontera agrícola y la modernización de la ganadería, ligada al uso de especies forrajeras como el Gatton panic (Paolasso y col., 2012). El aumento de la extensión de áreas sembradas no afectó en forma significativa la producción pecuaria (Guardia y Tornarolli, 2009). Por el contrario, el número de cabezas se incrementó en base a dos procesos diferentes: sectores donde el avance de los cultivos no fue

importante y la ganadería aumentó probablemente con sistemas de cría en monte y sectores donde avanzó la agricultura pero también aumentaron las cabezas de ganado mediante la incorporación de pasturas implantadas, que permiten manejar mayores cargas (Parolasso et al 2012).

Este aumento de la carga puede haber modificado a nivel de predio las condiciones para el desarrollo de poblaciones de garrapatas, por lo que en establecimientos ubicados en una región poco apta para el desarrollo de *R. (B.) microplus* se habrían creado condiciones para su supervivencia, provocando una mayor transmisión de *B. bigemina*.

La importancia de la carga animal o densidad de hospedadores ha sido destacada desde los inicios del estudio epidemiológico de las enfermedades transmitidas por vectores (Macdonald, 1950) y ha recibido considerable atención en trabajos realizados en humanos (Anderson, 1991; Anderson y Gordon, 1982; Anderson y May, 1979; May y Anderson, 1979) y en poblaciones silvestres (Arneberg y col., 1998; Manzoli y col., 2013; Tompkins y col., 2011), pero resulta notable que este parámetro prácticamente no ha sido estudiado en relación con las garrapatas de los bovinos y las enfermedades que transmiten, y si bien se menciona como un factor que puede modificar la transmisión (Guglielmone, 1994; Smith, 1984; Solari y Quintana, 1994), no ha sido objeto de trabajos experimentales, en comparación con otros factores como por ejemplo la resistencia de las diferentes razas de ganado. El estudio de la relación entre la densidad de hospedadores y la abundancia y distribución de parásitos, que en poblaciones silvestres resulta en estimaciones complejas sería relativamente sencillo en establecimientos ganaderos, ya que la carga no solo se conoce *a priori*, sino que puede ser modificada a voluntad. Particularmente interesante sería determinar si la densidad de hospedadores es determinante de la mayor o menor agregación de garrapatas sobre los bovinos, pero además, si existe un umbral de carga para la inflexión de la distribución, pasando de una distribución agregada a una distribución al azar, lo que a la vez aumenta la transmisión de babesia a una mayor proporción del rodeo. En este sentido Arneberg y col. (1998) sugieren que el tamaño de los hospedadores es menos importante que la densidad en términos de cantidad de individuos, por lo que las estimaciones deberían hacerse en base a la cantidad de animales por hectárea y no en base a equivalentes vaca por hectárea (Cocimano y col., 1975).

De cualquier manera se considera que es imperativo generar nueva información acerca del ciclo parasitario de *R. (B.) microplus*. Esto se debe en parte al nuevo reordenamiento taxonómico que

determinó que las garrapatas presentes en Australia y en Sudamérica no son las mismas (Estrada-Peña y col., 2012), pero también a las observaciones realizadas en este trabajo en cuanto a la variación estacional del ciclo parasitario de la garrapata. Para esto se deberían realizar estudios que contemplen no solo la estimación de la abundancia media de adultos sino también la prevalencia en un número adecuado de bovinos y extender el esfuerzo a la cuantificación de la parasitación con larvas y ninfas.

La variable que resultó mas fuertemente asociada a la condición epidemiológica de los rodeos fue la utilización de Gatton panic como base forrajera. Si bien se infiere que esto podría ser un efecto de la carga con que se pastorea este recurso, se considera relevante realizar estudios que permitan entender la dinámica de los estadios de vida libre y de la relación garrapata-hospedador en esta pastura, evaluando particularmente, los factores asociados con la supervivencia, longevidad y abundancia de larvas en las pasturas. Aparentemente la clausura de potreros tendría un efecto mucho más drástico sobre las poblaciones de garrapatas y la transmisión de patógenos que los tratamientos acaricidas. Esto ha sido postulado por diferentes autores (Wharton y col., 1969; Wilkinson, 1957; Wilkinson, 1964), pero para poder explotar este factor en el control de garrapatas y las enfermedades que transmiten es necesario generar información cuantitativa en la región. El conocimiento de los factores que inciden sobre la supervivencia, longevidad, abundancia y distribución de las garrapatas en las pasturas y en los bovinos permitiría establecer medidas de control de los ectoparasitos basadas en el descanso de pasturas, rotación de parcelas y tratamientos estratégicos, aunque por otra parte también sería teóricamente posible lograr distribuciones uniformes de garrapatas sobre los bovinos para lograr una eficiente transmisión natural de hemoparásitos y alcanzar así la estabilidad enzoótica. Debe tenerse en cuenta que las pérdidas provocadas por las garrapatas son mayores que las provocadas por las enfermedades transmitidas (Späth y col., 1994c). Al momento de decidir medidas de prevención y control el productor deberá optar por convivir con las garrapatas para lograr la inmunidad natural de la tropa, o vacunar contra hemoparásitos y controlar de manera efectiva las poblaciones de garrapatas.

El control de garrapatas es mencionado por diferentes autores como uno de los factores que modifican mas drásticamente la transmisión de babesias (de Vos, 1979; Smith, 1984) y como una de las causas de la disminución de la inmunidad y la aparición de situaciones de inestabilidad enzoótica

en los rodeos (Lombardero y col., 1976; Mahoney, 1974). Probablemente esto aplique a esquemas de control tendientes a la erradicación de garrapatas pero en la región estudiada no se encontró relación entre el control de garrapatas y la transmisión de *B. bigemina*. Llama la atención que el control químico de garrapatas no parece efectivo en absoluto, a pesar de que una alta proporción de establecimientos realiza mas tratamientos anuales que los que se podrían considerar necesarios en la región (Guglielmone, 1992b; Späth y col., 1994a). Otro de los factores frecuentemente imputados como responsables de disminución de la transmisión y la aparición de situaciones de riesgo de brotes es el clima y los cambios climáticos asociados con disturbios en la biología de las garrapatas (de Vos, 1979; Mahoney, 1973). En este trabajo de tesis se ha observado que de existir un efecto del clima en la transmisión de *B. bigemina* éste se expresaría a nivel del comportamiento de los hospedadores o de cambios en el manejo del rodeo, pero no afectando la biología del ectoparásito. De cualquier manera se considera que son necesarios estudios adicionales que permitan cuantificar el efecto de condiciones climáticas extremas sobre las poblaciones de *R. (B.) microplus*.

La composición genética de los rodeos no estuvo relacionada con el estatus epidemiológico de los mismos. En ese sentido resulta interesante que con una cruce 3/8 se pueden alcanzar ritmos de transmisión que aseguren la estabilidad endémica sin llegar a una abundancia de garrapatas que comprometa la salud o la productividad de la tropa.

Del análisis de la información obtenida de los productores se puede inferir que además del riesgo de brotes generado por modificaciones en la transmisión dentro del mismo establecimiento, existe otra causa de brotes en la región que es el traslado de hacienda dentro de la zona infestada con garrapatas. Estos traslados suelen hacerse si tomar precauciones por considerarse que la hacienda es naturalmente inmune. El movimiento de hacienda implica, no obstante, un grave riesgo para la tropa introducida ya que si hubiera un estatus de transmisión mayor en el campo de destino comparado con el campo de origen, esta tropa se vería indefectiblemente afectada (de Vos, 1979 (273). Esta situación puede darse cuando se adquieren animales de regiones consideradas endémicas solo por estar en un área endémica para *R. (B.) microplus*, sin tener en cuenta la condición epidemiológica de esta tropa en particular. Lo expuesto es de particular relevancia en el sudoeste del Chaco, donde muchos establecimientos crían terneros que luego son engordados en otras regiones (Rossanigo y col., 2012). En relación con este aspecto, en este estudio no se pudo

establecer una relación entre diferentes regiones biogeográficas o diferentes áreas de aptitud ecológica para garrapatas, probablemente debido a la uniformidad geográfica y climática. Un estudio a mayor escala geográfica podría aportar mayor información al respecto. También podría obtenerse información relevante de estudios transversales aplicados en regiones puntuales donde la producción ganadera es relevante pero que presentan características ecológicas contrastantes como el este de Formosa, o el este y sur de Corrientes. La información obtenida mediante las encuestas en cuanto a la percepción de los productores debe ser considerada con cautela, ya que solo una proporción mínima de quienes manifestaron tener problemas sanitarios por enfermedades transmitidas por garrapatas recurrió al diagnóstico de laboratorio para confirmar la etiología de los casos clínicos observados. La Argentina cuenta con un alto nivel de tecnología en diagnóstico y prevención de enfermedades transmitidas por garrapatas a los bovinos (Guglielmone, 1992a). La intención de uso de estas herramientas por parte de productores y veterinarios asesores podría ser evaluada mediante un análisis de percepción de riesgo.

Para este trabajo se utilizaron técnicas de diagnóstico serológicas y moleculares. En los últimos años se hicieron diferentes menciones a que sería inapropiado trabajar con técnicas serológicas en estudios epidemiológicos de estas enfermedades debido a la baja sensibilidad y a la posibilidad de reacciones cruzadas (Buling y col., 2007; Calder y col., 1996; Costa-Júnior y col., 2006; Criado-Fornelio, 2007; Patarapadungkit y col., 2004). El objetivo de este trabajo de tesis no fue comparar las técnicas de diagnóstico. Sin embargo se puede afirmar que se observó un buen desempeño de ambas pruebas. Las técnicas serológicas aventajan a las técnicas moleculares en el menor costo de las primeras, la velocidad de procesamiento de las muestras y de obtención de los resultados y el menor riesgo de falsos positivos por contaminación. Una ventaja adicional de las pruebas serológicas es que puede determinarse la sensibilidad y especificidad y utilizarse para conocer la prevalencia real lo que le da valor estadístico (Smith y Kakoma, 1989).

Finalmente, es válido recalcar que este fue un trabajo observacional en una región acotada. Las observaciones realizadas sobre factores que modifican la transmisión de *B. bigemina* ameritan la realización de trabajos adicionales que amplíen los resultados aquí expuestos o que detecten variables que fueron ignoradas en este estudio, sobre todo aquellas vinculadas con el manejo del

ganado, que tienen un fuerte componente regional, y que a la vez confirmen o rechacen las hipótesis discutidas.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Adham FK, bd-el-Samie EM, Gabre RM, el-Hussein H. Detection of tick blood parasites in Egypt using PCR assay I--*Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. Parasitol Res. 2009; 105: 721-730.
- 2 Aguilar S y Solis S. Herd hierarchial status and the number of *Boophilus microplus* ticks on cattle in the central high plain area of Mexico. Southwest Entomol. 1984; 9: 267-272.
- 3 Aguirre DH, Bermúdez AC, Mangold AJ, Guglielmone AA. Infección natural con *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en bovinos de raza Hereford, Criolla y Nelore en Tucumán, Argentina. Rev Med Vet. 1990; 71: 54-60.
- 4 Aguirre DH, de Echaide ST, Mangold AJ, Guglielmone AA. Duración prolongada de la inmunidad contra *Babesia bigemina* en ausencia de reinfección. Rev Med Vet. 1993; 74: 223-225.
- 5 Aguirre DH, Mangold AJ, Gaido AB, González de Ríos L, Guglielmone AA. Evaluación de la infectividad de una vacuna congelada en nitrógeno líquido elaborada en base a *Babesia bigemina* atenuada. Rev Med Vet. 1989; 70: 142-145.
- 6 Aguirre DH, Mangold AJ, González de Ríos L, Guglielmone AA. Respuesta clínica y evolución del peso corporal en terneras (*Bos taurus*) vacunadas simultáneamente contra babesiosis y anaplasmosis con inmunógenos vivos. Med Vet. 1991; 8: 95-101
- 7 Aktas M, Altay K, Dumanli N. PCR-based detection of *Theileria ovis* in *Rhipicephalus bursa* adult ticks. Vet Parasitol. 2006; 140: 259-263.
- 8 Allred DR y Al-Khedery B. Antigenic variation and cytoadhesion in *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum*: different logics achieve the same goal. Mol Biochem Parasitol. 2004; 134: 27-35.
- 9 Allsopp MT, Cavalier-Smith T, de Waal DT, Allsopp BA. Phylogeny and evolution of the piroplasms. Parasitology. 1994; 108: 147-152.

- 10 Allsopp MTEP y Allsopp BA. Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. Ann N Y Acad Sci. 2006; 1081: 509-517.
- 11 Altay K, Aktas M, Dumanli N. Detection of *Babesia ovis* by PCR in *Rhipicephalus bursa* collected from naturally infested sheep and goats. Res Vet Sci. 2008; 85: 116-119.
- 12 Anderson RM. Populations and infectious diseases: Ecology or Epidemiology. J Anim Ecol. 1991; 60: 1-50.
- 13 Anderson RM. Epidemiology. En: Cox FE Modern Parasitology. A Text Book of Parasitology. 2da. Edición. London. Wiley-Blackwell, 1993, p. 75-116.
- 14 Anderson RM y Gordon DM. Processes influencing the distribution of parasite numbers within host populations with special emphasis on parasite-induced host mortalities. Parasitology. 1982; 85: 373-398.
- 15 Anderson RM y May RM. Population biology of infectious diseases: Part I. Nature. 1979; 280: 361-367.
- 16 Anziani OS, Bakos E, Mangold AJ, Signorini AR, Späth EJA, Vanzini VR, Guglielmo AA. Relevancia del diagnóstico de la Anaplasmosis y las Babesiosis en la comercialización de vacunos inmunizados contra estas enfermedades. Reunión anual de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico, 1992, p 24-27. Informe de la comisión científica permanente de enfermedades producidas por hemoparasitos y sus transmisores. Corrientes. Argentina.
- 17 Arellano Sota C. Acción y toxicidad de los fármacos utilizados contra la *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. Veterinaria. 1988; 24: 15-24.
- 18 Arellano Sota C. Protocolo para evaluar la seguridad y eficacia de los inmunógenos contra la anaplasmosis y babesiosis bovina. FAO, Santiago de Chile, Chile, 1994; 1-42.
- 19 Arneberg P, Skorping A, Grenfell B, Read AF. Host densities as determinants of abundance in parasite communities. Proc R Soc Lond. 1998; 265: 1283-1289.

- 20 Asociación Argentina de Parasitología Veterinaria. Lucha contra la garrapata *Boophilus microplus* (Can.). Biogénesis SA, 2000; p. 1-16.
- 21 Barros SL, Madruga CR, Araujo FR, Menk CF, de Almeida MA, Melo EP, Kessler RH. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100: 513-517.
- 22 Begeres de Almeida M, Py Tortelli F, Riet-Correa B, Montiel Ferreira JL, Soares MP, Farias NAR, Riet-Correa F, Schild AL. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. Pesq Vet Bras. 2006; 26: 237-242.
- 23 Begon M, Townsend CR, Harper JL. Ecology: from individuals to ecosystems. 4ta. Edición. Oxford, United Kingdom. Blackwell Publishing, 2006, p 759.
- 24 Binnington KC. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. Int J Parasitol. 1978; 8: 97-115.
- 25 Birkenheuer AJ, Neel J, Ruslander D, Levy MG, Breitschwerdt EB. Detection and molecular characterization of a novel large Babesia species in a dog. Vet Parasitol. 2004; 124: 151-160.
- 26 Birkenheuer AJ, Whittington J, Neel J, Large E, Barger A, Levy MG, Breitschwerdt EB. Molecular characterization of a Babesia species identified in a North American raccoon. J Wildl Dis. 2006; 42: 375-380.
- 27 Bock RE, Jackson L, de Vos AJ, Jorgensen W. Babesiosis of cattle. Parasitology. 2004; 129: 247-269.
- 28 Bock RE, Kingston TK, de Vos AJ. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *B. bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. Aust Vet J. 1999; 77: 461-464.
- 29 Boero JJ. Piroplasmosis. En: Parasitosis Animales. 4ta Edición. Buenos Aires, Argentina, Ed Universitaria de Buenos Aires, 1976, p. 201- 226.

- 30 Booth TF. Wax Lipid Secretion and Ultrastructural Development in the Egg-Waxing (Gene's) Organ in Ixodid Ticks. Tissue Cell. 1989; 21: 113-122.
- 31 Booth TF, Beadle DJ, Hart RJ. Ultrastructure of the accessory glands of gene's organ in the cattle tick, *Boophilus*. Tissue Cell. 1984; 16: 589-599.
- 32 Bosman AM, Oosthuizen MC, Peirce MA, Venter EH, Penzhorn BL. *Babesia lengau* sp. Nov., a novel Babesia species in cheetah (*Acinonyx jubatus*, Schreber, 1775) populations in South Africa. J Clin Microbiol 2010; 48: 2703-2708.
- 33 Bronsdon MA, Homer MJ, Mager JMH, Harrison C, Andrews RG, Bielitzki JT, Emerson CI, Persing DH, Fritsche TR. Detection of Enzootic Babesiosis in Baboons (*Papio cynocephalus*) and Phylogenetic Evidence Supporting Synonymy of the Genera *Entopolypoides* and *Babesia*. J Clin Microbiol. 1999; 37: 1548-1553.
- 34 Buling A, Criado-Fornelio A, Asenzo G, Benitez D, Barba-Carretero JC, Florin-Christensen M. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. Vet Parasitol. 2007; 147: 16-25.
- 35 Burkart R, Bárbaro NO, Sánchez RO, Gómez DA. Eco-regiones de la Argentina. APN , PRODIA, Buenos Aires, Argentina 1999, p. 1-42.
- 36 Büscher G. The infection of various tick species with *Babesia bigemina*, its transmission and identification. Parasitol Res. 1988; 74: 324-330.
- 37 Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. J Parasitol. 1997; 83: 575-583.
- 38 Cabrera AL. Regiones Fitogeográficas Argentinas. En: Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Buenos Aires, Argentina, Ed ACME, 1994, p. 1-85.
- 39 Cabrera AL y Willink A. Biogeografía de América Latina. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Serie de Biología. Ed Chesneau EV 1973, p. 1-110.

- 40 Cafrune MM, Aguirre DH, Mangold AJ, Guglielmono AA. Oviposition in *Boophilus microplus* infected artificially with *Babesia bovis* and naturally with *B. bovis* and *Babesia bigemina*. Ann Parasitol Hum Comp. 1993; 68: 196-198.
- 41 Cafrune MM, Aguirre DH, Mangold AJ, Guglielmono AA. Experimental studies of the rate of infection of *Boophilus microplus* eggs with *Babesia bovis*. Res Vet Sci. 1995; 58: 284-285.
- 42 Calder JAM, Reddy GR, Chieves L, Courtney CH, Littell R, Livengood JR, Norval RAI, Smith C, Dame JB. Monitoring *Babesia bovis* Infections in Cattle by Using PCR-Based Tests. J Clin Microbiol. 1996; 34: 2748-2755.
- 43 Callow LL. The infection of *Boophilus microplus* with *Babesia bigemina*. Parasitology. 1968; 58: 663-670.
- 44 Callow LL y Dalglish RJ. Immunity and Immunopathology in Babesiosis. Immunology of Parasitic Infections. (2nd Edition). Oxford. Blackwell Scientific Publications, 1982, p. 475-526.
- 45 Callow LL, Emmerson FR, Parker RJ, Knott SG. Infection rates and outbreaks of disease due to *Babesia argentina* in unvaccinated cattle on 5 beef properties in south-eastern Queensland. Aust Vet J. 1976a; 52: 446-450.
- 46 Callow LL, McGregor W, Parker RJ, Dalglish RJ. Immunity of cattle to *Babesia bigemina* following its elimination from the host, with observations on antibody levels detected by the indirect fluorescent antibody test. Aust Vet J. 1974; 50: 12-15.
- 47 Callow LL, Quiroga QC, McCosker PJ. Serological comparison of Australian and South American strains of *Babesia argentina* and *Anaplasma marginale*. Int J Parasitol. 1976b; 6: 6307-6310.
- 48 Callow LL y Stewart NP. Immunosuppression by *Babesia bovis* against its tick vector, *Boophilus microplus*. Nature. 1978; 272: 818-819.
- 49 Campos Pereira M, Labruna MB, Szabó MPJ, Klafke GM. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Biologia, Controle e Resistencia. San Pablo, Brasil, Ed MedVet, 2008, p. 1-169.

- 50 Carrique Mas JJ, Widdowson MA, Cuellar AM, Ribera H, Walker AR. Risk of babesiosis and anaplasmosis in different ecological zones of Santa Cruz Department, Bolivia. Vet Parasitol. 2000; 93: 29-38.
- 51 Carrique Mas JJ, Morales GJ, Edelsten M. Endemic Instability for Babesiosis and Anaplasmosis in Cattle in the Bolivian Chaco. Vet J. 2000; 160: 162-164.
- 52 Cetrá B, Ramirez LM, Vanzini VR. Control de la Babesiosis y Anaplasmosis Bovina en Areas Endémicas. Noticias y Comentarios, INTA EEA Mercedes, 2000
- 53 Cocimano M, Lange A, Menvielle E. Estudio sobre equivalencias ganaderas. Prod Anim. 1975; 4: 161-190.
- 54 Conrad PA, Kjemtrup AM, Carreno RA, Thomford J, Wainwright K, Eberhard M, Quick R, Telford III SR, Herwaldt BL. Description of *Babesia duncani* n.sp. (Apicomplexa: Babesiidae) from humans and its differentiation from other piroplasms. Int J Parasitol. 2006; 36: 779-789.
- 55 Coons LB y Roshdy MA. Fine structure of the salivary glands of unfed male *Dermacentor variabilis* (Say) (Ixodoidea: Ixodidae). J Parasitol. 1973; 59: 900-912.
- 56 Costa-Júnior LM, Leite Rabelo EM, Martins Filho OA, Barbosa Ribeiro MF. Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. Vet Parasitol. 2006; 139: 231-236.
- 57 Criado-Fornelio A. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for *Babesia* and *Theileria*, with emphasis on bovine piroplasms. Parassitologia. 2007; 49: 39-44.
- 58 Criado-Fornelio A, Gonzalez-del-Rio MA, Buling-Sarana A, Barba-Carretero JC. The "expanding universe" of piroplasms. Vet Parasitol. 2004; 119: 337-345.
- 59 Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Saraña A, Barba-Carretero JC. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. Vet Parasitol 2003; 114: 173-194.

- 60 D'Andrea LAZ, Sartor IF, Madruga CR, Freitas SBZ, Kroll LB, Kronka SN. Condicao imunologica de bovinos das racas Holandesa e Nelore frente a *Babesia bovis* e *B. bigemina* em duas regioes do estado de Sao Paulo. Pesq Vet Bras. 2006; 26: 74-78.
- 61 Dalgliesh RJ y Stewart NP. The extraction of infective *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* from tick eggs and *B. bigemina* from unfed larval ticks. Aust Vet J. 1978; 54: 453-454.
- 62 Dalgliesh RJ y Stewart NP. Some effects of time, temperature and feeding on infection rates with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus* larvae. Int J Parasitol. 1982; 12: 323-326.
- 63 Dallwitz MJ, Young AS, Mahoney DF, Sutherst RW. Comparative epidemiology of tick-borne diseases of cattle with emphasis on modelling. Int J Parasitol. 1987; 17: 629-637.
- 64 Dantrakool A, Somboon P, Hashimoto T, Saito-Ito A. Identification of a new type of *Babesia* species in wild rats (*Bandicota indica*) in Chiang Mai Province, Thailand. J Clin Microbiol. 2004; 42: 850-854.
- 65 Davey RB, Garza J, Thompson GD. Seasonal observations on the development and ovipositional capability of *Boophilus annulatus* and *B. microplus* (Acari: Ixodidae) reared on bovines. J Med Entomol. 1982; 19: 24-28.
- 66 de Souza AP, Surkamp V, Bellato V, Sartor AA, Farias LM. Prevalência de anticorpos anti-*Babesia* em bovinos no planalto norte de Santa Catarina. Rev Cient Agrovet. 2002; 1: 21-23.
- 67 de Vos AJ. Epidemiology and control of bovine babesiosis in South Africa. J S Afr Vet Assoc. 1979; 50: 357-362.
- 68 de Vos AJ, Dalgliesh RJ, Callow LL. Babesia. En: Soulsby E JL Immune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology, and Immunoprophylaxis. Florida. CRC Press, 1987, p. 183-222.
- 69 de Vos AJ, de Waal DT, Jackson LA. Bovine babesiosis. En: Coetzer JAW y Tustin RC Infectious Diseases of Livestock. Capetown. Oxford University Press, 2006, p. 405-424.

- 70 de Vos AJ y Potgieter FT. The effect of tick control on the epidemiology of bovine babesiosis. Onderstepoort J Vet Res. 1983; 50: 3-5.
- 71 Douglas, J. R. The internal anatomy of *Dermacentor andersoni* Stiles. Berkeley, Los Angeles, USA, University of California Press, 1943, p. 207-272.
- 72 Echaide IE, de Echaide ST, Guglielmone AA. Live and soluble antigens for cattle protection to *Babesia bigemina*. Vet Parasitol. 1993; 51: 35-40.
- 73 Eckell, O. Veterinaria Práctica. 8va. Edición. Buenos Aires, Argentina, Ed El Ateneo, 1977, p. 340-344.
- 74 Estrada-Peña A, Venzal JM, Nava S, Mangold A, Guglielmone AA, Labruna MB, de la Fuente J. Reinstatement of *Rhipicephalus (Boophilus) australis* (Acari: Ixodidae) with redescription of the adult and larval stages. J Med Entomol. 2012; 49: 794-802.
- 75 FAO. El control de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten. Manual práctico de campo. 1ra reimpression en Español. Roma, Italia, FAO-OIE, 1988, p. 1-458.
- 76 Friedhoff KT. Transmission of Babesia. En: Ristic M Babesiosis of Domestic Animals and Man. Boca Raton, Florida. CRC, 1988, p. 23-52.
- 77 Friedhoff KT y Smith RD. Transmission of Babesia by ticks. En: Ristic M y Kreier JP Babesiosis. New York. Academic Press, 1981, p. 267-321.
- 78 Gaido AB, Aguirre DH, de Echaide ST, Guglielmone AA. Incidencia clínica de infecciones primarias por *Babesia bovis* en bovinos lecheros del valle de Lerma, provincia de Salta. Vet Arg. 1997; 14: 460-463.
- 79 Gaido AB y Guglielmone AA. Infection dynamics of *Babesia* spp. kinetes in naturally infected, engorged, female *Boophilus microplus*. Ann Trop Med Parasitol. 1995; 89: 309-311.
- 80 Ginzburg R, Adámoli J, Herrera P, Torrella S. Los Humedales del Chaco: Clasificación, Inventario y Mapeo a Escala Regional. INSUGEO, Miscelánea. 2005; 14: 121-138.

- 81 Goff WL, Bastos RG, Brown WC, Johnson WC, Schneider DA. The bovine spleen: interactions among splenic cell populations in the innate immunologic control of hemoparasitic infections. Vet Immunol Immunopathol. 2010; 138: 1-14.
- 82 González de Ríos L. Inmunidad pasiva y activa contra *Babesia bovis* en terneros de un area enzootica del noroeste argentino. Rev Iber Parasitol. 1987; 47: 237-245.
- 83 González de Ríos L, Aguirre DH, Gaido AB. Evaluación de la dinámica de la infección por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en terneros. Diagnóstico por microscopía directa y prueba de inmunofluorescencia indirecta. Rev Med Vet. 1988; 69: 254-260.
- 84 González de Ríos L, Aguirre DH, Gaido AB. Infección natural por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en dos rodeos bovinos con diferentes niveles de infestación por *Boophilus microplus*. Rev Latinoam Microbiol. 1989; 31: 39-43.
- 85 Guardia L y Tornarolli L. Boom agrícola y persistencia de la pobreza rural en Argentina. En: da Silva JG, Gómez SE, Castañeda RS Boom agrícola y persistencia de la pobreza rural. Estudio de ocho casos. Roma. FAO, 2009, p. 65-102.
- 86 Guedes Junior GS, Araújo FR, Silva FJM, Rangel CP, Barbosa JD, Fonseca AH. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the northeastern region of the state of Pará, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2008; 17: 105-109.
- 87 Guglielmone, A. A. Garrapatas y enfermedades transmitidas por ellas: Diez primeros años de estudio en la Unidad Regional de Investigación en Sanidad Animal del Noroeste Argentino. IDIA 1987; 31-61.
- 88 Guglielmone AA. Progresos en las investigaciones sobre garrapatas en el INTA-Salta, Argentina, hasta 1985. Therios. 1989; 14: 31-48.

- 89 Guglielmone AA. Epizootiología de las enfermedades hemoparasitarias de los vacunos. Santiago de Chile, Chile, Oficina Regional de la FAO para America Latina y el Caribe, Editor. 1991a; p. 1-54.
- 90 Guglielmone AA. Problemática de las garrapatas de los vacunos en la Argentina. An Acad Nac Agro Vet, 1991b; 45: 11-14.
- 91 Guglielmone AA. Control y prevención de las enfermedades transmitidas por las garrapatas. En: Fernandez-Baco S Avances en la producción de leche y carne en el Trópico Americano. Santiago de Chile. Ofic. Reg. Amer Lat Caribe, 1992a, p. 369-414.
- 92 Guglielmone AA. The level of infestation with the vectors of cattle babesiosis in Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992b; 87: 133-137.
- 93 Guglielmone AA. Epidemiología y prevención de los hemoparasitos (Babesia y Anaplasma) en la Argentina. En: Nari A y Fiel C Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control. Montevideo. Editorial Hemisferio Sur, 1994, p. 461-479.
- 94 Guglielmone AA. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. Vet Parasitol. 1995; 57: 109-119.
- 95 Guglielmone AA. La prevención de la Babesiosis y la Anaplasmosis de los bovinos. Veterinaria. 1996; 32: 5-6.
- 96 Guglielmone AA, Aguirre DH, Späth EJA, Gaido AB, Mangold AJ, de Ríos LG. Long-term study of incidence and financial loss due to cattle babesiosis in an Argentinian dairy farm. Prev Vet Med. 1992a; 12: 307-312.
- 97 Guglielmone AA, Castelli ME, Mangold AJ, Aguirre DH, Alcaraz E, Cafrune MM, Cetrá B, Luciani CA, Suárez VH. El uso de acaricidas para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) en la Argentina. RIA. 2007; 36: 155-167.

- 98 Guglielmone AA, de Echaide ST, Pérez y Santaella M, Iglesias JA, Vanzini VR, Lugaresi CI, Dellepiane EL. Cross-sectional estimation of *Babesia bovis* antibody prevalence in an area of Argentina used for extensive cattle breeding as an aid to control babesiosis. Prev Vet Med. 1997a; 30: 151-154.
- 99 Guglielmone AA, Echaide ST, Mangold AJ, Echaide IE, Abdala AA, Anziani OS, Aguirre DH, Montenegro-James S, Patarroyo JH, Alonso M, Camus E, Cordoves CO, Kessler RH, Martins JR, Nari A, Solari MA, Toro M, Vega y Murguía CA, Arellano Sota C. Producción de sueros patrones anti- *Babesia bovis*, anti- *Babesia bigemina*, anti- *Anaplasma marginale* y negativos. Santiago de Chile, Chile, Oficina Regional de la FAO para America Latina y el Caribe, Editor 1997b; p. 1-17.
- 100 Guglielmone AA, Gaido AB, Aguirre DH, Cafrune MM. Some quantitative aspects of natural babesial infection in the haemolymph of *Boophilus microplus* engorged female ticks. Parasite. 1997c; 4: 337-341.
- 101 Guglielmone AA, Gaido AB, Mangold AJ. Light microscopy diagnosis of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* kinetes in the haemolymph of artificially infected *Boophilus microplus* engorged female ticks. Vet Parasitol. 1996; 61: 15-20.
- 102 Guglielmone AA, Hadani A, Mangold AJ, de Haan L, Bermudez A. Garrapatas (Ixodoidea-Ixodidae) del ganado bovino en la provincia de Salta: especies y carga en 5 zonas ecológicas. Rev Med Vet. 1981; 62: 194-206.
- 103 Guglielmone AA, Lugaresi CI, Volpogni MM, Anziani OS, Vanzini VR. Babesial antibody dynamics after cattle immunisation with live vaccines, measured with an indirect immunofluorescence test. Vet Parasitol. 1997d; 70: 33-39.
- 104 Guglielmone AA y Mangold AJ. Areas del Noroeste Argentino consideradas libres de *Boophilus microplus* (Can. 1888). Anales INTA Salta. 1987; 1: 27-30.

- 105 Guglielmone AA, Mangold AJ, Aguirre DH, de Ríos LG, De Olsen AA. Vacunación simultánea con *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* atenuadas, congeladas en nitrógeno líquido con DMSO o glicerol como crioprotectores. Rev Med Vet. 1989a; 70: 176-182.
- 106 Guglielmone AA, Mangold AJ, Aguirre DH, Gaido AB. Ecological aspects of four species of ticks found on cattle in Salta, northwest Argentina. Vet Parasitol. 1990a; 35: 93-101.
- 107 Guglielmone AA, Mangold AJ, Aguirre DH, Gaido AB, De Olsen AA. The effect of infection by *Babesia sp.* on some biological parameters of engorged females of *Boophilus microplus*. Folia Parasitol. 1989b; 36: 1-6.
- 108 Guglielmone AA, Mangold AJ, Bermudez AC, Hadani A. Detección de merozoitos grandes (vermiculos) de *Babesia* en teleoginas de *Boophilus microplus* alimentadas sobre terneros con distintos niveles de parasitemia de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* (= *Babesia argentina*). Rev Iber Parasitol. 1985; 45: 303-311.
- 109 Guglielmone AA, Mangold AJ, Gaido AB, Aguirre DH. Parasitismo natural por *Boophilus microplus* de bovinos Hereford, Criolla, Nelore y cruzas Hereford x Nelore. Rev Med Vet. 1990b; 71: 108-117.
- 110 Guglielmone AA, Mangold AJ, Gaido AB, Aguirre DH. 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. 1992b; 52: 77-82.
- 111 Habich GE, González de Ríos L, Hadani A, Condrón RJ, de Haan L, Broadbent DW. Estudios sobre sanidad animal en el noroeste argentino VIII. Prevalencia de animales con anticuerpos séricos contra *Babesia bovis* y *Anaplasma marginale* en tambos de Catamarca, Salta y Tucumán. Rev Med (Bs As). 1982; 63: 316-328.
- 112 Harrison A y Bennett NC. The importance of the aggregation of ticks on small mammal hosts for the establishment and persistence of tick-borne pathogens: an investigation using the R(0) model. Parasitology. 2012; 139: 1605-1613.

- 113 Hermans P, Dwinger RH, Buening GM, Herrero MV. Seasonal incidence and hemoparasite infection rates of Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) detached from cattle in Costa Rica. Rev Biol Trop. 1994; 42: 623-632.
- 114 Hitchcock LF. Studies on the non-parasitic stages of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). Aust J Zool. 1955; 3: 295-311.
- 115 Hodgson JL. Biology and transmission of *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus*. Ann N Y Acad Sci. 1992; 653: 42-51.
- 116 Hodgson JL, Stiller D, Jasmer DP, Buening GM, Wagner GG, Mc Guire TC. *Babesia bigemina*: Quantification of Infection in Nymphal and Adult *Boophilus microplus* Using a DNA Probe. Exp Parasitol. 1992; 74: 117-126 .
- 117 Holman PJ, Craig TM, Crider DL, Petrini KR, Rhyan J, Wagner GG. Culture isolation and partial characterization of a *Babesia sp.* from a North American elk (*Cervus elaphus*). J Wildl Dis. 1994; 30: 460-465.
- 118 Hooker WA, Bishopp FC, Wood HP. The life history and bionomics of some North American ticks. U S Dep Agric Bur Entomol Bull. 1912; 1-235.
- 119 Houe H, Ersbøll AK, Toft N, Agger JF. Veterinary Epidemiology: From Hypothesis to Conclusion. Frederiksberg, Denmark, Center for Skov, Landskab og Planlægning, Københavns Universitet, 2002, p. 250
- 120 Hoyte HMD. The Tick-fever parasites of cattle. Proc R Soc Qd. 1976; 87: 5-13.
- 121 Ivancovich JC, Braithwaite GB, Barnett SF. Comportamiento de los estados no-parasitarios de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Canestrini). Bol EERA-INTA Buenos Aires Argentina. 1982; 82: 1-40.

- 122 Ivancovich JC, Braithwaite GB, Barnett SF. Comportamiento de los estados no-parasitarios de la garrapata del ganado - *Boophilus microplus* (Canestrini). Bol EERA-INTA P R Saenz Peña Argentina. 1984; 88: 3-129.
- 123 Jinnai M, Kawabuchi-Kurata T, Tsuji M, Nakajima R, Hirata H, Fujisawa K, Shiraki H, Asakawa M, Nasuno T, Ishihara C. Molecular evidence of the multiple genotype infection of a wild Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*) by *Babesia* sp. UR1. Vet Parasitol. 2010; 173: 128-133.
- 124 Jonsson NN, Bock RE, Jorgensen WK, Morton JM, Stear MJ. Is endemic stability of tick-borne disease in cattle a useful concept? Trends Parasitol. 2012; 28: 85-89.
- 125 Kakoma I y Mehlhorn H. *Babesia* of domestic animals. En: Kreier JP y Baker JR Parasitic Protozoa. Second. San Diego, California. Academic Press, Inc., 1994, p. 141-216.
- 126 Karaagaoglu E. Estimation of the Prevalence of a Disease from Screening Tests. Tr J of Med Sci. 1999; 29: 425-430.
- 127 Kjemtrup AM, Kocan AA, Whitworth L, Meinkoth J, Birkenheuer AJ, Cummings J, Boudreaux MK, Stockham SL, Irizarry-Rovira A, Conrad PA. There are at least three genetically distinct small piroplasms from dogs. Int J Parasitol. 2000a; 30: 1501-1505.
- 128 Kjemtrup AM, Thomford J, Robinson T, Conrad PA. Phylogenetic relationships of human and wildlife piroplasm isolates in the western United States inferred from the 18S nuclear small subunit RNA gene. Parasitology. 2000b; 120: 487-493.
- 129 Kjemtrup AM, Wainwright K, Miller M, Penzhorn BL, Carreno RA. *Babesia conradae*, sp. Nov., a small canine *Babesia* identified in California. Vet Parasitol. 2006; 13873: 103-111.
- 130 Knell RJ, Begon M, Thompson DJ. Host-pathogen population dynamics, basic reproductive rates and threshold densities. Oikos. 1998; 299-308.
- 131 Kulldorff M. A spatial scan statistic. Communications in Statistics- Theory and methods. 1997; 26: 1481-1496.

- 132 Lack JB, Reichard MV, Van den Bussche RA. Phylogeny and evolution of the Piroplasmida as inferred from 18S rRNA sequences. Int J Parasitol. 2012; 42: 353-363.
- 133 Latif BMA, Said MS, Ali SR. Effect of age on the immune response of cattle experimentally infected with *Babesia bigemina*. Vet Parasitol. 1979; 5: 307-314.
- 134 Levine ND. Taxonomy of the piroplasms. Trans Amer Micros Soc. 1971; 90: 2-33.
- 135 Levy MG, Clabaugh G, Ristic M. Age resistance in bovine babesiosis: role of blood factors in resistance to *Babesia bovis*. Infect Immun. 1982; 37: 1127-1131.
- 136 Lew RA y Levy PS. Estimation of prevalence on the basis of screening tests. Stat Med. 1989; 8: 1225-1230.
- 137 Lignieres J. La piroplasmose bovine. Nouvelles recherches et observations sur la multiplicité de parasites, leur évolution, la transmission naturelle de la maladie et vaccination. Arch Parasitenk. 1903; 7: 398-407.
- 138 Lombardero OJ, Schiffó HP, Bettinotti CA. Tristeza y Premunición. Primer Simposio de Actualización Veterinaria del Nordeste, 1976, p 7-38, Corrientes, Argentina.
- 139 Lopez-Rebollar LM, Penzhorn BL, de Waal DT, Lewis BD. A possible new piroplasm in lions from the Republic of South Africa. J Wildl Dis. 1999; 35: 82-85.
- 140 Luo J, Yin H, Liu Z, Yang D, Guan G, Liu A, Ma M, Dang S, Lu B, Sun C, Bai Q, Lu W, Chen P. Molecular phylogenetic studies on an unnamed bovine *Babesia* sp. based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. Vet Parasitol. 2005; 133: 1-6.
- 141 Macdonald G. The analysis of infection rates in diseases in which superinfection occurs. Trop Dis Bull. 1950; 47: 907-915.
- 142 Mackenstedt U, Gauer M, Fuchs P, Zapf F, Schein E, Mehlhorn H. DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. Parasitol Res. 1995; 81: 595-604.

- 143 Mackenstedt U, Gauer M, Mehlhorn H, Schein E, Hauschild S. Sexual cycle of *Babesia divergens* confirmed by DNA measurements. Parasitol Res. 1990; 76: 199-206.
- 144 Madrugá CR, Marques AP, Araujo FR, Miquita M, Carvalho CME, Araujo F, Umaki A, Crocci AJ, Queiroz RA. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle and its application in an epidemiological survey in Brazil. Pesq Vet Bras. 2001; 21: 72-76.
- 145 Mahoney DF. The Epidemiology of Babesiosis in Cattle. Aust J Sci. 1962; 24: 310-313.
- 146 Mahoney DF. Bovine babesiosis: a study of factors concerned in transmission. Ann Trop Med Parasitol. 1969; 63: 1-14.
- 147 Mahoney DF. Babesiosis of cattle. Aust Meat Res Committee Rev. 1973; 12: 21-
- 148 Mahoney DF. The application of epizootiological principles in the control of Babesiosis in cattle. Trop Dis Bull. 1974; 123-137.
- 149 Mahoney DF y Mirre GB. Bovine babesiosis: estimation of infection rates in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). Ann Trop Med Parasitol. 1971; 65: 309-317.
- 150 Mahoney DF y Mirre GB. A note on the transmission of *Babesia bovis* (syn *B. argentina*) by the one-host tick, *Boophilus microplus*. Res Vet Sci. 1979; 26: 253-254.
- 151 Mahoney DF y Ross DR. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. Aust Vet J. 1972; 48: 292-298.
- 152 Mahoney DF, Wright IG, Goodger BV. Immunity in cattle to *Babesia bovis* after single infections with parasites of various origin. Aust Vet J. 1979; 55: 10-12.
- 153 Mahoney DF, Wright IG, Goodger BV, Mirre GB, Sutherst RW, Utech KBW. The transmission of *Babesia bovis* in herds of European and Zebu x European cattle infested with the tick, *Boophilus microplus*. Aust Vet J. 1981; 57: 461-469.

- 154 Mahoney DF, Wright IG, Mirre GB. Bovine babesiosis: The persistence of immunity to *Babesia argentina* and *B. bigemina* in calves (*Bos Taurus*) after naturally acquired infection. Ann Trop Med Parasitol. 1973; 67: 197-203.
- 155 Malandrin L, Jouglin M, Sun Y, Brisseau N, Chauvin A. Redescription of *Babesia capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962) from roe deer (*Capreolus capreolus*): isolation, cultivation, host specificity, molecular characterisation and differentiation from *Babesia divergens*. Int J Parasitol. 2010; 40: 277-284.
- 156 Mangold AJ, Aguirre DH, Cafrune MM, de Echaide ST, Guglielmone AA. Evaluation of the infectivity of a vaccinal and a pathogenic *Babesia bovis* strain from Argentina to *Boophilus microplus*. Vet Parasitol. 1993; 51: 143-148.
- 157 Mangold AJ, Aguirre DH, Gaido AB, de Ríos LG, Guglielmone AA. Evaluación de la infectividad de una vacuna congelada en nitrógeno líquido elaborada en base a *Babesia bovis* atenuada. Rev Med Vet. 1988; 69: 265-267.
- 158 Mangold AJ, Aguirre DH, Gaido AB, Guglielmone AA. Seasonal variation of ticks (Ixodidae) in *Bos taurus* x *Bos indicus* cattle under rotational grazing in forested and deforested habitats in northwestern Argentina. Vet Parasitol. 1994; 54: 389-395.
- 159 Mangold AJ, Bermúdez AC, Anziani OS, Abdala AA, Guglielmone AA. Efectos clínicos de *Babesia bigemina* vacunal o patógena en novillos Holando Argentino. Rev Med Vet. 1992; 73: 43-45.
- 160 Mangold AJ, Bermúdez AC, Kühne GI, Guglielmone AA. Garrapatas (Ixodoidea - Ixodidae) del ganado bovino en Santiago del Estero. I. Especies y carga en el sureste de la provincia. Rev Med Vet (Bs As). 1985; 66: 134-137.
- 161 Mangold AJ, Bermúdez AC, Kühne GI, Guglielmone AA. Garrapatas (Ixodoidea - Ixodidae et Argasidae) del ganado bovino en Santiago del Estero. II. Especies y carga en el noreste y sudoeste de la provincia. Rev Med Vet (Bs As). 1987; 68: 142-146.

- 162 Manop Muangyai DVM. Quantitative Untersuchungen zur transovarialen Infektion von *Boophilus microplus* (Ixodoidea) mit *Babesia bigemina* (Piroplasma). Tesis Inaugural. Tierärztliche Hochschule Hannover. 1974.
- 163 Manzoli DE, Antoniazzi LR, Saravia MJ, Silvestri L, Rorhmann D, Beldomenico PM. Multi-level determinants of parasitic fly infection in forest passerines. PLOS One. 2013; 8: e67104
- 164 Marinkelle CJ. *Babesia* sp. in Colombian bats (Microchiroptera). J Wildl Dis. 1996; 32: 534-535.
- 165 Martins JR, Correa BL, Ceresér VH, Arteche CCP, Guglielmo AA. Some aspects of the epidemiology of *Babesia bovis* in Santana do Livramento, southern Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 1994; 3: 75-78.
- 166 Mastropaolo M, de Echaide ST, Mangold AJ. Factores relacionados con la epidemiología de babesiosis bovina en rodeos del sudoeste del Chaco. V Congreso Argentino de Parasitología. Acta Bioquím Clín Latinoam 2009; Supl. 1: 156.
- 167 Mastropaolo M, Nava S, Guglielmo AA, Mangold A. Developmental changes in salivary glands of nymphs and adults of the spinose ear tick *Otobius megnini*. J Parasitol. 2011; 97: 535-537.
- 168 Mastropaolo M, Torioni de Echaide S, Cuatrin A, Arece H, Lobato S, Mangold AJ. Situación de la Babesiosis y Anaplasmosis de los bovinos en el sudoeste de la provincia del Chaco (Argentina). Revista FAVE - Ciencias Veterinarias. 2009b; 8: 29-35.
- 169 May RM y Anderson RM. Population biology of infectious diseases: Part II. Nature. 1979; 280: 455-461.
- 170 McCosker PJ. The global importance of Babesiosis. En: Ristic M y Kreier JP Babesiosis. New York. Academic Press INC., 1981, p. 1-24.
- 171 Megaw MJW y Beadle DJ. Structure and function of the salivary glands of the tick, *Boophilus microplus* Canestrini (Acarina: Ixodidae). Int J Insect Morphol & Embryol. 1979; 8: 67-83.

- 172 Mehlhorn H y Schein E. The Piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages. En: Baker JR y Muller R Advances in Parasitology. London. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, 1984, p. 37-101.
- 173 Mehlhorn H y Schein E. The Piroplasms: "A Long Story in Short" or "Robert Koch has Seen it". Europ J Protistol. 1993, 29: 279-293.
- 174 Morand S y Deter J. Parasitism and regulation of the host population. En: Thomas F, Guegan JF, Renaud F Ecology and Evolution of Parasitism. 1. New York. Oxford University Press, 2009, p. 83-105.
- 175 Morello JH, Rodriguez AF, Silva M. Escenario ecológico y socioeconómico: Clasificación de Ambientes en Áreas Protegidas de las Ecorregiones del Chaco Humedo y Chaco Seco. En: Morello JH y Rodriguez AF El Chaco sin bosques: la Pampa o el desierto del futuro. Buenos Aires. Orientación Gráfica Editora S.R.L., 2009, p. 53-91.
- 176 Morrison DA. Evolution of the Apicomplexa: where are we now? Trends Parasitol. 2009; 25: 375-382.
- 177 Morzaria SP y Young AS. Identification of *Babesia bigemina* in the tick *Boophilus decoloratus* by the indirect fluorescent antibody technique. Res Vet Sci. 1977; 23: 55-58.
- 178 Nari A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. Vet Parasitol. 1995; 57: 153-165.
- 179 Nava S, Mangold AJ, Guglielmone AA. The natural hosts of larvae and nymphs of *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). Vet Parasitol. 2006; 140: 124-132.
- 180 Nava S, Mastropaolo M, Mangold AJ, Guglielmone AA. Effect of deforestation and introduction of exotic grasses for livestock forage on the population dynamics of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in northern Argentina. Res Vet Sci. 2013; 95: 1046-1054.
- 181 Nielsen K, Gall D, Kelly W, Vigliocco A, Henning D, Garcia M. Immunoassay development: application to enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis. Agriculture and Agri-Food Canada Monograph. 1996, p. 17-83

- 182 Nuñez JL, Muñoz Cobeñas ME, Moltedo L. *Boophilus microplus*. La garrapata común del ganado vacuno. 1ra reimpression corregida y actualizada con apéndices. Buenos Aires, Argentina. Ed Hemisferio Sur S.A., 1987, p 1-184.
- 183 Nuñez JL, Pugliese ME, Hayes RP. *Boophilus microplus* Can. Estudio sobre los estadios parasitarios del ciclo biológico. Rev Med Vet. 1972; 53: 19-35.
- 184 Oliveira MCS, Oliveira-Sequeira TCG, Araujo JP, Amarante AFT, Oliveira HN. *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, Brazil. Vet Parasitol. 2005; 130: 61-67.
- 185 Oosthuizen M, Allsopp BA, Troskie M, Collins NE, Penzhorn BL. Identification of the novel *Babesia* and *Theileria* species in South African giraffe (*Giraffa camelopardalis*, Linnaeus, 1758) and roan antelope (*Hippotragus equinus*, Desmarest 1804). Vet Parasitol. 2008; 163: 39-46.
- 186 Ouhelli H, Pandey VS, Aboughal A. Effect of infection by *Babesia* spp. on the development and survival of free-living stages of *Boophilus annulatus*. Vet Parasitol. 1987; 23: 147-154.
- 187 Ouhelli H y Schein E. Effect of temperature on transovarial transmission of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in *Boophilus annulatus* (Say, 1821). Vet Parasitol. 1988; 26: 229-235.
- 188 Paolasso P, Krapovickas J, Gasparri NI. Deforestación, expansión agropecuaria y dinámica demográfica en el Chaco Seco Argentino durante la década de los noventa. LARR. 2012; 47: 35-63.
- 189 Parker RJ, Shepherd RK, Trueman KF, Jones GW, Kent AS, Polkinghorne IG. Susceptibility of *Bos indicus* and *Bos taurus* to *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* infections. Vet Parasitol. 1985; 17: 205-213.
- 190 Patarapadungkit N, Nuchadomrong S, Sattayasai N, Indrakamhang P, Daduang S. Specific and Highly Sensitive Primers for PCR Detection of *Babesia bovis*. Sci Asia. 2004; 30: 67-73.

- 191 Payne RC y Osorio O. Tick-borne diseases of cattle in Paraguay. I. Seroepidemiological studies on anaplasmosis and babesiosis. Trop Anim Health Prod. 1990; 22: 53-60.
- 192 Peirce MA. Order Piroplasmorida Wenyon, 1926. En: Lee JJ, Leedale GF, Bradbury P An Illustrated Guide to the Protozoa. 2da edición. Lawrence, Kansas. Society of Protozoologists, 2000, p. 347-352.
- 193 Penzhorn BL, Kjemtrup AM, Lopez-Rebollar LM, Conrad PA. *Babesia leo* n. sp. from lions in the Kruger National Park, South Africa, and its relation to other small piroplasms. J Parasitol. 2001; 87: 681-685.
- 194 Perkins SE, Cattadori IM, Tagliapietra V, Rizzoli AP, Hudson PJ. Empirical evidence for key hosts in persistence of a tick-borne disease. Int J Parasitol. 2003; 33: 909-917.
- 195 Piantadosi S, Byar DP, Green SB. The ecological fallacy. Am J Epidemiol. 1988; 127: 893-904.
- 196 Pipano E, Shkap V, Kriegel Y, Leibovitz B, Savitsky I, Fish L. *Babesia bovis* and *B. bigemina*: Persistence of infection in friesian cows following vaccination with live antibabesial vaccines. Vet J. 2002; 164: 64-68.
- 197 Pipano E, Weisman Y, Raz A, Klinger I. Immunity to *Babesia bigemina* in calves after successful babesicidal treatment of a previous infection. Refuah Vet. 1972; 29: 1-8.
- 198 Potgieter FT y Els HJ. Light and electron microscopic observations on the development of *Babesia bigemina* in larvae, nymphae and non-replete females of *Boophilus decoloratus*. Onderstepoort J Vet Res. 1977; 44: 213-232.
- 199 Poulin R. The disparity between observed and uniform distributions: a new look at parasite aggregation. Int J Parasitol. 1993; 23: 937-944.
- 200 Poulin R. Evolutionary Ecology of Parasites. Londres, UK, Chapman & Hall, 1998,p. 1-212.

- 201 Quintao-Silva MG, Melo MN, Ribeiro MF. Comparison of duplex PCR and microscopic techniques for the identification of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in engorged female ticks of *Boophilus microplus*. Zoonoses Public Health. 2007; 54: 147-151.
- 202 Randolph SE. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. Parasitology. 2004; 129: 37-65.
- 203 Randolph SE, Chemini C, Furlanello C, Genchi C, Hails RS, Hudson PJ, Jones LD, Medley G, Norman RA, Rizzoli AP, Smith G, Woolhouse MEJ. The ecology of tick-borne infections in wildlife reservoirs. En: Hudson PJ, Rizzoli AP, Grenfell BT, Heesterbeek H, Dobson AP The Ecology of Wildlife Diseases. Oxford University Press, 2002, p. 119-194.
- 204 Randolph SE y Storey K. Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. J Med Entomol. 1999; 36: 741-748.
- 205 Ribera Cuéllar H, Cuellar AM, Barba Chávez G, Carrique-Mas JJ, Walker A. Estudio sobre babesiosis y anaplasmosis en relación con la carga de garrapatas en terneros lecheros del oriente boliviano. Vet Mex. 2000; 31: 39-46.
- 206 Riek RF. Immunity to Babesiosis. En: Garnham PCC, Pierce AE, Roitt I Immunity to Protozoa. 1. Oxford. Blackwell Scientific Publications, 1963, p. 160-179.
- 207 Riek RF. The Life Cycle of *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) in the Tick Vector *Boophilus microplus* (Canestrini). Aust J Agric Res. 1964; 15: 802-821.
- 208 Riek RF. The life cycle of *Babesia argentina* (Lignieres, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). Aust J Agric Res. 1966; 15: 802-821.
- 209 Roberts JA. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II. Stages of the life cycle of the parasite against which resistance is manifest. J Parasitol. 1968; 54: 667-673.
- 210 Rosa R, Pugliese A, Norman R, Hudson PJ. Thresholds for disease persistence in models for tick-borne infections including non-viraemic transmission, extended feeding and tick aggregation. J Theor Biol. 2003; 224: 359-376.

- 211 Rosenbusch F. Estudios sobre la tristeza. Evolución del piroplasma *bigeminum* en la garrapata *Boophilus microplus* Can. Lah. Nota preliminar. Bol Inst Clín Quirúrg Bs As. 1927; 3: 347-361.
- 212 Rosenbusch F y Gonzalez R. Garrapatización y Tristeza. Rev Med Vet. 1923; 6: 683-703.
- 213 Ross DR y Mahoney DF. Bovine babesiosis: Computer simulation of *Babesia argentina* parasite rates in *Bos taurus* cattle. Ann Trop Med Parasitol. 1974; 68: 385-392.
- 214 Rossanigo C, Arano A, Rodriguez Vázquez G. Stock 2012 del ganado bovino. Mapas de existencias e indicadores ganaderos. Ediciones INTA EEA San Luis. 2012; 1-17.
- 215 Rubaire-Akiiki C, Okello-Onen J, Nasinyama GW, Vaarst M, Kabagambe EK, Mwayi W, Musunga D, Wandukwa W. The prevalence of serum antibodies to tick-borne infections in Mbale District, Uganda: the effect of agro-ecological zone, grazing management and age of cattle. J Insect Sci. 2004; 4: 1-8
- 216 Rudzinska MA. Morphologic aspects of Host-Cell-Parasite relationships in Babesiosis. En: Ristic M y Kreier JP Babesiosis. New York. Academic Press, 1981, p. 87-141.
- 217 Rudzinska MA, Spielman A, Lewengrub S, Trager W, Piesman J. Sexuality in piroplasms as revealed by electron microscopy in *Babesia microti*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983; 80: 2966-2970.
- 218 Ruef BJ, Ward TJ, Oxner CR, Conley PG, Brown WC, Rice-Ficht AC. Phylogenetic analysis with newly characterized *Babesia bovis* hsp70 and hsp90 provides strong support for paraphyly within the piroplasms. Mol Biochem Parasitol. 2000; 109: 67-72.
- 219 Schiffo HP y Lombardero OJ. Los derivados del cebu frente a la piroplasmosis y babesiosis. Gac Vet Bs As. 1964; 26: 147-154.
- 220 Schnittger L, Yin H, Gubbels MJ, Beyer D, Niemann S, Jongejan F, Ahmed JS. Phylogeny of sheep and goat Theileria and Babesia parasites. Parasitol Res. 2003; 91: 398-406.

- 221 Sergent E y Sergent Et. History of the concept of "relative immunity or "premuniton" correlated to latent infection. Indian J Malariol. 1956; 10: 53-80.
- 222 Shaw DJ, Grenfell BT, Dobson AP. Patterns of macroparasite aggregation in wildlife host populations. Parasitology. 1998; 117: 597-610.
- 223 Shkap V, Leibovitz B, Krigel Y, Hammerschlag J, Marcovics A, Fish L, Molad T, Savitsky I, Mazuz M. Vaccination of older *Bos taurus* bulls against bovine babesiosis. Vet Parasitol. 2005; 129: 235-242.
- 224 Smith RD. Epidemiology of Babesiosis. En: Ristic M, Ambroise-Thomas P, Kreier JP Malaria and babesiosis. 1. Dordrech, The Netherlands. Martinus Nijhoff Publishers, 1984, p. 207-232.
- 225 Smith RD, Evans DE, Martins JR, Cereser VH, Correa BL, Petraccia C, Cardozo H, Solari MA, Nari A. Babesiosis (*Babesia bovis*) stability in unstable environments. Ann N Y Acad Sci. 2000; 916: 510-520.
- 226 Smith RD y Kakoma I. A reappraisal of vector control strategies for babesiosis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989; 83: 43-52.
- 227 Smith T y Kilborne FL. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. Washington, USA, Government printing office. 1893; 1: 1-301.
- 228 Soares JF, Girotto A, Brandao PE, Da Silva AS, Franca RT, Lopes ST, Labruna MB. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. Vet Parasitol. 2011; 180: 203-208.
- 229 Solari MA y Quintana S. Epidemiología y Prevención de los Hemoparásitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en el Uruguay. En: Nari A y Fiel C Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control. Montevideo. Editorial Hemisferio Sur, 1994, p. 481-507.
- 230 Sosa MA, Gallo Mendoza L, Corti F, Lacelli G. Informe Impacto Sequía en el Norte de Santa Fe. Consejo Local Asesor. EEA INTA Reconquista. 2009; p. 1-41.

- 231 Sparagano OAE, Allsopp MTEP, Mank RA, Rijpkema SGT, Figueroa JV, Jongejan F. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): A review. Exp App Acarol. 1999; 23: 929-960.
- 232 Späth EJA. Un estudio epidemiológico de babesiosis y anaplasmosis bovina en el valle de Lerma, Provincia de Salta. Rev Med Vet. 1986; 67: 274-281.
- 233 Späth EJA, Gonzalez RN, de Ríos LEG, Condrón RJ, Nogues EM, Guglielmone AA, Kühne GI, Broadbent DW, Habich GE. Estudios sobre sanidad animal en el noroeste argentino. V. Brucelosis, tuberculosis, tricomoniasis y vibriosis en tambos de Tucumán y otras características sanitarias y de explotación de estos. Gac Vet. 1979; 41: 506-517.
- 234 Späth EJA, Guglielmone AA, de Ríos LEG. Utilización de un modelo matemático simple para evaluar la situación epizootológica de la babesiosis bovina. Rev Med Vet. 1987; 68: 126-131.
- 235 Späth EJA, Guglielmone AA, Signorini AR, Mangold AJ. Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas en la Argentina. 1ª parte. Therios. 1994a; 23: 341-360.
- 236 Späth EJA, Guglielmone AA, Signorini AR, Mangold AJ. Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas en la Argentina. 2ª parte. Therios. 1994b; 23: 389-396.
- 237 Späth EJA, Guglielmone AA, Signorini AR, Mangold AJ. Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas en la Argentina. 3ª parte. Therios. 1994c; 23: 454-539.
- 238 Stewart, J. Calculus-Concepts and Contexts. 3ra edición. California, USA, Brooks Cole, 2005.
- 239 Sutherst RW y Bourne AS. The effect of desiccation and low temperature on the viability of eggs and emerging larvae of the tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Ixodidae). Int J Parasitol. 2006; 36: 193-200.

- 240 Sutherst RW y Dallwitz MJ. Progress in the development of a population model for the cattle tick *Boophilus microplus*. 4th International Congress of Acarology, 1979, p. 557-563. Saalfelden, Austria.
- 241 Sutherst RW, Dallwitz MJ, Utech KBW, Kerr JD. Aspects of Host Finding by the Cattle Tick, *Boophilus microplus*. Aust J Zool. 1978; 26: 159-174.
- 242 Sutherst RW, Floyd RB, Bourne AS, Dallwitz MJ. Cattle grazing behavior regulates tick populations. Experientia. 1986; 42: 194-196.
- 243 Sutherst RW, Kerr JD, Maywald GF, Stegeman DA. The Effect of Season and Nutrition on the Resistance of Cattle to the tick *Boophilus microplus*. Aust J Agric Res. 1983; 34: 329-339.
- 244 Sutherst RW, Maywald GF, Bourne AS, Sutherland ID, Stegeman DA. Ecology of the Cattle Tick (*Boophilus microplus*) in Subtropical Australia. II Resistance of Different Breeds of Cattle. Aust J Agric Res. 1988; 39: 299-308.
- 245 Swai ES, French NP, Beauchamp G, Fitzpatrick JL, Bryant MJ, Kambarage D, Ogden NH. A longitudinal study of sero-conversion to tick-borne pathogens in smallholder dairy youngstock in Tanzania. Vet Parasitol. 2005; 131: 129-137.
- 246 Szabó MPJ, Mangold AJ, Joao CF, Bechara GH, Guglielmo AA. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari, Ixodidae) in South America. Vet Parasitol. 2005; 130: 131-140.
- 247 Takagi Nunes E, Bechara GH, Saito KC, Eloisi Denardi S, Oliveira PR, Camargo Mathias MI. Morphological, histological, and ultrastructural characterization of degenerating salivary glands in females of the cattle-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). Micron. 2005; 36: 437-447.
- 248 Takagi Nunes E, Camargo Mathias MI, Bechara GH. Structural and cytochemical changes in the salivary glands of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) tick female during feeding. Vet Parasitol. 2006; 140: 114-123.

- 249 Thompson CS. Estudio de la diversidad genética en poblaciones de *Babesia bigemina* de diferentes regiones geográficas. Tesis Doctoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. 2013.
- 250 Thrusfield, M. *Veterinary Epidemiology*. 3rd edition, reissued with updates. Oxford, Blakwell Science Ltd. 2007, p. 1-610.
- 251 Till WM. A contribution to the anatomy and histology of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Newmann. Mem Entomol Soc S Afr. 1961; 6: 1-124.
- 252 Tompkins DM, Dunn AM, Smith MJ, Telfer S. Wildlife diseases: from individuals to ecosystems. J Anim Ecol. 2011; 80: 19-38.
- 253 Torioni de Echaide S, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH, Suarez CE, McElwain TF. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. J Clin Microbiol. 1998; 36: 777-782.
- 254 Trueman KF y Blight GW. The effect of age on resistance of cattle to *Babesia bovis*. Aust Vet J. 1978; 54: 301-305.
- 255 Uilenberg G. *Babesia* - A historical overview. Vet Parasitol. 2006; 138: 3-10.
- 256 Vanzini VR, Mangold AJ, Guglielmone AA. 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. 1999; 28: 118-127.
- 257 Vanzini VR y Ramirez LM. Babesiosis y Anaplasmosis Bovina. Diagnóstico, Epidemiología y Control. RIA. 1994; 25: 137-190.
- 258 Vidotto O, Andrade GM, Amaral CHS, Barbosa CS, Freire RL, Rocha MA, Vidotto MC. Freqüência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da região de Londrina, Paraná. Arq Bras Med Vet Zootec. 1997; 49: 655-659.

- 259 Vogl S. Molekular-phylogenetische Differenzierung von Babesien des Rindes. Tesis Doctoral. Tierärztlichen Facultät. Ludwig-Maximilians-Universität München. 2004.
- 260 Wakefield J y Shaddick G. Health-exposure modeling and the ecological fallacy. Biostatistics. 2006; 7: 438-455.
- 261 Watt D, Sparagano O, Brown CGD, Walker AR. Use of the polymerase chain reaction for identification and quantification of *Theileria parva* protozoa in *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. Parasitol Res. 1997; 83: 359-363.
- 262 Weber G y Friedhoff K. Electron microscopic detection of initial and some subsequent developmental stages of *Babesia bigemina* in salivary glands of ticks. Z Parasitenkd. 1979; 58: 191-194.
- 263 Wharton RH, Harley KLS, Wilkinson PR, Utech KB, Kelley BM. A comparison of cattle tick control by pasture spelling, planned dipping and tick-resistant cattle. Aust J Agric Res. 1969; 20: 783-797.
- 264 Wharton RH y Utech KBW. The relation between engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Ixodidae) to the assessment of tick numbers on cattle. J Aust Entomol Soc. 1970; 9: 171-182.
- 265 Wilkinson PR. The spelling of pasture in cattle tick control. Aust J Agric Res. 1957; 8: 414-423.
- 266 Wilkinson PR. Pasture spelling as a control measure for cattle ticks in southern Queensland. Aust J Agric Res. 1964; 15: 822-840.
- 267 Wilson K, Bjornstad ON, Dobson AP, Merler S, Poglajen G, Randolph SE, Read AF, Skorping A. Heterogeneities in macroparasite infections: patterns and processes. *The Ecology of Wildlife Diseases*. Oxford: Oxford University Press, 2002, p. 6-44.
- 268 Woolhouse ME, Dye C, Etard JF, Smith T, Charlwood JD, Garnett GP, Hagan P, Hii JL, Ndhlovu PD, Quinnell RJ, Watts CH, Chandiwana SK, Anderson RM. Heterogeneities in the transmission

- of infectious agents: implications for the design of control programs. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94: 338-342.
- 269 Yabsley MJ, Greiner E, Tseng FS, Garner MM, Nordhausen RW, Ziccardi MH, Borjesson DL, Zabolotzky S. Description of novel *Babesia* species and associated lesions from common murrelets (*Uria aalge*) from California. J Parasitol. 2009; 95: 1183-1188.
- 270 Yabsley MJ, Murphy SM, Cunningham MW. Molecular Detection and Characterization of *Cytauxzoon felis* and a *Babesia* Species in Cougars from Florida. J Wildl Dis. 2006; 42: 366-374.
- 271 Yamada S, Konnai S, Imamura S, Simuunza M, Chembensofu M, Chota A, Nambota A, Onuma M, Ohashi K. PCR-based detection of blood parasites in cattle and adult *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. Vet J. 2009; 182: 352-355.
- 272 Young AS y Morzaria SP. Biology of *Babesia*. Parasitol Today. 1986; 2: 211-219.
- 273 Zahler M, Rinder H, Gothe R. Genotypic status of *Babesia microti* within the piroplasms. Parasitol Res. 2000a; 86: 642-646.
- 274 Zahler M, Rinder H, Schein E, Gothe R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. Vet Parasitol. 2000b; 89: 241-248.
- 275 Zar, JH. Biostatistical Analysis. 4ta Edición, New Jersey, USA, Prentice Hall ed, 1999, p. 1-663.
- 276 Zintl A, Gray JS, Skerrett HE, Mulcahy G. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. Parasite Immunol. 2005; 27: 115-120.
- 277 Zwart D. Babesiosis: Non-specific Resistance, Immunological Factors and Pathogenesis. Adv Parasitol. 1979; 17: 49-113.

APÉNDICE I

Composición de soluciones utilizadas

Solución	Composición
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ PO ₄ 1,47 mM KPO ₄ H ₂
PBS-T	0,05 M PBS 0,05 % Tween-20
Solución lisis I	0,14 M NH ₄ Cl 0,017 M Tris-CIH
Solución lisis II	0,05 M Tris-CIH 0,1 M EDTA 0,1 M NaCl 2 % SDS
Solución Citrato de sodio	10 mM Citrato de Na 140 mM NaCl
TBE 1X	90 mM Tris 90 mM Borato 0,1 mM EDTA pH 7,2
Solución de carga para ADN (3X)	0,25% Azul de bromofenol 30% Glicerol
TE	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA
Soluciones de bloqueo	TBS-T; 10% BSA (10%); 0.1% Tritón X-100 TBS-T; 15% Leche descremada; 0.1% Tritón X-100
Solución de sustrato/cromógeno ELISA	0,05 M citrato de sodio/ácido cítrico, pH 4,5 0,04 M ABTS 3% H ₂ O ₂

APÉNDICE II

Script de R para el cálculo de la prevalencia real acorde al modelo de Lew y Levy (1989)

```
#DATOS DE ENTRADA PARA LOS CÁLCULOS*

sp= #ESPECIFICIDAD

se= #SENSIBILIDAD

x= #CANTIDAD DE POSITIVOS

n= #TAMAÑO DE LA MUESTRA

p=seq((1-sp),se, by=0.00001)

nume=p**(x+1)*(1-p)**(n-x)

deno=p**(x)*(1-p)**(n-x)

tnume=sum(nume)

tdeno=sum(deno)

d=tnume/tdeno

#CALCULO DE LA PREVALENCIA

prev=(d+sp-1)/(se+sp-1)

prev

#ESTIMACION DE LA VARIANZA DE LA PREVALENCIA

vari= (prev*(1-prev))/(n*(se+sp-1)**2)

vari

#ESTIMACION DEL DESVIO ESTANDAR DE LA PREVALENCIA

desvest=sqrt(vari)

desvest

#ESTIMACION DEL INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PREVALENCIA

li95=prev-1.96*desvest

#SI EL LIMITE INFERIOR ES MENOR QUE CERO ESTE SE TRANSFORMA EN CERO.

li95

ls95=prev+1.96*desvest

ls95
```

APÉNDICE III

EPIZOOTIOLOGIA DE LA BABESIOSIS Y ANAPLASMOSIS

REMISION DE MUESTRAS AL LABORATORIO

- 1.- Nombre del establecimiento:
- 2.- Dirección :.....
- 3.- RENSPA: _ _ - _ _ - _ _ - _ _ _ _ _ / _ _ / _ _
- 4.- Responsable de la recolección y envío
- 5.- Dirección envío de los resultados
-
-
- 6.- Fecha de obtención de las muestras. ___ / ___ / ___
- 7.- Fecha de remisión de las muestras ___ / ___ / ___
- 8.- Número de muestras enviadas: _____
- 9.- Tipo de muestra enviada: 1.- Sangre entera sin anticoagulante
 2.- Suero sin centrifugar.
 3.- Suero centrifugado.
 4.- Otro
- 10.- Acondicionamiento para su envío: 1.- Refrigerado 2.- Congelado
- 11.- Medio de transporte:.....
- 12.- Edad de los bovinos de los que se obtuvieron las muestras:
 de _____ meses a _____ meses.
- 13.- Total de animales del grupo o categoría de donde se obtuvieron las muestras:

Observaciones:.....

.....

.....

.....

EPIZOOTIOLOGIA DE LA BABESIOSIS Y ANAPLASMOSIS

ENCUESTA PARA GANADEROS

DATOS DEL ESTABLECIMIENTO

1.- Nombre del propietario:

2.- Dirección del propietario:

3.- Dirección de la finca:.....

4.- Nombre del veterinario:

5.- Nombre del encargado:.....

6.- RENSPA: _ _ - _ _ - _ - _ _ _ _ / _ _ / _ _

7.- Fecha de la encuesta: _ _ / _ _ / _ _ _ _

8.- Tipo de explotación: (1: Exclusivamente ganadera; 2: Agrícola-Ganadera)

9.- Explotación ganadera: (1: Bovinos carne; 2: Bovinos leche; 3: Doble propósito)

10.- ¿Cría otro ganado? (1: Si; 2: No)

11.- ¿Qué ganado? (1: Ovino; 2: Caprino; 3: Equino; 4: Otro)

12.- ¿Qué cantidad?

ESTRUCTURA DEL RODEO: Proporción de Bos indicus:

13.- Número de toros:

14.- Número de vacas:

10.- N° vacas 1° parición:

11.- N° vaquillonas:

12.- N° novillitos 1-2 años:

13.- N° novillos > 2 años:

14.- N° animales < 1 año:

15.- Otros bovinos:

Superficie dedicada a la ganadería (ha):

Carga animal (ha / E.V.):

Si tiene genes *Bos indicus*, indique razones de su introducción:

MANEJO NUTRICIONAL DE LAS VACAS MADRES

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

(1). Pastura permanente. (2). Pastura estacional (implantada) (3). Otro.....

Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic

En caso de permanecer la pastura permanente sin animales (en descanso) indique entre que

Meses: De a

En el establecimiento se produce anegamiento? Indique la frecuencia y tiempo en que permanece inundado.

1.- Todos los años, durante meses.

2.- Cada años, durante meses.

CONTROL DE LAS GARRAPATAS

¿Usan acaricidas? Si No

Indique la forma de aplicación

1.- Inmersión. 2.- Aspersión fija. 3.- Aspersión manual. 4.- Derrame (pour-on).
5.- Inyectable. 6.- Otros:

Indique meses de aplicación utilizando los códigos de los acaricidas

Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic

Código acaricidas

Acción prolongada: 1.- Piretroides 2.- Endectocidas 3.- Fluazurón (Akatac)
Acción corta: 4.- Fosforados 5.- Amitraz 6.- Fipronil (Ectoline)
Mixtos: 7.- Piretroides + Fosforados 8.- Otro:.....

**OCURRENCIA DE BABESIOSIS Y/O ANAPLASMOSIS
DURANTE EL ÚLTIMO AÑO**

1.- Babesiosis

E F M A M J J A S O N D	Total		Edad (años)		
	Enfermos	Muertos	<2	1 - 2	>2

2.- Anaplasmosis

E F M A M J J A S O N D	Total		Edad (años)		
	Enfermos	Muertos	<2	1 - 2	>2

3.- Indeterminado

E F M A M J J A S O N D	Total		Edad (años)		
	Enfermos	Muertos	<2	1 - 2	>2

ORIGEN DE LOS ANIMALES AFECTADOS

1.- Nacidos en el establecimiento:

2.- Procedentes de otro establecimiento:

Lugar de procedencia: