

16.343

Reg 19646

3 cop

ANAPLASMOSIS Y BABESIOSIS BOVINA EN COLOMBIA

Editado por

Dr. Ewald Otte

Consultor Proyecto Colombo-Alemán ICA-GTZ

Proyecto para la "Introducción de un Sistema de Asistencia Técnica Integral Pecuaria", ICA/GTZ; hasta el 28/2/89 llamado: "Intensificación del Control de las Enfermedades Animales en Colombia". Santafé de Bogotá, 1992.

PREFACIO

Las enfermedades parasitarias han sido siempre objeto de mucha atención por parte de las autoridades veterinarias en Colombia, área a la cual se ha dedicado en el pasado una considerable cantidad de investigaciones de campo y de laboratorio. No obstante, las actividades del proyecto y en particular los resultados de la encuesta inicial realizada en Córdoba, evidenciaron la necesidad de complementar estas investigaciones, en especial con miras a suministrar una base sólida para medidas de control económicamente viables. A este respecto fueron de primordial interés el complejo de las garrapatas y las enfermedades transmitidas por las mismas (babesiosis y anaplasmosis), la tripanosomiasis causada por *T. vivax* y las infestaciones con helmintos. En consecuencia, el proyecto acordó cooperar con los científicos colombianos en algunas de las investigaciones complementarias identificadas como necesarias, proporcionando equipo y suministros de laboratorio, personal (consultores, Expertos Asociados de la FAO, doctorandos de las universidades de Alemania) y becas. Al igual, el proyecto se constituyó en el eslabón de conexión con el Instituto de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de Hannover, de donde provenía la mayoría de los doctorandos y en donde se efectuaron algunas de las investigaciones que requerían un ambiente altamente sofisticado. La mayor parte del trabajo, sin embargo, se llevó a cabo en el campo (Córdoba y Valle del Cauca) y se terminó en Hannover. Los supervisores fueron Prof. Dr. K. Friedhoff, Prof. Dr. A. Liebisch y Prof. Dr. M. Stoye.

Las siguientes publicaciones fueron el resultado de este programa cooperativo:

1. Zuerner, U. 1983. Seroepidemiologie der bovinen Babesien- und Anaplasmainfektionen in Kolumbien: I. Einleitende Untersuchungen mit dem indirekten Immunofluoreszenz-Test. Dissertation, Hannover.
2. Mueller, I. 1984. Seroepidemiologie der bovinen Babesien- und Anaplasmainfektionen in Kolumbien: II. Verbesserung der Antigenherstellung fuer Indirekte Immunofluoreszens mit *Babesia bovis*. Dissertation, Hannover.
3. Tropberger, G. 1989. Seroepidemiologie der bovinen Babesien- und Anaplasmainfektionen in Kolumbien. III. Verlaufsuntersuchungen an Jungtieren einiger selektierter Bestaende. Dissertation. Hannover.
4. Zips, S.G. 1989. Epidemiologische Untersuchung der *Babesia bovis* infektion in Córdoba, Kolumbien. Dissertation. Hannover.
5. Nowak, F. 1990. Epidemiologische Untersuchungen an Rinderbestaenden im mittleren Sinútal, Córdoba, Kolumbien. Dissertation. Hannover.
6. Zintz, R. 1990. Untersuchungen zur Epidemiologie der Haemoparasiten in milchproduzierenden Betrieben in Valle und Quindío, Kolumbien. Dissertation. Hannover.
7. Doherr, M.E.C. 1990. Enzymserologisches Verfahren (ELISA) unter Verwendung von Kulturantigen zum Nachweis von *Babesia bovis* Infektionen. Dissertation. Hannover.

8. Friedhoff, K.T., I. Mueller und E. Otte. 1990. Isolation and characterization of **Babesia bigemina** and **Babesia bovis** from Colombia. Hannover.
9. Duehnen, W. 1987. Untersuchungen zum Befall landwirtschaftlicher Nutztiere mit Zecken (Ixodidea: Ixodidae) und zur Zeckenbekaempfung im Departamento Córdoba, Kolumbien. Dissertation. Hannover.
10. Thullner, F. 1990. Untersuchungen zu Vorkommen, Epidemiologie und wirtschaftlicher Bedeutung von Helminthen bei Kaelbern im Departamento Córdoba, Kolumbien. Dissertation. Hannover.

Los resultados de las investigaciones detalladas en los números 9 (garrapatas) y 10 (helmintos) han sido publicadas por separado en Informes Técnicos (Nos. 7 y 10), mientras que la tripanosomiasis se trató en el Informe Técnico No. 8.

El presente Informe Técnico está basado en los trabajos detallados en los numerales 3, 4, 5, 6, 7 y 8. El informe hace referencia a las características de aislamientos de cepas colombianas de **B. bovis** y **B. bigemina** y a los resultados de investigaciones epidemiológicas realizadas en Córdoba y el Valle del Cauca, igual que a una tentativa de mejorar las técnicas serológicas de identificación de infecciones por **B. bovis** usando la prueba ELISA.

La revisión de literatura es la síntesis de los capítulos correspondientes de todos los autores interesados.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
I. Revisión de Literatura E. Otte	1
II. Investigaciones epidemiológicas de la infección por Babesia bovis en Córdoba (Colombia) ... S.G. Zips.	25
III. Seroepidemiología de las infecciones por babesia y anaplasma bovinos en Colombia. III. Estudios longitudinales en terneros en algunas fincas seleccionadas G. Tropberger	55
IV. Investigaciones epidemiológicas en fincas ganaderas en el Valle del Sinú medio (Córdoba, Colombia) F. Nowak	83
V. Investigaciones sobre la epidemiología de las hemoparasitosis en fincas productoras de leche en los departamentos del Valle y del Quindío (Colombia) R. Zintz	117
VI. Aislamiento y caracterización de cepas de Babesia bigemina y Babesia bovis procedentes de Colombia K.T. Friedhoff, I. Mueller y E. Otte	165
VII. Técnica del ensayo inmunoenzimático (ELISA) para demostrar infecciones por B. bovis basados en un antígeno de cultivo de B. bovis M.G.E. Doherr	187
VIII. Referencias	221

I. REVISION DE LITERATURA

Por

Dr. Ewald Otte

Extractado de las disertaciones y artículos de los autores contribuyentes.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
1. BABESIA Y ANAPLASMA: TAXONOMIA Y DISTRIBUCION	7
1.1 Babesia spp.	7
1.2 Anaplasma marginale	8
2. HEMOPARASITOS EN COLOMBIA	8
3. PATOGENESIS Y CURSO DE LAS INFECCIONES POR BABESIA	9
3.1 Ciclo de desarrollo de la babesia	9
3.2 Curso de la enfermedad y síntomas clínicos	10
3.3 Resistencia e inmunidad	11
3.4 Diagnóstico	12
3.4.1 Demostración directa de la infección con hemoparásitos	12
3.4.2 Demostración indirecta de la infección con hemoparásitos	13
3.5 Control	14
3.6 Vectores	15
3.6.1 Transmisión de Anaplasma	16
3.6.2 Transmisión de Babesia	16
3.6.3 Influencia climática en la población de garrapatas	17
3.6.4 Influencia topográfica en la población de garrapatas	17
3.6.5 Influencia estacional en la población de garrapatas	17
3.6.6 Influencia de las medidas de control en las poblaciones de garrapatas	18
3.7 Epidemiología de enfermedades hemoparasitarias	18
3.7.1 Estabilidad e inestabilidad endémica	18
3.7.2 Investigaciones epidemiológicas en Latinoamérica	20
3.7.3 Investigaciones epidemiológicas en Colombia	21
3.7.3.1 Anaplasmosis	21
3.7.3.2 Babesiosis	22

INDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1	
Quimioterapia más comúnmente utilizada para algunas enfermedades hemoparasitarias	14

1. **BABESIA Y ANAPLASMA: TAXONOMIA Y DISTRIBUCION**

1.1 **Babesia spp.**

Las babesiosis son enfermedades causadas por protozoarios intracelulares, transmitidas por garrapatas que ocurren en particular en bovinos de las regiones tropicales y subtropicales; ocasionan considerables pérdidas y en consecuencia, constituyen un factor económico importante (McCosker, 1981).

Los parásitos correspondientes han sido descritos inicialmente por Babes (1888) y pertenecen a la subclase Piroplasmia Levine y a la familia Babesidae Poche (Levine, 1971; Levine, 1981). Entre tanto, se han identificado más de 70 especies de ocurrencia en varios tipos de hospederos, pero sólomente las siguientes seis son parásitos de bovinos (Levine, 1971):

Babesia bovis (Babes, 1888; Starcovici, 1893)

Sinónimos: **Babesia argentina** (Ligniere, 1903)
Babesia berbera (Sergent et al., 1924)

Babesia bigemina (Smith and Kilburn, 1893)

Babesia divergens (M'Fadyean y Stockman, 1911)

Babesia major (Sergent et al., 1926)

Babesia ovata

Babesia beliceri (sinónimo: **Babesia occultans**) (citado en: Kuttler, 1988b)

Entre estas seis especies se confiere particular importancia a **B. bovis**, debido a la enfermedad relativamente severa que por lo general ocasiona. **B. bovis** ocurre en todos los continentes del globo terráqueo entre 32 grados al norte y 30 al sur y constituye una amenaza potencial al 70% de la población bovina en el mundo de 1.2 billones de animales (Kuttler, 1988b; Ristic y Montenegro-James, 1988).

Inicialmente se presentaron algunas dificultades en la clasificación de **B. bovis**, **B. argentina** y **B. berbera**. Mientras Sergent et al. (1945) describieron **B. berbera** como una especie separada con base en los resultados de estudios de inmunidad cruzada, Goldmann y Rosenberg (1974) llegaron a la conclusión que los miembros de este grupo representaban una sola especie, después de haber observado extensas reacciones cruzadas entre ellas en las pruebas serológicas de fluorescencia. Sin embargo, como los antisueros de **B. bovis** y **B. argentina** reaccionaron con el antígeno de **B. bigemina** en sus pruebas, mientras que el antisuero de **B. berbera** no, ellos sugirieron clasificar este parásito en un subgrupo y **B. bovis** y **B. argentina** en otro. Finalmente, sin embargo, la mayoría de los taxonomistas acordaron **B. bovis** como el nombre para la especie y **B. argentina** y **B. berbera** como designaciones de sinónimos (Anon. 1978), aunque aún en algunas ocasiones se utilizan los nombres antiguos en la literatura.

La babesia, dependiendo de la ocurrencia de sus garrapatas vectores, está ampliamente distribuida en los países tropicales y subtropicales. **B. bigemina** ha sido el agente causal de la Fiebre de Texas en los

Estados Unidos; fuera de esto es de particular importancia en los estados del occidente de Africa. En el resto de Africa, **B. bovis** es de mayor importancia que **B. bigemina**, al igual que en el caso de Australia, Asia y Latinoamérica. **B. divergens** sólo se presenta en Europa occidental, central y oriental, mientras que **B. major** está limitada a Europa y al norte de Africa. Esta última es menos patógena que las otras especies de Babesia.

1.2 **Anaplasma marginale**

El Manual de Bergey (8a. Ed.) cataloga al **Anaplasma marginale** como la especie-tipo del género **Anaplasma**, familia **Anaplasmataceae**, orden **Rickettsiales**. La segunda especie del género, **Anaplasma centrale**, causa una forma relativamente moderada de anaplasmosis bovina y ocurre en Africa (Ristic y Carson, 1977).

El **A. marginale** es endémico en las regiones tropicales y subtropicales del globo, pero también se presenta en zonas templadas, tales como el noroeste de los Estados Unidos (Ristic y Carson, 1977).

2. HEMOPARASITOS EN COLOMBIA

El clima es tropical en el 80% de la superficie de Colombia; subtropical en el 10% y el resto del país es templado o aún frío (cordilleras de montañas altas) (Vizcaino, 1979). Las regiones tropicales y subtropicales del país mantienen los más altos porcentajes de bovinos y la región de la costa norte es el área más importante de producción bovina (Anon., 1974b). Allí, la temperatura promedio para el año fluctúa aproximadamente en 27 grados C (26.6-27.4) (Anon., 1984).

Los hemoparásitos están ampliamente diseminados en las áreas tropicales y subtropicales, en particular si sus climas son también húmedos, lo cual ofrece las condiciones ideales para el desarrollo de variadas especies de hemoparásitos y sus vectores (Desowitz y Fairbairn, 1955; Ouhelly y Schein, 1988).

Se ha demostrado la ocurrencia de nueve especies de hemoparásitos en cinco géneros diferentes de animales de vida salvaje en los Llanos Orientales de Colombia (Ayala et al., 1973).

Las infecciones por babesia han sido reconocidas en Colombia por varios autores como las causas de enfermedades ampliamente diseminadas (Todorovic, 1976). Luego, Todorovic (1976), González y Todorovic (1977), Corrier y Guzmán (1977), Corrier, et al. (1978) y Vizcaino (1979), estudiaron y describieron los problemas de las infecciones por babesia y anaplasma en Colombia.

En Córdoba, la encuesta realizada por el presente proyecto en 1982-1984 demostró la ocurrencia en esta región de los siguientes hemoparásitos: **A. marginale**, **B. bigemina**, **B. bovis**, **Tripanosoma vivax** y **Tripanosoma theileri**.

Además, Otte (1986) encontró evidencia morfológica en un extendido, de una vaca procedente de Córdoba, de la presencia de **Eperythrozoon wenyoni** en la región. La amplia diseminación de la ocurrencia de **T. theileri** y **T. vivax** han sido reportadas por Wells (1969), Betancourt (1978), Kuttler et al. (1969) y Otte (1989).

Se estimó que las pérdidas generales ocasionadas por garrapatas, babesia y anaplasma habían ascendido a 1.3 millones de dólares en 1979, mientras que el ingreso anual per capita en Colombia era de US\$1.410. Una proporción relativamente alta de esta pérdida (31%, equivalente a US\$0.4 millones) se contrajo en las áreas relativamente reducidas de producción bovina de los valles del Magdalena y del Cauca y en las partes bajas de la planicie de los Andes (Peña et al., 1980).

Según Nowak (1990), en Córdoba, el 16% de la mortalidad de los terneros es causada por hemoparásitos. La importancia de ésta pérdida aumenta si se considera la reducción en las ventas de leche debido a que las vacas que pierden su ternero no completan su lactancia (Otte, 1989). Además, se encontró que las ganancias en peso de terneros con más del 25% de genes *Bos taurus* que habían presentado seroconversión a *B. bovis* eran significativamente más bajas que la de aquellos que no habían tenido seroconversión (Otte et al., 1985).

Por otra parte, se encontró que la infestación con garrapatas por sí misma no causaba pérdidas significativas, expresados por ejemplo por las reducidas ganancias de peso y por los costos de los acaricidas. Otte (1989) calculó que éstas eran inferiores al 2% de la producción.

Una finca lechera en el Valle del Cauca calculó sus pérdidas debidas a hemoparasitismo (mortalidad, costos de las drogas, aumento en la mano de obra), durante el período de 1970 a 1975, entre US\$1.030 y US\$3.210 por año, es decir, US\$5-13 por cabeza/año (Anon., 1975). En otra finca en la misma región, el hemoparasitismo en promedio causó tasas de mortalidad del 4% en bovinos menores de 24 meses y del 3% en animales de mayor edad. La producción promedio de leche de las vacas que habían contraído la enfermedad fue de 2.900 lt. de leche por lactancia y tuvieron un período seco de 92 días, mientras que aquellas que habían permanecido sanas presentaron una producción promedio de lactancia de 3.100 lt y estuvieron secas por sólo 67 días. Las diferencias fueron estadísticamente significativas (González et al., 1978a).

Se pueden esperar pérdidas más elevadas en áreas marginales para garrapatas, con un estado de inestabilidad endémica reinante, o donde la reproducción y cría de terneros se lleva a cabo en fincas distantes del área infestada con garrapatas y la producción dentro de ésta, como es el caso en ciertas regiones de Colombia.

3. PATOGENESIS Y CURSO DE LAS INFECCIONES POR BABESIA

3.1 Ciclo de desarrollo de la babesia

Los esporozoitos de la babesia, una vez introducidos en el huésped vertebrado, invaden los eritrocitos y se desarrollan vía los trofozoitos y merontes a su estadio final, los merozoitos. Estos son ingeridos por la garrapata vector y se transforman en gametos vía gamontes. Según Drolesky et al. (1984), Weber y Friedhoff (1977), Rudzinska et al. (1979) y Mehihorn et al. (1980), existe evidencia de un primer estadio de reproducción sexual, inmediatamente después de la ingestión de la sangre del huésped, en las células epiteliales de los intestinos de la garrapata en las especies *B. bigemina*, *B. microti* y *B. canis*. En el caso de *B. bovis* no hay tal evidencia.

Los gametos se acumulan formando células esféricas, los cigotos, los cuales invaden selectivamente las

células epiteliales basofílicas de los intestinos de las garrapatas donde se dividen eventualmente en esporoquinetos en forma de palo. Estas están sometidas a fisión múltiple en los varios órganos internos de la garrapata, incluyendo los ovarios y también invaden los óvulos asegurando así la infección de las larvas de la siguiente generación de garrapatas. Luego, en el caso de *B. bigemina* hay una transmisión vertical de las larvas a las ninfas, lo cual no sucede con *B. bovis*; las ninfas de *B. bovis* están libres de babesia y, por lo tanto, no transmiten la enfermedad.

En forma variada, según las especies de babesia y de garrapatas, los esporozoitos se transmiten de las glándulas salivares de larvas, ninfas o adultos infectados al huésped vertebrado e invaden sus glóbulos rojos.

Usualmente se encuentra *B. bovis* en el centro de las células y, dado su tamaño de 2.4 x 1.5 micrones, se cuenta entre las babesias pequeñas (Mahoney, 1977).

La ocurrencia de *B. bovis* está limitada a los bovinos. Son escasos los reportes de infecciones en otros hospederos (búfalos por ejemplo) (Muraleedharan et al., 1984). Hasta ahora no se han identificado huéspedes reservorios importantes (Friedhoff y Smith, 1981).

3.2 Curso de la enfermedad y síntomas clínicos

Muchos de los autores concuerdan en que la mayoría de las enfermedades hemoparasitarias no causan frecuentemente manifestaciones clínicas severas en áreas endémicas.

La enfermedad causada por *B. bovis* en bovinos está caracterizada por fiebre, apatía, anorexia y anemia, a menudo acompañada por síntomas de shock. Estos últimos no se deben esencialmente a la destrucción de los eritrocitos por los parásitos sino más bien a causas secundarias, tales como por ejemplo, la activación de la calicreina (Wright y Mahoney, 1974; Wright, 1975; Mahoney, 1977; Wright y Goodger, 1988).

Una característica especial de la infección por *B. bovis* es la preferencia de la babesia por los capilares de órganos internos más que por la sangre periférica, en particular el cerebro. En éste último caso, puede ocurrir acumulación intravascular de eritrocitos con perturbaciones severas del sistema nervioso central y muerte, aunque en esta fase no existe aún parasitemia significativa en la sangre periférica de muchos de los animales (Mahoney, 1977). Este fenómeno es causado por citoadherencia de eritrocitos parasitados, lo cual a su turno se debe a la formación de protrusiones en sus membranas (Aikawa et al., 1985; Wright y Goodger, 1988). Las cepas virulentas de *B. bovis* producen la formación de una cantidad más elevada de estas protrusiones de lo que harían cepas menos o no virulentas (Igarashi et al., 1988).

Además de las manifestaciones severas y agudas de la enfermedad, también pueden presentarse infecciones subagudas o aún subclínicas. Esta última forma es llamada babesiasis (Mahoney, 1977).

Como el bazo desempeña un papel de particular importancia en la eliminación de los parásitos de la sangre (Garnham, 1970; Schnitzer et al., 1972), es posible producir en ciertos animales manifestaciones agudas de babesiosis esplenectomizando animales con babesiasis.

3.3 Resistencia e Inmunidad

El curso y el grado de severidad de la babesiosis depende de la virulencia del agente infectante, la cual puede variar considerablemente de una cepa a otra y la dosis de infección (Mahoney et al., 1979), pero también de la edad y del grado de susceptibilidad de los hospederos. Usualmente no se presentan casos de babesiosis aguda en áreas endémicas con poblaciones estables de garrapatas (Joyner y Donnelly, 1979) ya que los terneros están protegidos inicialmente por anticuerpos maternos (Hall, 1960, 1963), que luego son reemplazados gradualmente por inmunidad adquirida. Ross y Loehr (1970) encontraron que los anticuerpos calostrales de *B. bigemina*, demostrados por la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT), persistieron durante 110 días, pero Berry et al. (1981) observaron que los anticuerpos maternos para *B. bovis* se reducían al mínimo ya en el transcurso de 38 días, cuando los títulos empezaron a subir nuevamente. Esto, asumen ellos, se debe a las infecciones naturales adquiridas en ese lapso de tiempo.

Repetidamente se ha expresado que los terneros, independientemente de si han recibido calostro o no, son menos susceptibles que los bovinos de mayor edad, o completamente refractarios a las infecciones por babesia hasta la edad de 7 a 9 meses (Callow y Dalglish, 1982). Trueman y Blight (1978) llamaron este fenómeno "resistencia natural", mientras que Callow y Dalglish (1982) usaron el término "inmunidad inespecífica". Este fenómeno es considerado un factor epidemiológico importante. Según Levy et al. (1982) se debe a dos elementos diferentes: un factor eritrocítico (basado posiblemente en la estructura de la hemoglobina fetal) que dura solamente un corto período, y un factor sérico de más larga duración. Este proporciona suficiente protección como para evitar una enfermedad severa más no una infección que luego induce inmunidad activa (Joyner y Donnelly, 1979). La situación parece ser similar en el caso de *A. marginale*, en la cual las infecciones también permanecen moderadas hasta la edad de un año (Ristic, 1981).

La inmunidad siguiendo a una infección con *B. bovis*, frente a la reinfección con cepas homólogas dura por lo menos cuatro años. Los bovinos infectados pueden permanecer portadores del parásito durante años, a pesar de ser sólidamente inmunes; las parasitemias que ocurren en ocasiones durante este período, las cuales pueden tener conexión con recidivas de enfermedad aguda (Curnow, 1973; Young, 1988), se deben probablemente a diferencias en la estructura del antígeno del nuevo parásito que está invadiendo.

Ross y Mahoney (1974) han desarrollado un modelo computarizado basado en las tasas de parasitemia de *B. bovis* observadas en un hato *Bos taurus*. Ellos utilizaron este modelo para el cálculo de la capacidad potencial de la población de *B. bovis* correspondiente para la formación de variantes del antígeno. El resultado fue: más de 100.

En consecuencia, no es sorprendente que se haya identificado la existencia de un número considerable de cepas diferentes de *B. bovis* en Centro y Suramérica. La inmunidad contra una de estas cepas, cuya ocurrencia se encontró en Argentina, Ecuador, México, Colombia y Venezuela, no necesariamente protege contra otras cepas de cualquiera de estos países (Montenegro-James y Ristic, 1985), aunque existía una inmunidad cruzada sólida entre algunas de ellas. Esto indica que hay antígenos protectores comunes para algunas de las cepas más no para todas (James, 1988). Después de la infección con varias de estas cepas, se observaron títulos IFAT altos sin haber un efecto protector frente a la infección con cepas heterólogas (Montenegro-James y Ristic, 1985).

El hecho observado con frecuencia de ser las razas *Bos indicus* en general menos susceptibles a las infecciones con babesia (Daly y Hall, 1955; Utech y Wharton, 1982), según Miller et al. (1984) y O'Kelly y

Spiers (1978), se debe en parte a un nivel más alto de resistencia a las garrapatas en estos animales. En realidad se ha advertido que las tasas de infestación con garrapatas aumentan exponencialmente a medida que decrecen los niveles de los genes *Bos indicus* en los hatos (Bourne et al., 1988). Además, cuando se compararon las tasas de infestación de animales *Bos indicus* puro y *Bos indicus* x *Bos taurus* (5/8 Aberdeen Angus x 3/8 Nelore; o Nelore x Fleckvieh; o Nelore x Chianina; o Nelore x Charolais), los Nelore puros tenían una tasa promedio de infestación de 3.3 hembras ingurgitadas/día y los cruzados de 21 a 60 (Gómez et al., 1989). Mahoney et al. (1981) observaron que los cruces de Cebú y razas Europeas no necesitaban control de garrapatas, aunque en su investigación la tasa de inoculación decayó por debajo de 0.005.

Aprovechando los hechos arriba mencionados, se han establecido nuevas razas lecheras con grados relativamente altos de resistencia a las garrapatas, tales como Cebú lechero Australiano (toros Sahiwal x vacas Jersey) y Frisosahiwal Australiano (toros Sahiwal x vacas Holstein) mediante una selección adecuada (Benavides, 1988). Existen individuos también en razas Europeas - aunque se encuentran con mucho menos frecuencia que en las razas Cebú - con niveles relativamente elevados de resistencia a las garrapatas, factor que debería ser tenido en cuenta en los programas de mejoramiento genético en los trópicos. Por otra parte, el nivel de resistencia a las garrapatas en los individuos Cebú no es uniforme; siempre existen algunos que portan unas pocas o ninguna y un bajo porcentaje de otros que en realidad sostienen la mayoría de la carga total de garrapatas del hato. La eliminación selectiva de estos individuos puede reducir en una forma drástica la infestación total de garrapatas del hato y de las praderas (Anon. 1984a; Benavides, 1988).

Además, en infecciones experimentales se encontró que también existía un nivel verdaderamente más alto de resistencia natural a las infecciones con babesia (Johnston, 1967; Rogers, 1971b) en las razas *Bos indicus* comparado con el de animales *Bos taurus*.

3.4 Diagnóstico

Los hemoparásitos se pueden demostrar directamente en extendidos colorados o en preparaciones de gota gruesa (Mahoney y Saal, 1961; Bishop y Adams, 1973) y en extendidos de material cerebral (Hadani et al., 1983). La ocurrencia de las infecciones hemoparasitarias también se pueden demostrar por métodos indirectos (serología) indispensables en estudios epidemiológicos, en los cuales se involucran grandes cantidades de animales.

3.4.1 Demostración directa de la infección con hemoparásitos

La base de las investigaciones hemoparasitarias es la demostración directa de parásitos en la sangre a través de extendidos coloreados con Giemsa (Anon. 1984). Este método permite la diferenciación morfológica de varias especies de parásitos, el cálculo de las tasas de parasitemia y las evaluaciones de las alteraciones en el cuadro hemático. Para garantizar la captación de densidades de parasitemia aún bajas, es conveniente utilizar para estos exámenes sangre capilar más que yugular, en particular cuando el parásito de interés es *B. bovis*.

La sensibilidad del método directo para la demostración de hemoparásitos mejora utilizando el método de gota gruesa (Mahoney y Saal, 1961; Bishop y Adams, 1973), aunque los parásitos sufren algunas alteraciones morfológicas durante el proceso. La sensibilidad de esta técnica aún se puede incrementar

coloreando la gota gruesa con Naranja-Acrídina y realizando luego el examen en microscopio de fluorescencia (Winter, 1967; Trees, 1974). Gasse-Dumrath (1986), encontró una tasa de parasitemia de 65.2% en animales serológicamente positivos a *B. divergens* mediante éste método, 13.6% más que con la preparación de gota gruesa coloreada con Giemsa.

Tropberger (1987), observó sólo 10.6% menos extendidos positivos microscópicamente mediante la técnica de extendido colorado con tinción Giemsa, de los que resultaron positivos a la prueba serológica para *B. bigemina*. En el caso de *B. bovis*, sin embargo, la diferencia fue de 45%, lo cual no es sorprendente conociendo la tendencia que tiene este organismo de concentrarse en el sistema capilar de órganos internos (Mahoney y Saad, 1961; Rogers, 1971a). Por otra parte, este efecto puede ser utilizado en diagnóstico. Hadani, et al. (1982) por ejemplo demostraron por este método, *B. bovis* en frotis de cerebro de 28 de 39 bovinos sacrificados en Argentina, mientras sólo 16 de estos animales habían reaccionado en una forma claramente positiva a la prueba IFAT. En una investigación posterior (Hadani, et al., 1983), 50.7% de los animales investigados reaccionaron positivamente a la prueba IFAT, mientras que en el 42% se encontró *B. bovis* en capilares del cerebro.

Para la demostración directa de *B. bovis* vía sondas-DNA se requieren tasas de parasitemia de por lo menos 0.1%. El método implica una gran inversión de tiempo y trabajo intensivo, a la vez el nivel de sensibilidad es insuficiente (McLaughlin et al., 1986; Reiter y Welland (1989).

La infección crónica con *B. bovis* se puede demostrar directamente por esplenectomía o transfusión de sangre. La parasitemia en animales infectados crónicamente aumenta después de la extirpación del bazo y se hace evidente en el extendido fresco (Donnelly, 1984). Las transfusiones de sangre de donantes infectados, ocasionan enfermedad en los receptores, como por ejemplo Gerbils (Ullmann, 1983) o bovinos esplenectomizados (Donnelly, 1984).

3.4.2 Demostración indirecta de la infección con hemoparásitos

Las pruebas serológicas son indispensables en las investigaciones epidemiológicas. Las más importantes son fijación del complemento (FC), varias pruebas de aglutinación, la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT) (actualmente es el método estándar), el Radioinmuno Ensayo (RIA descrito por Kahl et al., 1982) y recientemente la prueba de enzimas ligadas a los anticuerpos (ELISA). Revisiones detalladas de estas técnicas fueron proporcionadas por Zuerner (1983), Mueller (1984), Welland y Reiter (1988), Reiter y Welland (1989) y Doherr (1990) (ver también la parte II de este Informe Técnico).

Al emplear las técnicas descritas anteriormente para la demostración indirecta de babesia y anaplasma, se debe tener en cuenta que se pueden presentar reacciones cruzadas (Todorovic y Carson, 1981) y que puede ser difícil la interpretación de sueros con títulos bajos (Reiter y Welland, 1989).

Las pruebas utilizadas con más frecuencia son FC e IFAT, algunas pruebas de aglutinación (a saber, la aglutinación en tarjeta (PAT)) y ELISA (Blewett y Adam, 1978a).

La ventaja de la IFAT, comparando IFAT y la PAT, reside en el hecho que también se pueden demostrar infecciones latentes. Además, IFAT es más rápida y simple de realizar, fuera de ser más económica que la FC (Kuttler et al., 1977; Todorovic y Long, 1976). Se ha encontrado que la sensibilidad de la FC es baja en el caso de babesiosis bovina; por lo tanto, se recomienda el uso de IFAT (Anon., 1984b). Sin embargo, una desventaja sería de ésta última radica en que su estandarización es en extremo difícil (Todorovic y

Long, 1976; Blewett y Adam, 1978a).

Las pruebas de ELISA desarrolladas hasta ahora no han sido ampliamente aceptadas en la práctica por razones de especificidad insuficiente (Reiter y Welland, 1989). Las pruebas de ELISA desarrolladas más recientemente parecen haber superado este obstáculo (Doherr, 1990).

Las pruebas de aglutinación presentan métodos más simples particularmente aptos para utilizarlos en la práctica. Sus ventajas radican en la simplicidad y rapidez de su ejecución y en la economía en costos (Welland y Reiter, 1988); sus desventajas son reacciones inespecíficas y un bajo grado de sensibilidad (Reiter y Welland, 1989).

3.5 Control

Existen posibilidades de tratamiento quimioterapéutico (Tabla 1) de animales infectados por hemoparásitos. Kuttler (1988a) ofrece un recuento extenso de drogas disponibles y su dosis para este fin. En casos severos, la quimioterapia tiene que acompañarse de transfusiones de sangre u otros medios de sustitución de los fluidos y electrolitos corporales. La quimioterapia masiva en las primeras fases de la infección puede prevenir el establecimiento de inmunidad (Kuttler, 1988a). El control por este medio es factible sólo en hatos pequeños bajo estrecha observación (Ristic y Montenegro-James, 1988).

TABLA 1 QUIMIOTERAPIA MAS COMUNMENTE UTILIZADA PARA ALGUNAS ENFERMEDADES HEMOPARASITARIAS (Kuttler, 1980)

Droga	Dosis (mg/kg peso corporal)		
	Anaplasmosis	Babesiosis	Trypanosomiasis
Tetraciclina	11.0	?*	-
Imidocarb	5.0	1-3	-
Diminacen aceturato (Berenil)	-	3-5	3-5

* La eficacia de la Oxitetraciclina contra Babesia no es completamente clara (Pipano et al., 1985, 1987, 1988; Kuttler, 1980)

Se han sugerido varios métodos para el control inmunoproláctico. Sin embargo, el desarrollo de una vacuna para una inmunización activa contra *B. bovis* presenta problemas debido a que el antígeno está sujeto a variación antigénica (Curnow, 1973) y dadas las variadas respuestas inmunes a las cepas heterólogas (Montenegro-James y Ristic, 1985).

El método de premunición con cepas virulentas de babesia bajo control quimioterapéutico es muy exigente

pero se puede aplicar en casos de introducción de animales susceptibles en áreas infectadas. En el caso de anaplasmosis, no ha tenido éxito este método (Todorovic y Téllez, 1975).

Las posibilidades de producir inmunidad estéril se ofrecen en la forma de vacunas muertas de antígeno derivado de cultivo (Montenegro-James y Ristic, 1985). Sin embargo, éstas no proporcionan una inmunidad duradera a menos que se garantice la ocurrencia de infección natural poco tiempo después de la vacunación (Todorovic et al., 1973).

La aplicación de vacunas vivas ofrece una protección perdurable. En este caso, el agente infectivo es atenuado por varios pases en terneros esplenectomizados (Callow y Mellors, 1966; Todorovic y González, 1975; González et al., 1979; Todorovic et al., 1979). Las cepas de campo de baja virulencia también pueden ser empleadas como vacunas vivas, como lo demostraron Zaraza y Parra (1977) en el caso de infecciones con *A. marginale*. La dosis mínima infectiva en este caso fue 10^5 parásitos (Vizcalno y Betancourt, 1983).

Desde 1897 se ha empleado la inmunización activa contra *B. bovis*, utilizando inóculos que variaban desde vacunas con base en parásitos vivos sin atenuar (sangre de animales infectados) hasta los extractos de las proteínas del parásito, los cuales proporcionaron protección a la enfermedad aguda en la mayoría de los casos de infección con cepas homólogas y heterólogas (Ristic y Montenegro-James, 1988; Timms, 1989). Hasta ahora han fracasado los intentos de vacunas con DNA recombinante (Timms y Barry, 1988).

Hay concordancia en la literatura sobre la necesidad de vacunación en las partes marginales de regiones endémicas, o en los casos de introducción de animales susceptibles en estas regiones (Mahoney, 1977; Corrier et al., 1978; Todorovic et al., 1979). En cuanto a las mismas regiones endémicas, las opiniones están divididas. Algunos autores recomiendan la vacunación para *B. bovis* y *A. marginale* incluso dentro de estas regiones (Todorovic, 1976; Ristic and Carson, 1977), pero otros la consideran de valor cuestionable (Corrier, 1977; Corrier et al., 1978) o "evitable" (Mahoney, 1972).

Recientemente, investigadores argentinos (Guglielmo, 1990) han tenido éxito en el desarrollo de una vacuna triple, viva, congelada contra babesiosis y anaplasmosis, basada en cepas atenuadas de *B. bigemina*, *B. bovis* y en *A. centrale*. La concentración de organismos en la fracción de *B. bigemina* es 2.5×10^7 , en la de *B. bovis* es 10^8 y en la de anaplasma 5×10^7 . La vacuna tiene que utilizarse en el transcurso de 30 minutos después de su descongelación y por lo tanto, es un prerequisite la existencia de una cadena de frío, cuyo funcionamiento sea fiable, desde el laboratorio productor de la vacuna hasta el usuario final en la finca. El autor también hace énfasis en que, aunque los organismos que componen la vacuna son atenuados o de una patogenicidad natural baja, ocasionarán reacciones moderadas (un ligero incremento en la temperatura coincidiendo con el pico de parasitemias modestas en el caso de babesias y un ligero descenso del volumen globular), las cuales sin embargo, pasarán rápidamente. La vacuna no tiene efectos adversos en las ganancias de peso en los novillos; no se pretende que sea de uso general sino sólo en áreas y situaciones de inestabilidad endémica.

3.6 Vectores

La distribución de hemoparásitos está limitada a la ocurrencia de sus vectores. Algunos de los géneros de los artrópodos detallados por Dunn (1929) como parásitos del hombre, Page (1972) demostró que eran parásitos también de los bovinos en Turipaná, Córdoba. Además de los tabánidos (*T. nebulosus*, *T. claripennis*, *T. pungens*, *Lepiselaga crassipes*), Culicidae e Ixodidae, él encontró *Haematobia* (*Siphona*;

Lyperosia) spp. y Stomoxys calcitrans en ganado vacuno de Córdoba.

Las encuestas sobre garrapatas realizadas en Colombia (Abeche, 1984; Betancourt et al., 1984a; Duehnen, 1987) han resultado todas en la identificación de *Boophilus microplus* como la especie dominante (más del 90% de la población de garrapatas). De acuerdo con Otte (1989), y según lo determinado durante el estudio seccional-cruzado llevado a cabo en 1982/83, las tasas de infestación en Córdoba medidas como el número de garrapatas estándar (hembras ingurgitadas de *B. microplus* de más de 4.5 mm de longitud) fueron: 0 garrapatas en 44.1% , entre 1 y 10 en 36.7%, entre 11 y 50 en 12.7% y más de 50 en 6.5% de los animales incluidos en la encuesta. Las cargas de garrapatas de más de 50 fueron significativamente más comunes durante la época de verano.

Las simulaciones en Córdoba con el modelo CLIMEX desarrollado por Sutherst y Maywald (1985) confirmaron que las condiciones ambientales son muy favorables para el desarrollo de *B. microplus*; se pueden desarrollar hasta 7 generaciones por año (Betancourt et al., 1984c). Aunque al finalizar el verano las condiciones fueron las menos propicias para las garrapatas, fue durante este período cuando se observaron las más altas infestaciones con garrapatas si no se realizaba adecuadamente el control (Betancourt et al., 1984c; Duehnen, 1987), lo cual según Otte (1989), sugiere que los factores relacionados con el huésped pueden tener una influencia en las dinámicas de la población de garrapatas.

Otte (1989) también cree que el alto nivel de genes de Cebú en los bovinos (básicamente *Bos taurus*) en Córdoba, es la razón fundamental de los niveles generalmente bajos encontrados en la infestación con garrapatas, lo cual está demostrado por la relación exponencial que él halló entre la cantidad de sangre exótica de *Bos taurus* en hatos mejorados genéticamente y la cantidad de acaricida utilizada por animal y por año (más de 40 lt en hatos con 25% o más de genes exóticos versus menos de 20 lt en los hatos restantes).

3.6.1 Transmisión de anaplasma

Se ha comprobado que el anaplasma es transmitido a través de por lo menos 20 especies diferentes de garrapatas (Ristic, 1968; Gothe, 1974), entre las cuales *B. microplus* es la más importante. Además, el organismo puede ser transmitido por una variedad de dípteros hematófagos, tales como varias especies de tabánidos (Wilson y Meyer, 1966), *Stomoxys calcitrans*, *Haematobia (Siphona) spp.* (Dikmans, 1950), Simuliidae y Culicidae (Ristic, 1960).

Se ha demostrado repetidamente que los tabánidos transmiten anaplasma (Dikmans, 1950; Ristic, 1960). Pueden transmitir hasta por lo menos dos horas después de la interrupción de una comida de sangre. Para infectar un animal esplenectomizado son suficientes diez especímenes que se hayan alimentado en un bovino con anaplasmosis aguda (Hawkins et al., 1982).

Además, son de importancia las infecciones latrógenas. Se han observado elevaciones en las incidencias de anaplasmosis después de las campañas de vacunación (Corrier, 1977) y se ha comprobado que anaplasma se puede transmitir a través de agujas sin esterilizar que han sido usadas en varios animales (Wiesenhuetter, 1975). No se conoce el agente transmisor de *E. wenyoni*.

3.6.2 Transmisión de babesia

La mayoría de los autores concuerdan en que las babesias son transmitidas biológicamente y sólo por

garrapatas del género *Boophilus*, en particular por las especies *B. microplus* y *B. annulatus*; se sospecha que *B. gelgyl* y *Rhipicephalus bursa* también las transmiten. En el caso de *B. microplus* y aún probablemente de *B. annulatus*, *B. bovis* es transmitida sólo hasta el quinto día de infestación y exclusivamente por las larvas de la garrapata; *B. bigemina* únicamente por las ninfas y los adultos (Friedhoff, 1988).

No hay una evidencia concluyente de la transmisión mecánica de babesia por artrópodos hematófagos o garrapatas; las infecciones iatrógenas o prenatales no son de significancia epidemiológica (Friedhoff, 1988).

La mayoría de las manifestaciones clínicas y de los brotes son causados por *B. bovis* (Mahoney, 1974; Callow, 1976, 1979; Friedhoff y Smith, 1981), ya que la *B. bigemina* es bastante menos patógena y se transmite en una forma más efectiva, lo cual asegura la estabilidad endémica en la mayoría de los casos (Callow, 1979; Friedhoff 1988).

3.6.3 Influencia climática en la población de garrapatas

El clima en las tierras bajas tropicales de Colombia es caliente y húmedo. Existe isotermita durante todo el año a una temperatura diaria promedio de 27 °C y una humedad promedio de 70-85%. La luz día, un factor que también influye en el desarrollo de las garrapatas (Friedhoff y Smith, 1981), varía muy poco en todas las estaciones. El mínimo es 11.5 h/día y el máximo 12.5 h/día (Duehnen, 1987). Estas condiciones permiten actividades de las garrapatas prácticamente durante todo el año, incluyendo aún la corta época de verano (tres meses), en los microhabitats que permanecen húmedos y por lo tanto, el desarrollo de por lo menos cinco generaciones por año (Evans, 1978; Duehnen, 1987).

3.6.4 Influencia topográfica en la población de garrapatas

La planicie de la costa en el norte de Colombia varía en altitud sobre el nivel del mar sólo por unas pocas centenas de metros (Corrier y Guzmán, 1977). Las garrapatas de los géneros *Boophilus* son endémicas en Colombia hasta la altitud de 2.000 m. Las áreas de más de 2.500 m. son libres de *B. microplus* (Evans, 1978).

3.6.5 Influencia estacional en la población de garrapatas

Las estaciones en la costa norte de Colombia están caracterizadas por variaciones en la cantidad de precipitación, a saber:

Enero - Marzo	época seca ("verano")
Abril - Mayo	transición a época de lluvias
Junio - Octubre	época de lluvias ("invierno")
Novbre.-Diciembre	transición a época seca (Duehnen, 1987)

Según Duehnen (1987), la carga de garrapatas en el ganado vacuno de Córdoba aumenta durante la época de verano y alcanza su más alto nivel al final de abril/principios de mayo. Tropberger (1987) observó tres

picos en la carga de garrapatas durante 1985: una en mayo, otra en octubre y otra en febrero. Estos resultados se obtuvieron en fincas donde las medidas de control de las garrapatas (acaricidas) se aplicaban a intervalos irregulares.

3.6.6 Influencia de las medidas de control en las poblaciones de garrapatas

Las áreas en las cuales existe estabilidad endémica para babesiosis se pueden volver inestables por el uso de acaricidas (Ristic y Levy, 1987), con la posibilidad de que ocurran brotes cuando se dejan aumentar nuevamente las poblaciones de garrapatas después de un período de control intensivo (Norval et al., 1983). El desarrollo de cepas de garrapatas resistentes a los acaricidas puede producir el mismo efecto (Wharton y Roulston, 1975). La introducción de larvas infecciosas de áreas endémicas vecinas, por animales con parasitemia constituye una amenaza constante bajo estas circunstancias (Curnow, 1973).

3.7 Epidemiología de enfermedades hemoparasitarias

La epidemiología, originalmente concerniente sólo a las enfermedades contagiosas, hoy en día se ocupa de la ocurrencia y distribución de enfermedades contagiosas o no y sus determinantes físicos y químicos (Anon., 1986). Su meta es evaluar la morbilidad y mortalidad debida a varios factores patógeno-biológicos u otros, y ésto, en lo que se refiere a la medicina veterinaria, dentro del contexto económico del proceso de producción.

Uno de los medios diagnósticos de mayor importancia que puede acercarse a estas metas es la serología la cual, según Mahoney y Ross (1972) y Mahoney (1974) deberá ser simple pero exacta, aunque en realidad prácticamente todos los métodos serológicos tienen algunas fallas. Más aún, la fiabilidad de sus resultados está perjudicada por la existencia de inmunidad pasiva en terneros; por el hecho que existen reacciones cruzadas entre las especies de parásitos y que las inflamaciones agudas debidas a causas ajenas pueden provocar reacciones positivas falsas (Cox, 1986).

3.7.1 Estabilidad e inestabilidad endémica

La estabilidad endémica usualmente impera en las regiones donde la gran mayoría de los bovinos han tenido la oportunidad de una inmunización activa precoz durante sus primeros nueve meses de vida (resistencia de la juventud) hasta cierto punto interferida por inmunidad pasiva; por eso el número de garrapatas infectadas debe ser correspondientemente alto y su presencia constante durante todo el año.

En regiones estables endémicamente, aunque los casos agudos de babesiosis y anaplasmosis pueden ser ocasionales, la prevalencia de parasitemias patentes es alta, ya que pueden persistir durante períodos considerables después de la infección, constituyéndose así en la fuente más importante de infección para las garrapatas (Joyner y Donnelly, 1979).

Las garrapatas se infectan con babesia durante las últimas 24 horas antes de la repleción. Si el huésped se encuentra en la fase inicial de (aún baja) parasitemia para este tiempo, se presentarán tasas altas de infección con garrapatas (Friedhoff y Smith, 1981). El efecto será contrario si las garrapatas se alimentan en los huéspedes con tasas altas de parasitemia, dado que las babesias son patógenas para las garrapatas y muchas de estas últimas morirán. El grado de intensidad del efecto patógeno de la babesia en las garrapatas también depende del grado de su susceptibilidad a las diferentes cepas de babesia (Friedhoff,

1988). Smith (1984) estima que el grado de parasitemia más favorable para la infección con garrapatas y la propagación de la babesiosis sería de 0.1%.

También existe una influencia de la temperatura en el desarrollo de la babesia en la garrapata. La infección transovárica no se efectuará en temperaturas ambientales inferiores a 20 °C. en el caso de *B. microplus*; y el desarrollo a esporozoitos sólo puede llevarse a cabo en garrapatas activadas por la temperatura corporal del huésped (Smith, 1984; Friedhoff, 1988).

La prevalencia de parasitemias en las poblaciones bovinas en regiones endémicas es más alta a la edad de 6 a 24 meses. Después de ésta cuando, con un alto grado de probabilidad, los animales han sido expuestos a un gran número de variantes del antígeno, el estado inmune correspondiente impide el desarrollo de parasitemias patentes (Mahoney y Ross, 1972). La inmunidad se desarrolla antes y a un grado más alto para *B. bigemina* que para *B. bovis* (Mahoney, 1962).

La probabilidad diaria de infección con babesia (transmisión a través de garrapatas infectadas) en una población o un grupo de edad determinado se expresa mediante la "tasa de inoculación" (Mahoney, 1974). Esta se puede establecer con base en las tasas de parasitemia en una población, en la tasa de infección (prevalencia) en diversos grupos etarios, o en la tasa de infección de garrapatas (larvas) con babesia (Benavides, 1985). El estimativo de mayor confiabilidad surge de la tasa de infección establecida serológicamente en grupos de bovinos y principalmente aquellos de 9 meses de edad, (Mahoney, 1974; Friedhoff y Smith, 1981), según la siguiente fórmula:

$$I = 1 - e^{-ht}$$

y

$$h = \frac{\ln(1 - I)}{t}$$

t

donde *I* es el porcentaje de bovinos infectados

h es la tasa de inoculación

t es la edad de los terneros en días, corregida por el tiempo requerido para producir anticuerpos

e es la base del logaritmo natural

ln es el logaritmo natural

Con base en la tasa de inoculación es posible estimar el riesgo de la ocurrencia de manifestaciones agudas (incidencia) y se pueden comparar las situaciones epidemiológicas básicas de las regiones (Smith, 1984).

En los hatos *Bos taurus*, las tasas de inoculación <0.005 indican inestabilidad endémica y entre 0.005 y 0.0005 debe contarse con manifestaciones clínicas frecuentes. A una tasa de inoculación de 0.001, se puede esperar que aproximadamente el 50% de una población investigada se infecte entre los 10 y los 48 meses de edad y cerca del 20% permanecerá sin infectarse hasta la edad de 48 meses. Por otra parte, si la tasa de inoculación es inferior a 0.0005, el riesgo de enfermedad decrece ya que es improbable que la

gran mayoría de los animales en la población adquiere la infección en cualquier época. Alrededor del 90% de los animales de un hato permanecen sin infección a una tasa de inoculación de 0.0001 (Mahoney y Ross, 1972; Mahoney, 1974; Friedhoff y Smith, 1981; Anon., 1984b).

En los hatos **Bos indicus** puro, las manifestaciones de **B. bovis** serán ocasionales aún si las tasas de inoculación son inferiores a 0.005 y dentro del rango de 0.005 a 0.0005, establecido como crítico en el caso de hatos **B. taurus**. Es probable que los animales cruzados (**B. taurus** x **B. indicus**) tomen una posición intermedia, dependiendo posiblemente de la proporción de genes **B. indicus** en estos animales, ya que Mahoney et al. (1981) observaron que los animales mestizos no necesitaban control de las garrapatas mientras su tasa de inoculación había descendido a menos de 0.005.

Existen varios modelos matemáticos que incluyen los componentes del complejo de la relación vector-parásito-huésped (Ross y Mahoney, 1974; Smith, 1983; Sutherst y Maywald, 1985; Suthers, 1986) que pueden ser útiles en la planificación de programas estratégicos de control.

3.7.2 Investigaciones epidemiológicas en Latinoamérica

Las tasas de prevalencia para **B. bigemina** y **A. marginale** son en general altas en los países de Centro y Suramérica. Se informa que la ocurrencia de las infecciones con **B. bovis** es más frecuente en El Salvador, Bolivia y Guayana que en Colombia, Venezuela y México.

En el Brasil, la babesiosis es considerada endémica en el estado de Minas Gerais, a tasas de prevalencia de 79.04% para **B. bigemina** y de 82.53% para **B. bovis** (Salcedo et al., 1987).

En Santa Lucía, Hugh-Jones et al. (1988) encontraron tasas de prevalencia de 68% para **B. bigemina** y de 56% para **B. bovis**.

Según estimativos de veterinarios en Argentina, el 3.5% de las pérdidas por muerte en hatos productores de leche, es ocasionado por **A. marginale** vs. 1.5% por **B. bovis** (Spaeth et al., 1988). En ganado de carne, las pérdidas por causa de ambos patógenos fueron del 3.5%.

Sólo en muy pocas ocasiones se han realizado informes acerca de estudios longitudinales sobre la ocurrencia e implicaciones de las infecciones con hemoparásitos en Latinoamérica.

En México, Teclaw et al. (1985a,b) realizaron investigaciones epidemiológicas en 190 animales de 5 hatos, utilizando las pruebas IFAT y aglutinación en tarjeta por un período de 10 meses. Ellos observaron 4 seroconversiones para **B. bovis** entre mayo y septiembre; las seroconversiones de **B. bigemina** fueron más frecuentes y su distribución fue uniforme durante todo el período de la investigación, mientras que para **A. marginale** no estuvieron distribuidas uniformemente entre los hatos.

En Venezuela, James et al. (1985) examinaron dos grupos de terneros, uno de los cuales era **Bos taurus** y el otro **Bos indicus**, por lo regular hasta su séptimo mes de vida. Encontraron que los terneros se infectaban entre el tercer y el cuarto mes con **B. bovis**, **B. bigemina** y **A. marginale**. No se presentaron diferencias significativas entre las razas.

En el Salvador, se examinaron regularmente 50 terneros de 4 hatos hasta los 12 meses de edad. La mayoría de los animales se infectó hasta el séptimo mes de vida con **B. bovis**, **B. bigemina** y **A. marginale**

(Payne y Scott, 1982).

En Bolivia, Berry et al., (1981) demostraron mediante la prueba IFAT la presencia de anticuerpos maternos para *B. bovis* en 18 terneros hasta su quinta semana de vida. A partir de este punto, los títulos empezaron a incrementarse, lo cual según los autores se debió a infección natural.

Se encontró que la prevalencia de *A. marginale* aumenta con la duración de la permanencia de los animales en el pasto (López et al., 1983) y la transmisión de anaplasmosis estuvo favorecida por altas densidades ganaderas debido a que éstas facilitaron el cambio de huéspedes de garrapatas infectadas (Rogers y Shiels, 1979).

Las prevalencias altas de anaplasma en animales jóvenes se correlacionan inversamente con la ocurrencia de manifestaciones clínicas; éstas ocurren principalmente en animales adultos. En Australia, se registró el 38% de casos clínicos de anaplasma en bovinos entre 1 y 3 años de edad; 55% en animales mayores de 3 años (Rogers y Shiels, 1979). En Argentina, se observó el 82% de los casos clínicos en bovinos mayores de dos años de edad (Spaeth, 1986).

La anaplasmosis clínica ocurre con mayor frecuencia en razas lecheras en Argentina y Australia, pero también se presenta en razas de carne. En éstas, 62% de los casos clínicos se observó en animales Hereford comparado con 8% en Brahman X (una raza *Bos indicus*) (Spaeth, 1986; Rogers y Shiels, 1979).

3.7.3 Investigaciones epidemiológicas en Colombia

Las infecciones hemoparasitarias y sus efectos se incluyeron en una investigación seccional-cruzada realizada en Córdoba, Colombia (Otte et al., 1985; Anon., 1989); sus implicaciones económicas fueron resumidas por Navarrete (1990) quien encontró que los costos por concepto de preservación de la salud ascendieron a 23.2% de los costos variables totales en las fincas pequeñas (< 200 ha) incluidas en el estudio, a 13.7% en las medianas (200 a 300 ha) y a 12.8% en las grandes (> 300 ha). De estos gastos, el 27.2% fue ocasionado por el control de las garrapatas en las fincas pequeñas, 19.3% en las medianas y el 17.5% en las grandes. Otte (1989) calculó los "costos" ocasionados por la infestación con *B. microplus* y *A. marginale*.

3.7.3.1 Anaplasmosis

La prevalencia total en Córdoba, Colombia, de *A. marginale* ha sido estimada por Tropberger (1987) y Otte et al. (1987) en 90% en terneros de 8 meses de edad, con una fluctuación de 64% a 100% entre las varias fincas.

Kuttler et al. (1970) observaron al examen microscópico (extendidos delgados) en animales de Turipaná (Córdoba) un resultado positivo del 44%, pero 94% fueron positivos a la FC. Betancourt (1984b) informó que 44.1% de los animales incluidos en la encuesta eran microscópicamente positivos y que se había presentado *A. marginale* en 101 de las 104 fincas investigadas. Patarroyo et al. (1978) encontraron reactores serológicos (prueba aglutinación en tarjeta) en 66 de las 72 fincas que habían estudiado y 93% de los animales analizados resultaron positivos.

Según Otte et al. (1987), las tasas parasitarias de *A. marginale* fueron las más altas en terneros de 3 a 5 meses de edad; a los 8 meses casi todos los terneros habían adquirido la infección. Durante el estudio

longitudinal se encontraron tasas de infección de 64% a 100% y *A. marginale* se transmitió efectivamente en una finca que estaba virtualmente libre de garrapatas. Las más altas densidades de parásitos se observaron en terneros de 2 a 3 meses de edad; de ahí en adelante la densidad de la parasitemia declinó abruptamente, continuando en niveles bajos hasta cuando los terneros tuvieron 1 año de edad y no se volvieron a examinar. Esto, según Otte et al. (1987) sería evidencia de la existencia de un estado de "hiperendemicidad" en la región.

Las parasitemias fueron en general más altas y persistieron por más tiempo en los terneros cruzados con razas Europeas que en los Cebú/Criollo; se observaron los efectos correspondientes en el volumen globular y en la ganancia de peso. Esta última, sin embargo, se compensó en su totalidad para la época en que los animales tuvieron 8 meses de edad.

La incidencia de la infección con *A. marginale* también se encontró alta. Corrier y Guzmán(1977), por ejemplo, examinaron para *A. marginale* y *B. bigemina* (FC y microscópicamente) 30 vacas y sus terneros en cada uno de cuatro hatos en Córdoba, a intervalos quincenales hasta el sexto mes de vida de los terneros. Encontraron que todos los terneros tardaron un promedio de 11 (4-24) semanas en adquirir la infección con *A. marginale*. Dos de los terneros se afectaron clínicamente pero se recuperaron sin tratamiento. Se observó algún efecto en el volumen globular de los terneros infectados. Esto fue confirmado por Otte et al. (1987) quienes también advirtieron que algunos de los terneros desarrollan síntomas clínicos severos de anaplasmosis. Nowak (1990) estima que aproximadamente el 10% de la mortalidad en terneros en el área se puede atribuir a *A. marginale*, a unas tasas de mortalidad cercanas al 5% en terneros Cebú/Criollo y del 10% en los mestizos.

La incidencia clínica de anaplasmosis tiene correlación con el porcentaje de genes de *Bos taurus* en animales mestizos (Otte et al., 1987), lo cual se debe por lo menos en parte a la resistencia de la raza a las garrapatas (Aguirre et al., 1988).

3.7.3.2 Babesiosis

Corrier y Guzmán (1977) estudiaron en Córdoba las infecciones con babesia en 120 vacas con sus terneros (ver anaplasmosis). Los 120 terneros contrajeron infecciones con *B. bigemina* entre la semana 2 y 24 de nacidos, pero sólo se detectaron seis parasitemias de *B. bovis*. Ninguno de los terneros mostró síntomas clínicos de enfermedad. Griffiths et al. (1982) observaron *B. bovis* en 2.3% y *B. bigemina* en 3.3% de 439 preparaciones de gota gruesa de bovinos en la región de la Costa Norte.

Durante el estudio longitudinal realizado por el proyecto en Córdoba, se monitorearon los terneros para, entre otros problemas, infecciones con *B. bovis* y *B. bigemina*, utilizando la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes y extendidos delgados.

Según Tropberger (1987) y Otte (1989), los terneros contrajeron la infección con *B. bigemina* a una edad relativamente muy temprana y a una tasa cercana al 100%. Tropberger calculó una tasa de inoculación de 0.03 en todos los hatos involucrados. Según Otte (1989), se observaron tasas máximas de *B. bigemina* de 50-60% en extendidos delgados de terneros de 5 y 7 meses de edad. Sin embargo, a los 12 meses de edad se encontró *B. bigemina* en sólo el 27% de los terneros de los hatos Cebú/Criollo, versus >40% en terneros mestizos. Ninguno de los terneros desarrolló babesiosis clínica o aún subclínica. Por otra parte, el mismo autor (1989) expresa que tanto él como Nowak (datos sin publicar) advirtieron infecciones severas con *B. bovis* en frotis de cerebro de terneros que habían muerto después de una enfermedad corta,

aguda más no calificada (por el personal de la finca) y que no mostró otras alteraciones patológicas.

Otte (1989) encontró la prevalencia de *B. bovis*, al igual que su densidad en extendidos frescos y su incidencia, mucho más baja que aquella de *B. bigemina*. Este autor estimó que la tasa de inoculación de *B. bovis* era aproximadamente 0.005, aunque se presentaron diferencias significativas entre los hatos Cebú/Criollo (0.003) y los hatos con terneros mestizos (0.06). En estos últimos hatos se observaron tasas parasitarias cercanas al 15%, versus 4% en los primeros.

Zipe (1989), al analizar los datos de la encuesta que había precedido el estudio longitudinal, llegó a la conclusión que una tasa de inoculación para *B. bovis* en hatos Cebú/Criollo de 0.003 posiblemente no es evidencia de una inestabilidad endémica. Él cree, después de examinar los datos serológicos de 1191 animales y 73 fincas, que la incidencia total de *B. bovis* en la mayoría de los hatos en Córdoba, dada su estructura genética, debería ser lo suficientemente alta como para garantizar estabilidad endémica.

Las cepas colombianas de *B. bigemina* y *B. bovis* han sido cultivadas en el Instituto de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria de Hannover. Estas se examinaron para averiguar su grado de virulencia. Se encontró que la cepa de *B. bigemina* (Chinú) era de baja virulencia, causando síntomas de enfermedad más bien moderados en terneros Holstein susceptibles de origen Alemán, ninguno de los animales infectados artificialmente requirió tratamiento. Sin embargo, la cepa de *B. bovis* mostró un alto grado de virulencia y ocasionó enfermedad severa en todos los animales infectados con la misma. Todos los bovinos necesitaron tratamiento (Friedhoff et al., publicado en este volumen).

**II. INVESTIGACIONES EPIDEMIOLOGICAS DE LA INFECCION POR
BABESIA BOVIS EN CORDOBA (COLOMBIA)**

Por

Stephan Georg Zips

**Extractado de: Epidemiologische Untersuchung der Babesia bovis-infektion in
Córdoba (Kolumbien). Dissertation, Hannover, 1989.**

INDICE DE CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION	33
2. MATERIALES Y METODOS	33
2.1 Cepa de B. bovis	33
2.2 Sueros de campo de origen colombiano	33
2.3 Sueros de referencia positivos	33
2.4 Sueros de animales con enfermedad febril	34
2.5 Métodos	34
2.5.1 Ejecución de la prueba IFAT	34
2.5.2 Controles de la prueba	34
2.5.3 Evaluación estadística	34
3. RESULTADOS DE LAS INVESTIGACIONES DE CAMPO	35
3.1 Control de la prueba IFAT e interpretación de los resultados serológicos	35
3.2 Prevalencia de infecciones con B. bovis	35
3.3 Relación entre las tasas de infección, la edad y la raza	35
3.4 Relación entre las tasas de infección y la distribución geográfica de las fincas	39
3.5 Relación entre las tasas de infección y la distancia al río más cercano	39
3.6 Relación entre la tasa de infección y raza	39
3.7 Determinación de las tasas de infección e inoculación en terneros	41
3.8 Dinámica estacional de la infestación con garrapatas	41
3.9 Relación entre la frecuencia de los tratamientos con acaricidas y tasa de infección	44
3.10 Análisis logístico de regresión	45
4. DISCUSION	50
5. CONCLUSIONES	53
6. RESUMEN	53

INDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 3.1	Tasas de infección (B. bovis) de bovinos en 79 fincas investigadas en Córdoba: división en cuatro clases 35
TABLA 3.2	Tasas de infección (B. bovis) en 1191 animales de 79 hatos en Córdoba: distribución geográfica 39
TABLA 3.3	Tasas de infección y tasas de inoculación calculadas en 370 terneros de 79 hatos en Córdoba 41
TABLA 3.4	Número y porcentaje de bovinos tratados con acaricidas en 79 hatos de Córdoba, durante el invierno y el verano, en comparación con las tasas de infección 44
TABLA 3.5	Análisis de regresión univariado de las tasas de infección para B. bovis (factores enunciados arriba) 45
TABLA 3.6	Resultados del análisis por inclusión para un modelo de regresión logístico de las tasas de infección (B. bovis) 47
TABLA 3.7	Resultados del análisis por eliminación para un modelo de regresión logístico para tasas de infección (B. bovis) 48
TABLA 3.8	Resultados de un análisis de regresión univariado de las tasas de infección (B. bovis) 49
TABLA 3.9	Matriz de correlación de las cuatro variables 50

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 3.1	Tasas de infección (B. bovis) en 79 fincas de Córdoba36
FIGURA 3.2	Distribución de la frecuencia de los resultados para B. bovis en 1191 bovinos en Córdoba. Comparación de los tres grupos de edad 37
FIGURA 3.3	Frecuencia relativa acumulada de los títulos más altos según las razas. Resultados IFAT para B. bovis en 1191 bovinos de 79 fincas en Córdoba38
FIGURA 3.4	Tasas de infección (B. bovis) en 1191 bovinos de 79 fincas en Córdoba, según las razas 40
FIGURA 3.5	Tasas de infección (B. bovis) en 351 terneros examinados entre 4 y 10 meses de edad de 79 fincas en Córdoba: comparación con las tasas mínimas requeridas para la estabilidad endémica 42
FIGURA 3.6	Tasas de infestación con Bo. microplus en 1191 bovinos y títulos promedios de anticuerpos (IFAT, B. bovis) de 370 terneros en Córdoba43
FIGURA 3.7	Frecuencia de los tratamientos con acaricidas en 1191 bovinos de 79 fincas en Córdoba: variaciones estacionales 46

1. INTRODUCCION

Investigaciones previas sobre el presente tema (Zuerner, 1983; Mueller, 1984) trataron sobre el mejoramiento y la estandarización de la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes, o se realizaron como estudios longitudinales en 12 (Tropberger, 1987) ó 6 (Nowak, 1989) fincas ubicadas en Córdoba.

La presente investigación fue un estudio seccional-cruzado de la infección por *B. bovis* en Córdoba con base en los datos y materiales proporcionados a través de una encuesta realizada en 104 fincas en este departamento. Está diseñado para arrojar una luz sobre la diseminación de la infección con este hemoparásito en el área y sobre los factores que han tenido influencia en su incidencia.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Cepa de *B. bovis*

Para la preparación del antígeno se utilizó una cepa de *B. bovis* aislada de garrapatas *B. microplus* en el Instituto de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria de Hannover, que había sido colectada en una finca localizada en Chinú, Córdoba. La babesia se había mantenido en un cultivo de eritrocitos y se obtuvo en el pasaje 121.

2.2 Sueros de campo de origen colombiano

Los sueros se obtuvieron durante una encuesta que había sido realizada en 104 fincas en el Departamento de Córdoba y áreas adyacentes de Sucre y Antioquia en 1982 y 1983. Las fincas habían sido seleccionadas de tal manera que representaran el patrón del tamaño del hato de la región al igual que las prácticas de manejo y estándares y la distribución geográfica.

En cada uno de estos hatos, se colectaron datos sobre producción y salud usando un cuestionario; los exámenes clínicos incluyendo la toma de muestras se realizaron en grupos de 30 animales, a saber, 12 vacas, 5 terneros machos y 5 hembras, 4 novillos jóvenes y 4 novillas y 1 toro.

Para el presente análisis se proporcionó un total de 1.191 sueros de 79 de las fincas y, con pocas excepciones, se dispuso de 15 muestras de cada finca compuestas por animales de los varios grupos por edad.

2.3 Sueros de referencia positivos

Se contó con sueros de referencia de 8 bovinos experimentales, infectados con cepas de *B. bovis* procedentes de Colombia (5), Australia (2) y Turquía (1).

2.4 Sueros de animales con enfermedad febril

Para descartar la posible ocurrencia de reacciones positivas falsas, se obtuvieron sueros de 30 pacientes de la "Rinderklinik" de la facultad de Medicina Veterinaria de Hannover, que habían mostrado temperaturas superiores a 39 °C durante tres días consecutivos, tomadas en la mañana y en la noche, tiempo en el cual se pudieron excluir con certeza las infecciones con *B. bovis* como causas de sus reacciones febriles.

2.5 Métodos

En la prueba IFAT se utilizó como conjugado una IgG antibovina (cadenas H y L) producida en conejo con Dichlorotriazinyl-Amino-Fluoresceina (DTAF) 3 como fluoróforo en una dilución de 1:80 (Mueller, 1984), disponible en el comercio. Anticuerpos conjugados con DTAF, según Blakeslee y Bains (1976), son superiores a los conjugados con FITC en cuanto a su estabilidad.

Tanto el cultivo de células, como el subcultivo y la preparación del antígeno se realizaron basados en la experiencia previa de Zuerner (1983) y Mueller (1984).

2.5.1 Ejecución de la prueba IFAT

Todos los sueros se examinaron en 1988 y 1989 en pruebas ciegas dobles siguiendo el método descrito por Zuerner (1983). Los sueros de campo se diluyeron en secuencia geométrica de 1/10 a 1/1280. La clave descrita por Tropberger (1987) sirvió para interpretar los resultados finales.

Se incluyeron los siguientes exámenes de control:

- 1 suero de referencia positivo (título 1/1280)
- 1 suero de referencia positivo (título 1/80; Mueller, 1984)
- 1 control buffer (antígeno y buffer)
- 1 control del conjugado (buffer y conjugado)
- 1 suero negativo, en diluciones de 1/10 a 1/80

2.5.2 Controles de la prueba

Para determinar si había reacciones cruzadas se examinaron, frente al antígeno de *B. bovis* (Chinú), sueros de referencia de animales infectados con *B. bigemina*, *B. major* y *B. divergens* al igual que sueros de animales sanos no infectados y febriles pero no infectados con babesia.

2.5.3 Evaluación estadística

Se aplicó el análisis de regresión y se calcularon el coeficiente de regresión y el coeficiente de regresión corregido R^2 (Hartung y Elpelt, 1986). Se elaboraron tablas de contingencia para la evaluación estadística de variables discretas y nominales a escala.

Además, se aplicó el análisis logístico de regresión de datos cualitativos para los modelos lineales (Kleinbaum, Kupper y Chambless, 1982; Hartung y Elpelt, 1986).

3. RESULTADOS DE LAS INVESTIGACIONES DE CAMPO

3.1 Control de la prueba IFAT e interpretación de los resultados serológicos

Se probó el antígeno de *B. bovis* preparado a partir de la cepa Chinú frente a los siguientes sueros:

Sueros de referencia del Instituto:	<i>B. divergens</i>	2
	<i>B. bigemina</i>	9
	<i>A. marginale</i>	2
Sueros de animales sanos, negativos:		14
Sueros de animales febriles, negativos:		32

En estos 59 sueros no se observaron títulos superiores a 1/10. Por lo tanto, todos los sueros de origen colombiano que mostraron una fluorescencia opaca pero distinta de los eritrocitos y del parásito intracelular a diluciones superiores a 1/10 se consideraron positivos.

3.2 Prevalencia de infecciones con *B. bovis*

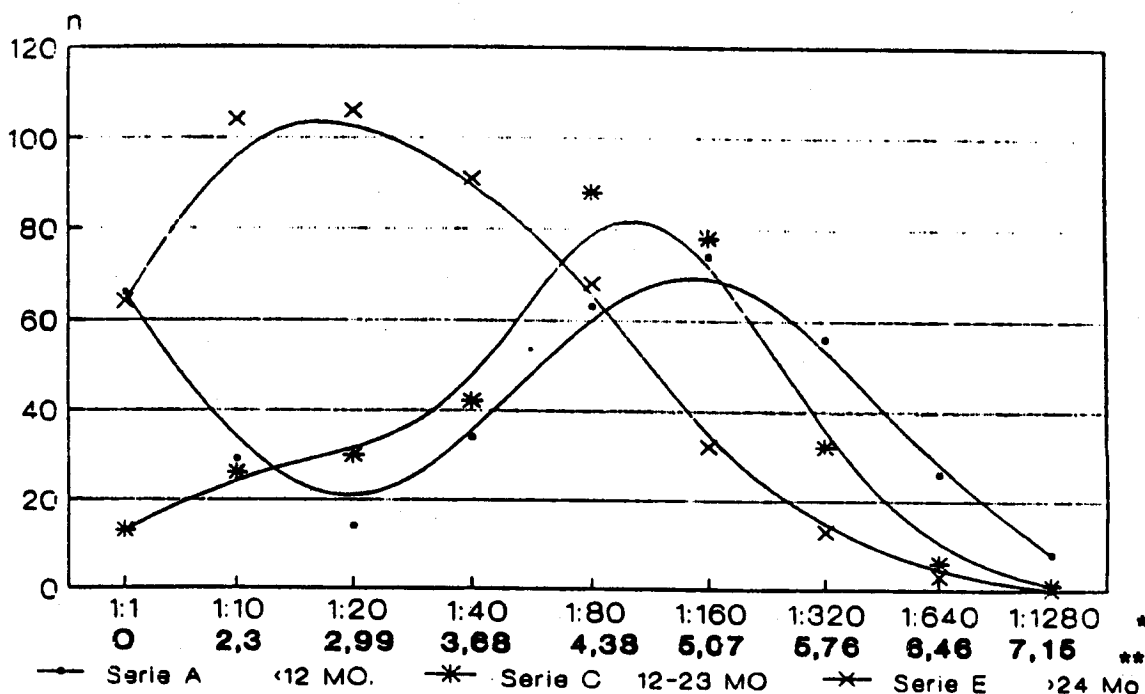
Los 79 hatos investigados se dividieron en cuatro clases de acuerdo con la prevalencia observada de las infecciones de *B. bovis* (Tabla 3.1). En la Figura 3.1 se presenta su distribución geográfica y su clasificación de la prevalencia. En promedio, 74% de los animales examinados de los hatos se encontró seropositivo a *B. bovis*. La tasa de infección más baja (20%) se observó en los hatos Nos. 18 y 20, situados en el extremo norte y en el área central de Córdoba respectivamente. En 6 casos todos los bovinos examinados y en la mayoría de las fincas más del 50% de los animales resultaron seropositivos. Sólo en 12 fincas el porcentaje de animales positivos fue inferior al 50%.

TABLA 3.1 TASAS DE INFECCION (*B. bovis*) DE BOVINOS EN 79 FINCAS INVESTIGADAS EN CORDOBA: DIVISION EN CUATRO CLASES

Clase	Porcentaje de animales infectados	No. de hatos
I	0-25	2
II	26-50	10
III	51-75	30
IV	76-100	37

3.3 Relación entre las tasas de infección, la edad y la raza

En la Figura 3.2 se muestra la frecuencia absoluta de los títulos recíprocos más altos observados en los animales positivos. Las tres curvas diferentes representan los varios grupos por edad.



* Títulos IFAT
 ** Logaritmo natural de los títulos IFAT

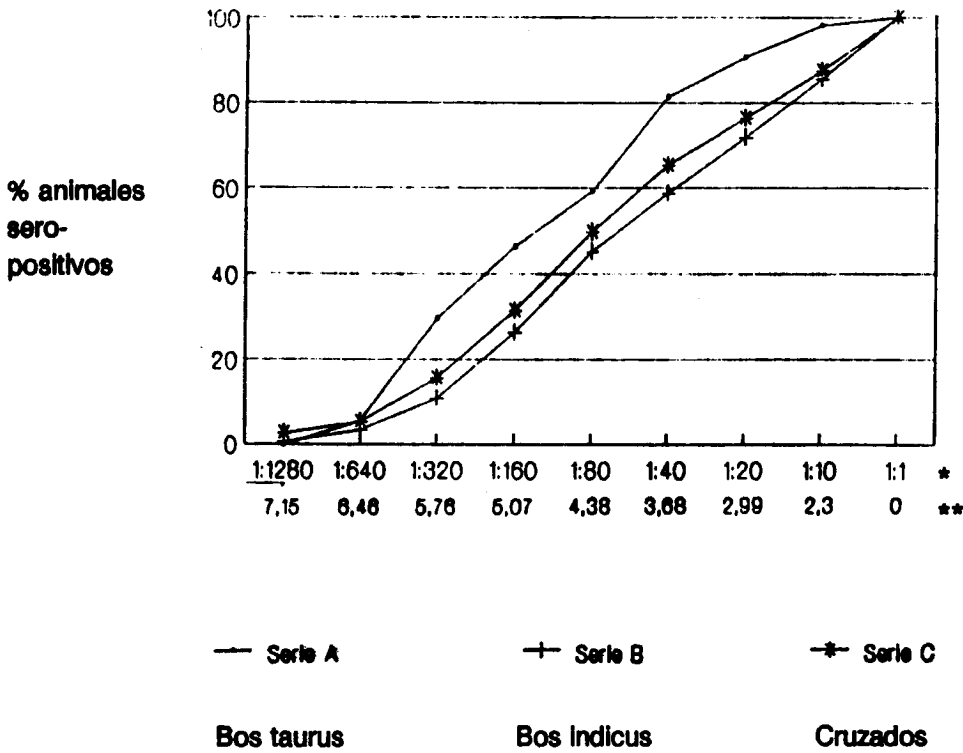
FIGURA 3.2 DISTRIBUCION DE LA FRECUENCIA DE LOS RESULTADOS PARA B. bovis EN 1191 BOVINOS EN CORDOBA. COMPARACION DE LOS TRES GRUPOS DE EDAD

La curva de terneros muestra su máximo a un título de 1/160, pero más de 60 terneros se encontraron negativos.

Las vacas y los toros (> 24 meses de edad) mostraron un cuadro más uniforme; la gran mayoría de ellos reaccionaron a títulos bajos (1/10 a 1/40).

El número más elevado de animales jóvenes (de 12 a 23 meses de edad) reaccionaron a 1/80 y 39 de un total de 316 resultaron negativos.

Para la evaluación de las diferencias entre los tres grupos arriba mencionados, se realizó un análisis de regresión, utilizando la edad (meses) como la variable independiente y el logaritmo natural del título recíproco de IFAT como la variable dependiente. Se encontró un coeficiente de regresión (-1.199) altamente significativo; al igual que el R² (0.064).



* Títulos IFAT
 ** Logaritmo natural de títulos IFAT

FIGURA 3.3 FRECUENCIA RELATIVA ACUMULADA DE LOS TITULOS MAS ALTOS SEGUN LAS RAZAS. RESULTADOS IFAT PARA B. bovis EN 1191 BOVINOS DE 79 FINCAS EN CORDOBA

La Figura 3.3 muestra la frecuencia relativa acumulada de la ocurrencia de los títulos recíprocos más altos expresada por su logaritmo natural y empezando desde la más alta dilución (1/1280) utilizada en la investigación. Fue evidente que los animales de las razas **Bos taurus** en general reaccionaron con títulos más elevados que aquellos pertenecientes a las razas **Bos indicus** o animales cruzados.

Los animales se reagruparon luego según el conjunto de genes predominantes y se establecieron "variables ficticias" (0 = **Bos indicus**; 1 = cruzados; 2 = **Bos taurus**), con el fin de realizar otro análisis de regresión. Este resultó en una significativa correlación positiva. En el análisis de regresión simultáneo de las dos variables edad y raza, finalmente se encontró una constante de la regresión de 3.900. El coeficiente de regresión para la edad fue -0.012; el de la raza +0.454. R², a un valor de 0.081, fue altamente significativa (p < 0.001).

3.4 Relación entre las tasas de infección y la distribución geográfica de las fincas

Se colocó un scanner milimétrico sobre un mapa de Córdoba y se le asignaron cifras a las fincas para su localización en un eje oriente/occidente (X) y otro norte/sur (Y). Las cifras para los valores X oscilaron entre 0.9 y 13.2; para Y entre 1.7 y 16.6. Se conformaron tres clases dentro de cada una de las dos categorías y se establecieron tablas de contingencia para verificar las desviaciones en la frecuencia de animales infectados a partir de una distribución normal como podría esperarse en variables independientes.

TABLA 3.2 TASAS DE INFECCION (B. Bovis) EN 1191 ANIMALES DE 79 HATOS EN CORDOBA: DISTRIBUCION GEOGRAFICA

Categoría	Número de fincas	Número de animales	Número de animales seropositivos	% animales seropositivos
Eje X				
1/Occidente	25	253	184	72.73
2/Centro	37	376	264	70.21
3/Oriente	17	562	426	75.80
Eje Y				
1/Sur	32	347	265	76.37
2/Centro	24	490	366	74.69
3/Norte	23	354	243	68.64

Se observó una correlación significativa en la prueba χ^2 ($p = 0.0477$) entre el porcentaje de animales seropositivos y la situación geográfica de la finca a lo largo del eje norte/sur, pero no se pudo demostrar influencia alguna en lo que se refiere al eje oriente/occidente ($p = 0.1594$).

3.5 Relación entre las tasas de infección y la distancia al río más cercano

Las fincas se dividieron en dos grupos según su proximidad o no a los principales ríos de Córdoba y de los departamentos vecinos, Sinú, San Jorge y el Cauca. Aquellas fincas que estaban localizadas en un radio de 10 km de cualquiera de aquellos tres ríos se colocaron en el grupo 1, todas las otras en el grupo 2. La prueba χ^2 mostró sólo diferencias menores ($p = 0.054$) en las tasas de infección de los animales en los dos grupos.

3.6 Relación entre tasa de infección y raza

Los animales en las fincas bajo investigación se habían clasificado durante la encuesta, con base en la

Información suministrada por el personal de la finca y en evidencia visual, en las tres categorías **Bos taurus** (exótico y Criollo), **Bos indicus** y mestizos **Bos indicus** x **Bos taurus** y se compararon las tasas de infección en estas tres categorías (Figura 3.4). La distribución de los animales seropositivos y seronegativos estaba desviada significativamente de la distribución normal (χ^2 , $p = 0.006$). Los animales predominantemente **Bos taurus** se encontraron infectados con mayor frecuencia (49 de 54) que los asignados a las razas **Bos indicus** (708 de 984). De un total de 153 que no se pudieron asignar con certeza a alguna de estas dos categorías, 117 resultaron seropositivos.

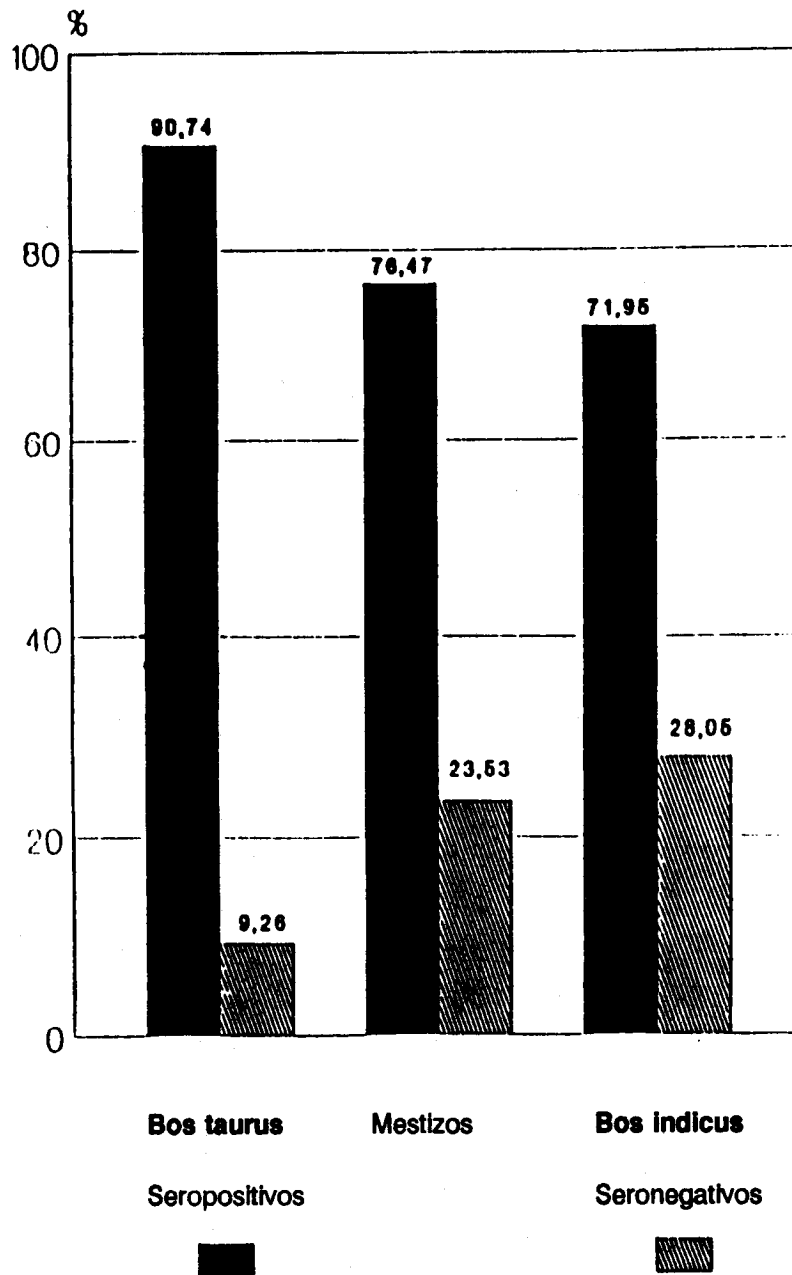


FIGURA 3.4 TASAS DE INFECCION (B. bovis) EN 1191 BOVINOS DE 79 FINCAS EN CORDOBA, SEGUN LAS RAZAS

3.7 Determinación de las tasas de infección e inoculación en terneros

En la Tabla 3.3 se muestran las tasas de infección e inoculación determinadas para terneros menores de 12 meses, a excepción de aquellos con 1, 3 y 11 meses debido a que no se contaba con muestras suficientes para cálculos significativos.

TABLA 3.3 TASAS DE INFECCION Y TASAS DE INOCULACION CALCULADAS EN 370 TERNEROS DE 79 HATOS EN CORDOBA

Edad meses	Seronegativos		Seropositivos		h*	Total n
	No.	%	No.	%		
1	0	n.c.**	1	n.c.	n.c.	1
3	3	n.c.	2	n.c.	n.c.	5
4	18	39.13	28	60.87	0.0078	46
5	22	27.50	58	72.50	0.0087	80
6	14	19.72	57	80.28	0.0090	71
7	7	13.73	44	86.27	0.0095	51
8	12	26.09	34	73.91	0.0056	46
9	8	25.81	23	74.19	0.0050	31
10	5	19.23	21	80.77	0.0055	26
11	3	n.c.	10	n.c.	n.c.	13
Total	92	24.86	278	75.14		370

* h = tasa de inoculación

** n.c. = no calculado

En la Figura 3.5 se muestran las tasas de infección de los terneros en la forma de un diagrama dentro del cual se insertó una curva para la función $I = 1 - e^{-h \cdot t}$ (correspondiente a $h = 0.005$), el valor mínimo para garantizar estabilidad endémica en una población de *Bos taurus* puro. Es evidente que las tasas de infección de los terneros entre 4 y 10 meses de edad alcanzan o inclusive sobrepasan el límite requerido para que prevalezca la estabilidad endémica.

3.8 Dinámica estacional de la infestación con garrapatas

La Figura 3.6 muestra la evolución de las tasas de infestación con garrapatas durante un año (sólo animales en los cuales se contaron más de 10 garrapatas estándar). Se observó un incremento abrupto hasta casi 80%, de los animales examinados (14/18) que tenían más de 10 garrapatas estándar al finalizar la época de verano (febrero a mayo), pero con la iniciación de las lluvias decrecieron las tasas de infestación, hasta alcanzar su más bajo nivel en septiembre (3/39), mes en el cual empezaron a elevarse nuevamente.

Estas fuertes variaciones estacionales en las tasas de infestación con garrapatas de los bovinos en Córdoba, podrían llevar a la presunción que la incidencia de infecciones con hemoparásitos estaría sometida a fluctuaciones similares las cuales, a su vez, se expresarían a través de las diferencias correspondientes en los títulos promedio de los terneros. Para verificar esta suposición, se adicionó al diagrama el promedio aritmético del logaritmo natural de los títulos recíprocos del IFAT, de los animales hasta 11 meses de edad. Sin embargo, las fluctuaciones demostradas de esta manera, no fueron significativas y no indicaron que podrían tener una correlación con las tasas de infestación con garrapatas.

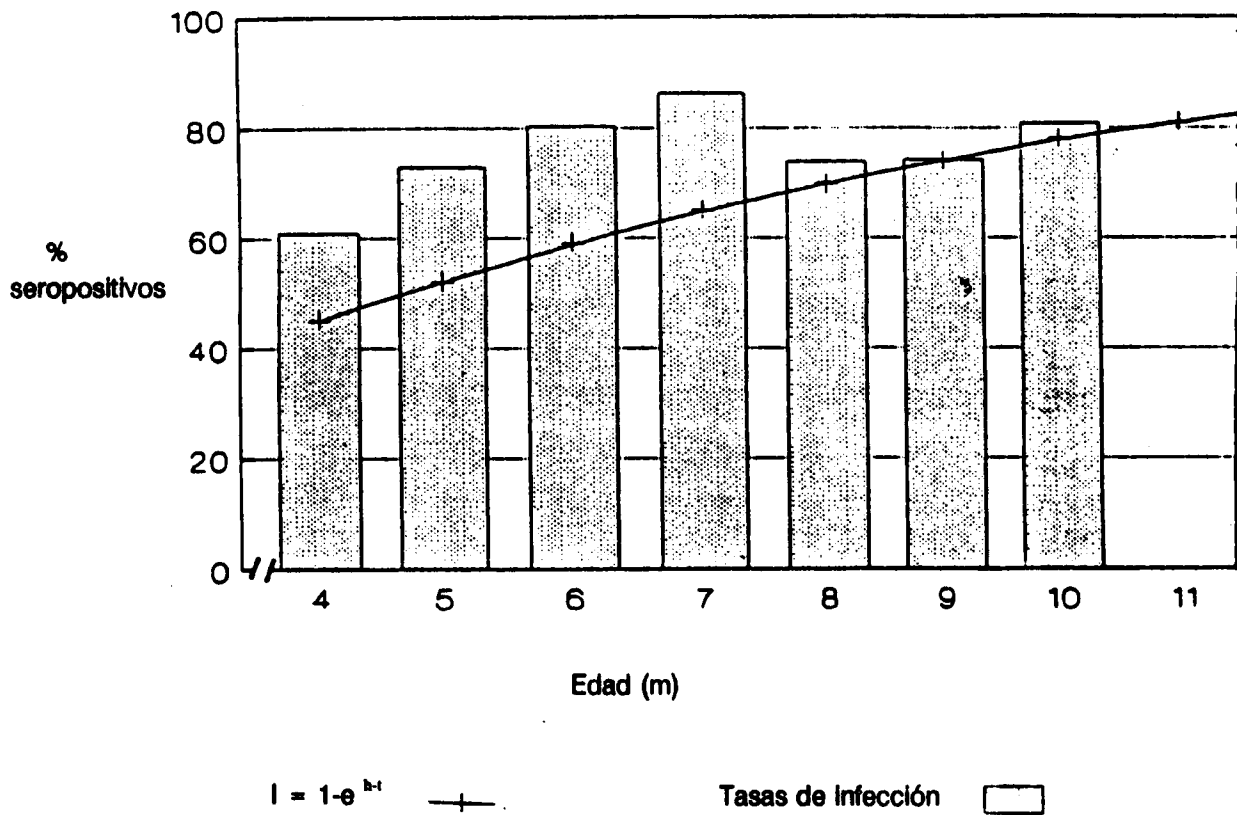
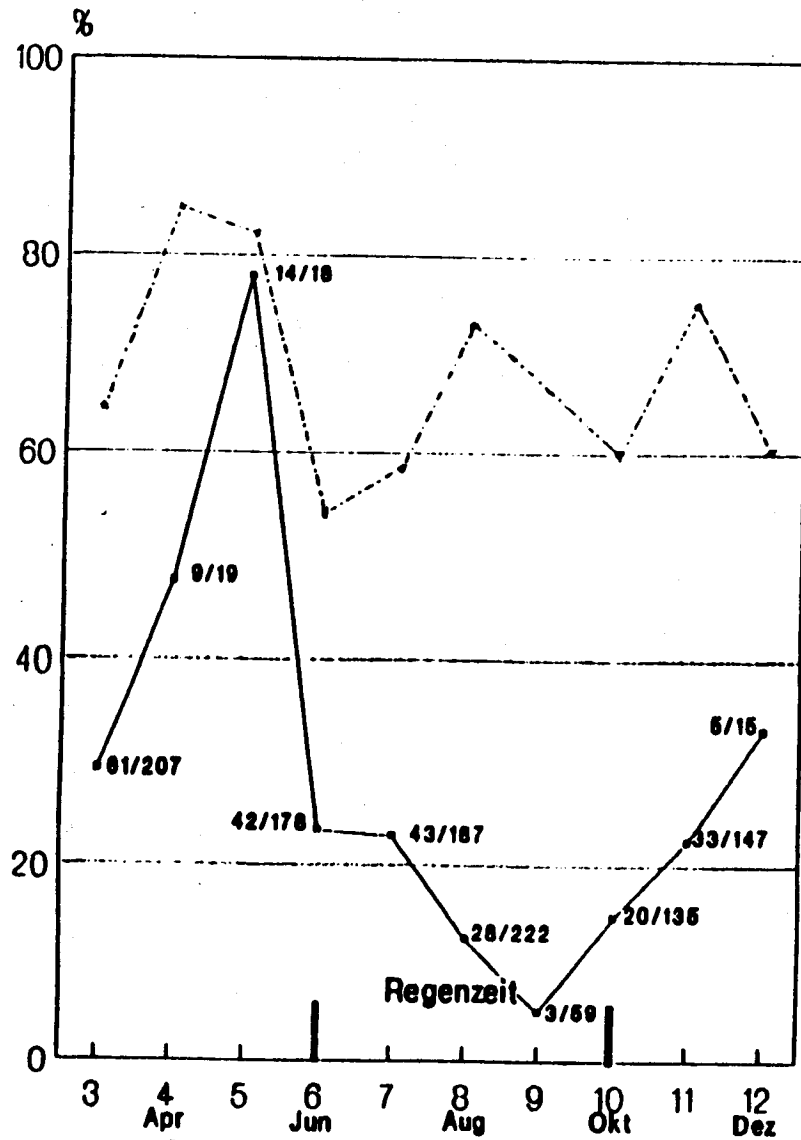


FIGURA 3.5 TASAS DE INFECCION (B. bovis) EN 351 TERNEROS EXAMINADOS ENTRE 4 Y 10 MESES DE EDAD DE 79 FINCAS EN CORDOBA: COMPARACION CON LAS TASAS MINIMAS REQUERIDAS PARA LA ESTABILIDAD ENDEMICA



% de animales infestados con > 10 garrapatas estándar
 Promedio títulos IFAT en terneros < 12 meses de edad
 Regenzeit = época de lluvias

FIGURA 3.6

TASAS DE INFESTACION CON *B. microplus* EN 1191 BOVINOS Y TITULOS PROMEDIOS DE ANTICUERPOS (IFAT, *B. bovis*) DE 370 TERNEROS EN CORDOBA

3.9 Relación entre frecuencia de los tratamientos con acaricidas y tasa de infección

Las fincas bajo investigación se clasificaron, de acuerdo con la frecuencia de los tratamientos con acaricidas efectuados al hato, en los seis grupos siguientes:

- 0 No se aplicó tratamiento acaricida
- 1 Tratamientos acaricidas a intervalos de 3 meses o más
- 2 Tratamientos acaricidas a intervalos de 2 meses
- 3 Tratamientos acaricidas a intervalos de 1 a 2 meses
- 4 Tratamientos acaricidas dos veces cada mes
- 5 Tratamientos acaricidas más de dos veces al mes

Sobre esta base se realizó el análisis en forma separada para el invierno y para el verano, de donde se hizo evidente que los tratamientos con acaricidas fueron aplicados con más frecuencia durante el verano que durante el invierno. En la Tabla 3.4 y en la Figura 3.7 se presentan las frecuencias dentro de las seis categorías.

TABLA 3.4 NUMERO Y PORCENTAJE DE BOVINOS TRATADOS CON ACARICIDAS EN 79 HATOS DE CORDOBA, DURANTE EL INVIERNO Y EL VERANO, EN COMPARACION CON LAS TASAS DE INFECCION

Categorías	Animales tratados		De estos seropositivos	
	No.	%	No.	%
Invierno				
0	206	17.30	136	66.02
1	250	20.99	180	72.00
2	151	12.68	117	77.48
3	359	30.14	265	73.82
4	135	11.34	100	74.07
5	90	7.56	76	84.44
Total	1,191	100.00	874	
Verano				
0	61	5.12	39	63.93
1	57	4.79	36	63.16
2	135	11.34	92	68.15
3	314	26.36	215	68.74
4	312	26.20	240	76.92
5	312	26.20	252	80.77
Total	1,191	100.00	874	

3.10 Análisis logístico de regresión

Se examinaron los siguientes factores por análisis de regresión logístico para averiguar su influencia en las tasas de infección de *B. bovis*:

1. Proximidad al río	RIO
2. Topografía	TOP
3. Proximidad al pantano	PAN
4. Mes de toma de la muestra	MTM
5. Densidad ganadera, ha./pasto	DEG
6. Edad promedio de animales examinados	EDAD
7. Localización en el eje oriente/occidente	X
8. Localización en el eje norte/sur	Y
9. Raza dominante	RAZ
10. Sistema de manejo del pasto	SMP
11. Frecuencia, tratamientos acaricidas, invierno	FTI
12. Frecuencia, tratamientos acaricidas, verano	FTV

Los resultados de un análisis de regresión univariado de las tasas de infección para *B. bovis* se presentan en la Tabla 3.5.

Al realizar las pruebas χ^2 para homogeneidad, se presentaron desviaciones significativas de la distribución normal entre los grupos con diferentes frecuencias de tratamiento durante el invierno ($p = 0.0237$) y entre los de diversas frecuencias durante el verano ($p = 0.0005$); así, resultó un porcentaje más alto de seropositivos de los animales que se trataron más frecuentemente con acaricidas.

TABLA 3.5 ANÁLISIS DE REGRESION UNIVARIADO DE LAS TASAS DE INFECCION PARA B. bovis (FACTORES ENUNCIADOS ARRIBA)

Factores	Coefficiente regresión	Error estándar	G ²	Dif. G ²	p
FTV	+ 0.215	0.046	199.5	21.4	<0.001
SMP	- 0.696	0.159	202.6	18.3	<0.001
RAZ	+ 0.887	0.245	203.8	17.1	<0.001
Y	- 0.300	0.134	217.6	3.3	0.069
RIO	+ 0.370	0.144	214.0	6.9	0.009
EDAD	- 0.011	0.005	216.0	4.9	0.027
MTM	+ 0.124	0.094	219.2	1.7	0.192
TOP	+ 0.113	0.131	220.2	0.7	0.403
X	+ 0.028	0.020	219.1	1.8	0.180
DEG	- 0.218	0.113	217.3	3.6	0.058
PAN	- 0.002	0.160	220.9	0	1
FTI	+ 0.120	0.043	213.3	7.6	0.006

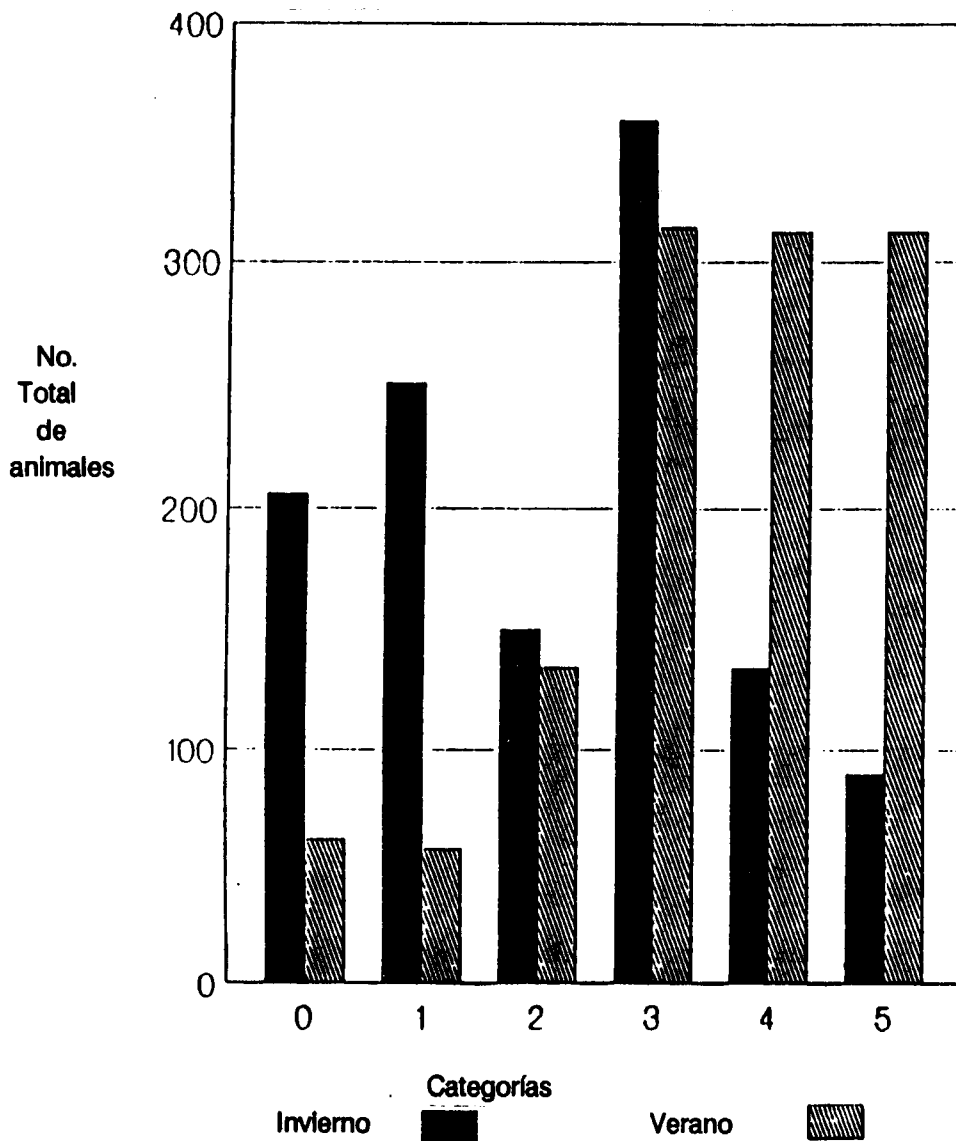


FIGURA 3.7 FRECUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS CON ACARICIDAS EN 1191 BOVINOS DE 79 FINCAS EN CORDOBA: VARIACIONES ESTACIONALES

Para detectar efectos de enmascaramiento, se probó la significancia de los factores por regresión logística múltiple, por inclusión y por eliminación. Se utilizó la significancia de la reducción o aumento en desviación (G^2) comparada con el modelo previo para determinar si debería entrar en el modelo un factor o debería ser eliminado de él en cualquier fase particular.

En el procedimiento por inclusión, se adicionó la variable que conducía al mejoramiento más marcado en el modelo en cuestión. En el paso siguiente se verificaron nuevamente todas las variables restantes y se adicionaron aquellas que llevaban a una mejora.

TABLA 3.6 RESULTADOS DEL ANALISIS POR INCLUSION PARA UN MODELO DE REGRESION LOGISTICO DE LAS TASAS DE INFECCION (B. bovis)

Factores	1er. Paso		2o. Paso		3er. Paso	
	Dif.G ²	p	Dif.G ²	p	Dif.G ²	p
FTV						
SMP	33.3	<0.001				
RAZ	11.0	(0.001	11.6	<0.001		
EDAD	5.6	0.018	8.1	0.004	11.6	<0.001
RIO	4.5	0.034	4.7	0.030	5.0	0.025
Y	9.2	0.002	4.8	0.028	8.7	0.003
MTM	0.5	0.488	0.8	0.371	0	1
TOP	1.2	0.254	1.1	0.294	0.7	0.403
X	0.8	0.371	0.8	0.371	0	1
DEG	4.5	0.034	3.3	0.069	3.6	0.058
PAN	0	1.0	0.4	0.572	0.7	0.403
FTI	0.6	0.439	0.8	0.371	0	1

	4o. Paso		5o. Paso		6o. Paso	
	Dif.G ²	p	Dif.G ²	p	Dif.G ²	p
FTV						
SMP						
RAZ						
EDAD						
RIO	10.1	0.001				
Y	7.5	0.006	15.8	<0.001		
MTM	4.3	0.038	0.2	0.655	1.7	0.192
TOP	4.2	0.040	1.3	0.254	1.3	0.254
X	3.1	0.078	0.1	0.752	1.1	0.294
DEG	3.0	0.083	0	1	1.2	0.273
PAN	4.6	0.032	0.4	0.572	1.2	0.273
FTI	2.9	0.089	0	1	0.1	0.752

En el análisis por eliminación, se examinaron los posibles deterioros del modelo al eliminar ciertas variables. Cuando se incluyeron los 12 factores, se obtuvo una desviación (G²) de 134.6.

En ambos procedimientos se encontró que las mismas 6 variables eran significativas.

TABLA 3.7 RESULTADOS DEL ANALISIS POR ELIMINACION PARA UN MODELO DE REGRESION LOGISTICO PARA TASAS DE INFECCION (B. bovis)

No.	Variable eliminada	Aumento de desviación	p
1	FTV	13.2	<0.001
2	SMP	7.2	0.007
3	RAZ	15.4	<0.001
4	RIO	15.4	0.001
5	Y	20.9	<0.001
6	EDAD	14.3	<0.001
7	MTM	0.7	0.403
8	TOP	1.9	0.168
9	X	0.0	1
10	DEG	1.2	0.275
11	PAN	2.5	0.114
12	FTI	0.1	0.752

De este modo se demostró que había correlaciones de la tasa de infección con *B. bovis* en las fincas investigadas en Córdoba con 6 variables y que la tasa de infección se elevó:

1. entre más al sur estaba situada la finca en el departamento,
2. cuando en el hato había un porcentaje cada vez más alto de genes exóticos,
3. según el número de tratamientos con acaricidas durante el verano,
4. según el decrecimiento de la edad promedio de los animales examinados,
5. en fincas distantes de los grandes ríos,
6. donde se practicaba la rotación de pastos.

Otros parámetros, tales como densidad ganadera, situación de la finca en relación con el eje oriente/occidente en Córdoba, proximidad a los pantanos, periodicidad del muestreo o la topografía de la finca (plana o montañosa) no tuvieron influencia alguna significativa en este modelo de regresión.

Por otra parte, los seis factores específicos que se habían identificado en el modelo como significativos no fueron completamente suficientes para un juicio confiable del posible estado de infección de un determinado hato, así que se examinó de que depende la probabilidad de infección de animales individuales en ciertas características específicas, utilizando un modelo de regresión logístico (Tabla 3.8). Las variables incluyeron:

- | | |
|--|------|
| 1. Edad en meses | EDA1 |
| 2. Raza | RAZ1 |
| 3. Sexo | SEX |
| 4. Grado de infestación con garrapatas | ING |

TABLA 3.8 RESULTADOS DE UN ANALISIS DE REGRESION UNIVARIADO DE LAS TASAS DE INFECCION (B. bovis)

Análisis por inclusión

Factores	Coefficiente regresión	ES	Dif. G ²	p
EDA1	-0.010	0.0016	36	<0.001
RAZ1	0.442	0.150	10	0.002
ING	0.025	0.071	0	1
SEX	-0.486	0.145	11	0.001

Desviación sin influencia del factor = 1380

1er. Paso		2o. Paso	
Dif. G ²	p	Dif. G ²	p
13	< 0.001		
2	0.157	1	0.317
1	0.137	1	0.317

Análisis por eliminación

Variable eliminada	Aumento de G ²	p
EDA1	27	<0.001
RAZ1	13	<0.001
ING	1	0.317
SEX	1	0.317

Desviación con todas las variables = 1329

La tasa de infestación con garrapatas se evaluó usando la siguiente clave:

1 = no garrapatas; 2 = <10; 3 = 10 a 50; 4 = >50 garrapatas contadas por animal.

TABLA 3.9 MATRIZ DE CORRELACION DE LAS CUATRO VARIABLES

Factores		(A)	(B)	(C)	(D)
Sexo	(A)	-			
Raza	(B)	0.073	-		
Edad	(C)	0.426	0.067	-	
Infestación con garrapatas	(D)	0.059	0.009	0.107	-

Correspondiendo a los resultados de la regresión lineal múltiple descrita antes, se observaron asociaciones significativas de la edad y la raza del animal individual con el estado de infección. En el primer paso del análisis por inclusión, el sexo también mostró una influencia significativa la cual, sin embargo, desapareció después de la introducción de la variable raza en el modelo. El sexo no mostró influencia en el análisis por eliminación. Por lo tanto, este factor no está correlacionado con el estado de infección sino que más bien viene en superposición con la variable edad, como se puede observar claramente en la matriz de correlación para los cuatro factores (Tabla 3.9).

4. DISCUSION

La presente investigación formó parte de un estudio seccional cruzado diseñado para evaluar la distribución de las infestaciones de babesia (prevalencia), en particular *B. bovis* dentro de la población bovina de Córdoba. Simultáneamente, se investigaron las variaciones en la distribución y las influencias posibles que conducían a estas variaciones.

En la investigación se empleó el método IFAT. No se observaron reacciones positivas falsas en las pruebas de IFAT realizadas anteriormente con antígenos de babesia bovina diferentes a *B. bovis* (reacciones cruzadas) con los materiales utilizados. Esto es contrario a experiencias previas (Bessenger y Schoeneman, 1983; Mueller, 1984; Tropberger, 1987). Una de las razones puede ser el uso de un conjugado diferente (DTAF - en lugar del conjugado FITC) (Blakeslee y Bains, 1967).

La suposición de Goodger et al. (1985) que los auto-antígenos producidos en animales febriles podrían causar reacciones positivas falsas en la prueba IFAT para *B. bovis* no se pudo confirmar cuando se examinaron animales con una variedad de agentes causales de sus reacciones febriles.

Como no se observaron reacciones cruzadas ni reacciones positivas falsas superiores a una dilución de 1/10, se consideraron como positivos aquellos sueros que mostraron una fluorescencia opaca pero distinta de los eritrocitos y de los parásitos intra-eritrocíticos en diluciones superiores a 1/10.

Dentro de la población bovina se encontraron claras diferencias en los niveles de los títulos IFAT según la raza y la edad. En concordancia con Zuerner (1983), se hizo evidente que los terneros reaccionaron a títulos promedios más altos que los animales de 1 año de edad o mayores. Los terneros menores de un año reaccionaron ya sea a diluciones del suero muy bajas o muy altas. En el grupo de animales jóvenes

(> 1 año), la proporción de los que reaccionaron no del todo o a diluciones del suero muy bajas desapareció por completo mientras que el título promedio de los reactores decreció.

En animales mayores de dos años, el título promedio descendió a niveles tan bajos que se hizo difícil la diferenciación entre animales infectados y no infectados. Se puede asumir que este fenómeno puede causar un considerable número de reacciones falsamente juzgadas como negativas. Esto está de acuerdo con la observación hecha por Blewett y Adam (1978b) quienes observaron que, en áreas endémicas para *B. divergens*, los títulos de anticuerpos, después de una infección y a pesar de una reinfección, descienden a un nivel inferior al demostrado por IFAT. Además, Callow et al. (1974) lograron probar que, después de una reducción dramática de los títulos IFAT en animales experimentales (por debajo de 1/30), debida a la eliminación de *B. bovis* mediante quimioterapia, no se perdió la inmunidad.

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, es obvio que la distribución de la edad desempeña un papel fundamental al tratar de establecer la tasa de infección de *B. bovis* a partir de los resultados serológicos de las investigaciones seccionales-cruzadas, en particular si el título discriminante se establece relativamente alto. En realidad, las tasas de infección deberían calcularse sólo con base en los sueros de animales jóvenes. Esto aumentaría considerablemente la confiabilidad de los cálculos de las tasas de inoculación, por lo cual se recomienda de cualquier manera el uso de animales de hasta 9 meses de edad (Friedhoff y Smith, 1981). En este caso, sería justificable nuevamente incrementar el nivel del título discriminante y así reducir el riesgo de interpretaciones erróneas a diluciones bajas del suero.

También se presentó dependencia de los niveles del título en la raza de los animales. Los miembros de las razas *Bos taurus* reaccionaron a diluciones más altas del suero que aquellos de las razas *Bos indicus* o cruces. James et al. (1985) han hecho observaciones similares.

Las tasas de inoculación se calcularon basados en las tasas de infección en terneros entre 4 y 10 meses de edad. No hubo una sola finca entre las 79 incluidas en la investigación donde la tasa de inoculación fuera inferior a 0.005, establecida como el límite para estabilidad endémica en bovinos *Bos taurus* (Friedhoff y Smith, 1981; Smith, 1984). El promedio de las tasas de inoculación para el área fue de 0.0073 (Figura 3.5) y las tasas de infección para terneros de 4 a 7 meses estuvieron bien por encima del límite que garantiza un estado de estabilidad endémica. En los tres grupos de mayor edad (8, 9 y 10 meses), las dos tasas fueron muy próximas entre sí, aunque no se sobrepasó la línea crítica de 0.005 para la tasa de inoculación. Más aún, es probable que, a medida que aumente la edad de los terneros, se incremente la proporción de reacciones falsas negativas y se subestime el porcentaje real de los animales seropositivos.

En general, se puede afirmar que existe estabilidad endémica en lo que se refiere a la infección de *B. bovis* en Córdoba, lo cual no significa, sin embargo, que no existan excepciones a la regla, o que la inestabilidad endémica no podría irrumpir en ciertas localidades y bajo ciertas circunstancias. Para determinar éstas y la influencia que algunas variables podrían tener en la frecuencia de la infección, se realizó análisis de regresión, con los siguientes resultados:

- la tasa de infección en el total de 1191 animales incluidos en la investigación fue 73.8%,
- se confirmó que los factores edad y raza ocasionaron una desviación significativa de la distribución normal. Animales de mayor edad y aquellos Cebú o cruces de Cebú se encontraron seropositivos con menor frecuencia, como también lo observaron Utech y Wharton (1982).

- las tasas de infección fueron significativamente más bajas en bovinos de las fincas localizadas cerca a los ríos Sinú, San Jorge y Cauca donde el habitat de las garrapatas a lo largo de los bancos está sujeto a inundaciones,
- las tasas de infección también fueron significativamente más bajas en las fincas ubicadas al norte de Córdoba. Las diferencias en cantidad de precipitación pluvial (aumentando de norte a sur) pudieron haber tenido una influencia a este respecto. Sin embargo, en este caso, también se debería esperar que la proximidad de la finca al pantano ejerciera alguna influencia, lo cual no se confirmó en los varios modelos de regresión aplicados. Por otra parte, debe admitirse que la clasificación de las fincas en aquellas cerca a y otras distantes de los pantanos es un poco problemática. Existen grandes áreas en Córdoba cubiertas por éstos que no se indican exactamente en los mapas, mientras que otras que se muestran han sido drenadas (Otte, 1989) y hay muchas áreas próximas a ríos más pequeños y arroyos que se convierten en pantanos durante las lluvias y permanecen así por un tiempo considerable después de haber cesado éstas,
- las tasas de infección para *B. bovis* también aumentaron significativamente con la frecuencia de los tratamientos con acaricidas durante el verano. Esta correlación aparentemente absurda se explica por el hecho de no seguir los ganaderos patrones establecidos y premeditados de tratamientos del hato, sino que lo hacen inducidos por el grado de intensidad de la infestación con garrapatas que ellos observan en sus animales. Esto está condicionado por la época del año (verano en particular) y por el área también. En general, la frecuencia del tratamiento puede tomarse como una medida de la intensidad de la infestación con *B. microplus* al igual que del grado de eficacia del control de garrapatas aplicado en la región. No hay razón para esperar que el control de las garrapatas podría estar interfiriendo con el estado general de estabilidad endémica,
- las tasas de infección no estuvieron influenciadas por las tasas de infestación con garrapatas contadas el día en que se tomó la muestra, como era de esperarse, ya que había muchos otros factores interfiriendo (época del año, tiempo desde el último tratamiento con acaricidas, etc.),
- las tasas de infección estuvieron significativamente influenciadas por el sistema de manejo del pasto: fueron más altas en las fincas donde se practicaba pastoreo rotacional que en el resto. No se puede ofrecer explicación alguna para este fenómeno,
- se puede esperar que las tasas de infección con *B. bigemina* en el área sean por lo menos similares si no más altas que aquellas para *B. bovis*. *B. bigemina* comparte la garrapata vector con *B. bovis* y tiene la ventaja de una forma vertical de infección dentro de los varios estadios de desarrollo de la garrapata, de tal manera que la tasa de infección de poblaciones de garrapatas con *B. bigemina* es mucho más elevada que aquella con *B. bovis* (Friedhoff, 1988). Corrier (1977) encontró una tasa de infección (FC) para *B. bigemina* de 77% en 232 bovinos en la región de la costa norte de Colombia. Tropberger (1987) observó tasas de inoculación más altas para *B. bigemina* que para *B. bovis* en 12 fincas en la misma región.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo con el modelo epidemiológico de Mahoney y Ross (1972), la situación de la población bovina de Córdoba en lo que concierne a *B. bovis* se puede considerar como estable endémicamente. Todas las tasas de inoculación, calculadas con base en las tasas de infección de terneros entre 4 y 10 meses de edad sobrepasaron el límite de 0.005 calculado para animales *Bos taurus* (Friedhoff y Smith, 1981). Hasta ahora parece no haberse calculado un límite correspondiente para animales Cebú y para cruces Cebú/*Bos taurus*. Probablemente estaría por debajo de 0.005.

La posibilidad de tasas de inoculación en Córdoba decayendo por debajo del límite de 0.005 -ya sea transitoriamente o por períodos prolongados- no necesariamente significa que haya surgido una inestabilidad endémica, dada la estructura genética de los hatos en el departamento, que consiste en gran parte de animales Cebú x Criollo, con una clara dominancia -a juzgar por el fenotipo de los animales- de genes Cebú. La situación es, por supuesto, diferente en los relativamente pocos hatos con niveles altos de genes *Bos taurus*, cuyo número es probable que aumente en el futuro, si persiste la tendencia actual de hacer énfasis en la producción de leche y por lo tanto la necesidad de intensificar el manejo. El control de garrapatas mediante el tratamiento con acaricidas ya en la actualidad, por fuerza, es mucho más intensivo en éstas que en las fincas orientadas en una forma más tradicional y algunas de ellas, como lo demostró Nowak (1990), están en un estado de inestabilidad endémica y a un riesgo muy real de pérdidas considerables si fallara su sistema de control de garrapatas. Es obvio que un desarrollo que inevitablemente conduce a niveles de susceptibilidad más altos para enfermedades transmitidas por garrapatas en bovinos de Córdoba, debería estar acompañado por servicios capaces de monitorear prácticamente la situación de estabilidad endémica y posiblemente, por la disponibilidad de vacunación.

6. RESUMEN

Se estudió la seroepidemiología de las infecciones con *B. bovis* en el departamento de Córdoba y áreas adyacentes en el noroccidente de Colombia, utilizando la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT).

Una encuesta que incluyó 1191 muestras de suero de 79 fincas mostró una tasa total de infección de 73.4%.

Las tasas de inoculación en las varias fincas, con base en las tasas de infección determinadas en terneros de 4 a 10 meses de edad oscilaron entre 0.005 y 0.009 y así fueron claramente (si no mucho) por arriba del límite fijado para la estabilidad endémica en bovinos *Bos taurus*.

Las tasas de prevalencia aumentaron de norte a sur en el departamento ($p = 0.0477$). Las tasas seropositivas fueron significativamente más altas en los animales jóvenes que en los adultos ($p < 0.001$), más elevada en bovinos predominantemente *Bos taurus* que en los de raza Cebú y cruces ($p = 0.006$); en las fincas con sistema rotacional de pastoreo ($p < 0.001$) y en las fincas con una alta frecuencia de tratamientos con acaricidas ($p = 0.0005$). Las tasas de infección en las fincas ubicadas a una distancia > 10 km de uno de los ríos más grandes (Sinú, San Jorge, Cauca) fueron más altas que en las restantes del departamento ($p = 0.054$ en la prueba χ^2 y < 0.001 en el análisis logístico de regresión).

No se presentaron reacciones cruzadas en la prueba IFAT cuando el antígeno de *B. bovis* utilizado en esta prueba frente a los sueros de Córdoba se analizó frente a los sueros de referencia con anticuerpos para *A. marginale*, *B. bigemina* y *B. divergens*.

No ocurrieron reacciones falsas positivas en la prueba IFAT cuando el antígeno *B. bovis* utilizado se probó frente a sueros de 31 bovinos alemanes negativos que recientemente habían sufrido un período febril (> 39 grados C durante más de tres días).

**III. SEROEPIDEMIOLOGIA DE LAS INFECCIONES POR BABESIA Y
ANAPLASMA BOVINOS EN COLOMBIA:**

**ESTUDIOS LONGITUDINALES EN TERNEROS EN ALGUNAS FINCAS
SELECCIONADAS**

Por

Gerhard Tropberger

**Extractado de: Seroepidemiologie der bovinen Babesien- und
Anaplasmeninfektionen in Kolumbie: III. Verlaufsuntersuchungen an
Jungtieren einiger selektierter Bestaende. Dissertation, Hannover 1987.**

INDICE DE CONTENIDO

	Página
1. MATERIALES Y METODOS	63
1.1 Animales experimentales	63
1.2 Cepas de hemoparásitos	63
1.2.1 Babesia bovis	63
1.2.2 Babesia bigemina	63
1.3 Antígenos	63
1.3.1 Anaplasma marginale	63
1.3.2 Babesia	63
1.4 Sueros y antisueros	64
1.4.1 Sueros de referencia negativos	64
1.4.2 Sueros de referencia positivos	64
1.4.3 Sueros colombianos	64
1.4.4 Conjugado	64
1.5 Métodos	64
1.5.1 Preparación de antígenos para IFAT	64
1.5.2 Ejecución de las pruebas serológicas	64
1.5.2.1 Fijación del complemento (FC)	64
1.5.2.2 Prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT)	65
1.5.2.3 Evaluación de los resultados serológicos	65
1.5.2.4 Comparación de los antígenos de B. bovis (Lismore) y B. bovis (Chinú)	65
2. RESULTADOS DE LAS INVESTIGACIONES DE CAMPO	66
2.1 Determinación de las tasas de infección e inoculación	66
2.2 Distribución de las seroconversiones	67
2.3 Distribución de las seroconversiones durante el período de la investigación	69
2.4 Anticuerpos durante el primer mes de vida	71
2.5 Resultados de la comparación de los antígenos de B. bovis	71
2.6 Comparación de los resultados de la prueba de fijación del complemento y microscópicos para A. marginale	72
2.7 Comparación de los resultados de la prueba IFAT y las tasas de parasitemia para B. bovis	72
2.8 Comparación de los resultados de la prueba IFAT y las tasas de parasitemia para B. bigemina	73
2.9 Resultados de los recuentos de garrapatas	73
2.10 Ganancia mensual de peso	74
2.11 Niveles de hematocrito	74
2.12 Ocurrencia de infecciones múltiples	77

3.	DISCUSION	77
3.1	Prevalencia	77
3.2	Anticuerpos maternos	78
3.3	Comparación de los antígenos	79
3.4	Incidencia	79
3.5	Tasas de Inoculación e Infección	79
4.	RESUMEN	80

INDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 2.1	Tasas de inoculación/infección en 11 fincas 66
TABLA 2.2	Ocurrencia de anticuerpos durante el primer mes de vida 70
TABLA 2.3	Resultados de la comparación de los antígenos (Lismore y Chinú) 71
TABLA 2.4	Comparación de los resultados de la prueba de FC y de los exámenes microscópicos para B. bovis 72
TABLA 2.5	Comparación de los resultados de la prueba IFAT y de los exámenes microscópicos para B. bovis 73
TABLA 2.6	Comparación de los resultados de la prueba IFAT y de los exámenes microscópicos para B. bigemina 74
TABLA 2.7	Infecciones solas y múltiples 77
TABLA 3.1	Prevalencia de A. marginale, B. bovis y B. bigemina 78

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1	Frecuencias relativas acumuladas de seroconversiones 67
FIGURA 2	Frecuencia relativa acumulada de seroconversiones según razas 68
FIGURA 3	Frecuencia absoluta de seroconversiones 69
FIGURA 4	Frecuencia relativa de animales con > garrapatas 75
FIGURA 5	Promedio ganancia mensual de peso 75
FIGURA 6	Valores del hematocrito según la edad y la raza76
FIGURA 7	Hematocrito según la época del año y la raza76

INTRODUCCION

La presente investigación se basó en los datos disponibles obtenidos en un estudio longitudinal realizado dentro del marco de trabajo de un estudio exhaustivo sobre las principales limitantes de la producción bovina en Córdoba, con particular referencia a las infecciones por babesia y anaplasma. Este tuvo como propósito lograr una conclusión de la situación epidemiológica de los dos géneros de hemoparásitos involucrados, utilizando sueros exclusivamente de terneros.

1. MATERIALES Y METODOS

1.1 Animales experimentales

Para la infección experimental se proporcionaron cuatro novillas Holstein criadas y levantadas en el norte de Alemania, entre 8 y 9 meses de edad y con peso de 90 a 150 kg. Dos de ellas habían sido esplenectomizadas.

1.2 Cepas de hemoparásitos

1.2.1 Babesia bovis

Se utilizó la cepa Lismore de Australia, descrita por Mahoney y Wright (1976) y a la cual se le habían efectuado tres pasajes en Hannover. Además, se puso a disposición una cepa de *B. bovis* proveniente de un hato de Chinú, Córdoba, Colombia, aislada de garrapatas (*Boophilus microplus*) enviada a Hannover.

1.2.2 Babesia bigemina

Este organismo se aisló en Hannover de la misma colección de garrapatas arriba mencionada, enviada desde Colombia y recolectada en una finca localizada en Chinú, Córdoba.

1.3 Antígenos

1.3.1 Anaplasma marginale

Se recibieron dos antígenos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en Ames, Iowa, para la fijación del complemento. Ambos (lotes Nos. SN 1418401 y SN 1418601) tenían un título de 1/40.

1.3.2 Babesia

Se prepararon antígenos para las pruebas indirectas de anticuerpos fluorescentes de *B. bigemina* y *B. bovis* a partir de la cepa Lismore (Australia) y las dos cepas de Chinú (Córdoba), empleando la técnica

modificada descrita por Mueller (1984).

1.4 Sueros y antisueros

1.4.1 Sueros de referencia negativos

Como sueros de referencia negativos se emplearon 31 sueros de bovinos obtenidos en fincas localizadas en el norte de Alemania, donde no hay ocurrencia natural de los tres hemoparásitos en cuestión; además sueros de animales experimentales del Instituto de Parasitología que no habían sido aún utilizados para inoculación. Un suero adicional de referencia negativo se obtuvo del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (lote No. SN 42 N 8301).

1.4.2 Sueros de referencia positivos

Los sueros de referencia positivos se obtuvieron de dos de los animales experimentales mencionados anteriormente, después de haberlos infectado con *B. bovis* y *B. bigemina*. Además, USDA había puesto a disposición tres sueros de referencia positivos para *A. marginale* (lotes Nos. SN 142 H 8213, SN 142 M 8212, SN 142 L 8601).

1.4.3 Sueros colombianos

Durante un estudio de monitoreo (longitudinal), el grupo de trabajo del Proyecto había tomado muestras de sangre en 12 fincas del área a intervalos mensuales. Para la presente investigación se proporcionó un total de 1.130 sueros (entre 4 y 8 sueros por animal) de 191 terneros y novillas, al igual que los datos generales y antecedentes especiales de las fincas y de los bovinos en cuestión (sexo, edad, tasas de parasitemia, tasas de infestación con garrapatas, peso, raza, etc.).

1.4.4 Conjugado

El conjugado utilizado para IFAT fue IgG antibovino de conejos, unido con fluoresceinisoitiocyanato (FITC). La tasa molar F/P fue 0.9.

1.5 Métodos

1.5.1 Preparación de antígenos para IFAT

Los antígenos para IFAT de *B. bigemina*, *B. bovis* (Australia) y *B. bovis* (Colombia) se prepararon según Zuerner (1983) y Mueller (1984).

1.5.2 Ejecución de las pruebas serológicas

1.5.2.1 Fijación del complemento (FC)

La fijación del complemento se realizó de acuerdo con las normas editadas por el Departamento de Salud, Educación y Bienestar de los Estados Unidos (Anon., 1974). Las reacciones a una dilución del suero de

1:5 se denominaron como "negativas", "trazas" (= sospechosas) y 1, 2, 3 y 4 para los diferentes grados de intensidad de las reacciones positivas.

1.5.2.2 Prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT)

Se utilizó el método descrito por Zuerner (1983) y se aplicó la siguiente clave para la evaluación de los resultados:

0 = no fluorescencia

t = fluorescencia sin brillo de parte del parásito ("trazas").

1 = fluorescencia sin brillo de todo el parásito

2 = fluorescencia moderada de las áreas marginales, en el caso de *B. bovis* también del eritrocito.

3 = fluorescencia brillante de todo el parásito, en el caso de *B. bovis* también del eritrocito.

Todos los sueros se sometieron a doble examen.

La titulación de los sueros conocidos como negativos y los sueros de referencia de *B. bovis* y *B. bigemina* demostraron reacciones cruzadas hasta títulos de 1/40 (antígeno de *B. bigemina*) y de 1/20 (ambos antígenos de *B. bovis*). En consecuencia se examinaron los sueros para anticuerpos de *B. bigemina* a diluciones de 1/80 y 1/320 y para *B. bovis* a diluciones de 1/40 y 1/160 con ambos antígenos. Se consideraron positivos cuando las reacciones a las diluciones más bajas fueron ambas 1 o superiores; sospechosas si mostraban la combinación de 1 con negativo o trazas.

La prueba para anticuerpos de *B. bovis* se realizó al principio con el antígeno derivado de la cepa australiana Lismore. Los sueros que se consideraron negativos o sospechosos al efectuar el análisis con este antígeno se examinaron con el antígeno colombiano (Chinú).

1.5.2.3 Evaluación de los resultados serológicos

Las tasas serológicas de infección (proporción de animales seropositivos de un cierto grupo de edad dentro de una población) se compararon con las tasas de parasitemia (proporción de animales en el mismo grupo con parasitemias demostrables en los frotis delgados).

Las tasas de inoculación se determinaron con base en la primer muestra de suero obtenida después de haber cumplido seis meses de edad, debido a que éste era el grupo del cual se disponía del mayor número de sueros. El cálculo, por lo tanto, se basó en $t = 180$ días. Se asumió que había tenido lugar una seroconversión cuando, independientemente de la edad de los animales, se había observado una secuencia de más de un negativo seguida por más de 7 resultados positivos en un determinado animal.

1.5.2.4 Comparación de los antígenos de *B. bovis* (Lismore) y de *B. bovis* (Chinú)

Para la realización de esta comparación, se examinaron 50 sueros tres veces cada uno con ambos antígenos y luego se calculó el promedio geométrico para el título recíproco de IFAT.

2. RESULTADOS DE LAS INVESTIGACIONES DE CAMPO

2.1 Determinación de las tasas de infección e inoculación

En la Tabla 2.1 se resumen los resultados. No se calcularon las tasas de infección e inoculación para el hato No.7 debido a que la muestra era pequeña.

TABLA 2.1 TASAS DE INOCULACION/INFECCION EN 11 FINCAS

Finca No.	B. bovis		B. bigemina		A. marginale	
	pos./n	h	pos./n	h	pos./n	Relación
1	5/13	0.0027	9/13	0.00655	10/13	0.77
2	9/18	0.00385	17/18	0.01606	12/18	0.67
3	10/12	0.00995	12/12	>1	10/12	0.83
4	10/11	0.01332	9/10	0.01279	6/11	0.55
6	3/15	0.00124	16/17	0.01574	9/16	0.56
7	5/7	n.c.	7/7	n.c.	5/7	n.c.
8	11/12	0.01381	12/12	>1	12/13	0.92
11	8/18	0.00327	17/18	0.01606	12/18	0.67
12	7/11	0.00562	11/12	0.01381	11/12	0.92
14	11/13	0.0104	12/13	0.01425	9/13	0.69
15	9/11	0.00947	11/11	>1	7/11	0.64
16	3/17	0.00108	17/17	>1	12/17	0.71

pos./n = Animales positivos (IFAT/CFT) hasta su 6o. mes de vida/n

h = tasa de inoculación n.c. = no calculado

Relación = reactores positivos/n como cifra decimal

El primer paso en éste cálculo fue examinar las tasas de infección para su distribución (prueba Lilliefors), obteniéndose como resultado que estaban distribuidas normalmente para *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* ($p = 0.95$). Las tasas de infección para *B. bigemina* y *A. marginale* fueron altas y las cifras próximas entre sí. La situación fue muy diferente en el caso de *B. bovis*. Aquí, las tasas de infección e inoculación fueron considerablemente bajas y se distinguieron dos grupos. El primero estaba conformado por los hatos 1, 2, 6, 11 y 16 con tasas de inoculación inferiores a 0.005 (el límite para la estabilidad endémica). El segundo grupo lo configuraban los hatos 3, 4, 8, 14 y 15 con tasas de inoculación > 0.005 ; el hato 12 estaba en medio de estos dos grupos.

Al comparar el número de animales que, hasta su 6o. mes de vida, presentaban seroconversión para *B. bovis*, se hicieron evidentes diferencias altamente significativas ($p < 0.001$, tabla de contingencia) entre estos dos grupos, el primero de los cuales era predominantemente Cebú x Criollo, mientras el segundo había sido sometido a algún mejoramiento genético con razas exóticas *Bos taurus*. Por ejemplo fue

posible demostrar correlaciones estadísticamente significativas entre la mortalidad de terneros durante la época seca y las tasas de inoculación de *B. bovis* ($r = 0.55$); entre las tasas de mortalidad de las novillas durante el verano y el invierno con las tasas de inoculación de *B. bigemina* (verano, $r = 0.79$; invierno, $r = 0.76$); y las tasas de mortalidad de vacas en la época de lluvia con las tasas de inoculación para ambas babesias (*B. bovis*, $r = 0.81$; *B. bigemina*, $r = 0.70$). Además, se pudieron demostrar correlaciones negativas entre la mortalidad de novillas y la frecuencia de tratamientos con acaricidas (verano, $r = 0.43$; invierno, $r = 0.48$), y entre la infestación con garrapatas y la ganancia de peso en el período seco ($r = 0.56$).

2.2 Distribución de las seroconversiones

La distribución de puntos en tiempo cuando tuvieron lugar las seroconversiones se demuestra en la Figura 1. Las de *B. bovis* ocurrieron relativamente tarde, acumulándose durante el 60. mes de vida de los terneros, mientras que las de *B. bigemina* y *A. marginale* se concentraron en el cuarto y quinto mes. Estas observaciones fueron corroboradas estadísticamente (Prueba de la Mediana): las seroconversiones de *B. bovis* se efectuaron significativamente más tarde ($p < 0.001$) que aquellas de *B. bigemina* y *A. marginale*. La distribución de las seroconversiones en los casos de los últimos dos hemoparásitos no fue significativamente diferente.

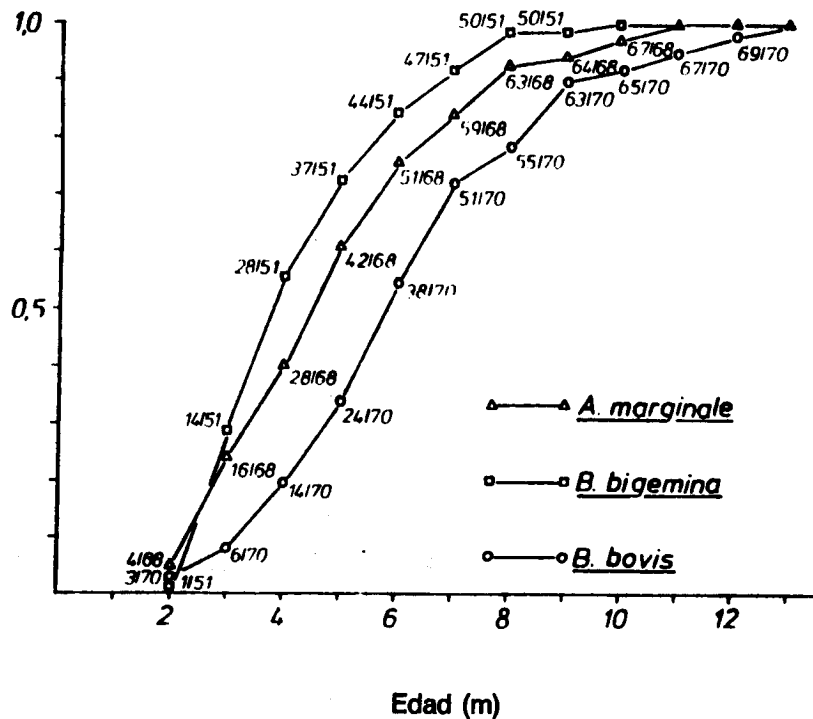


FIGURA 1 FRECUENCIAS RELATIVAS ACUMULADAS DE SEROCONVERSIONES
 $x/n = \text{seroconversiones/no. total de animales}$

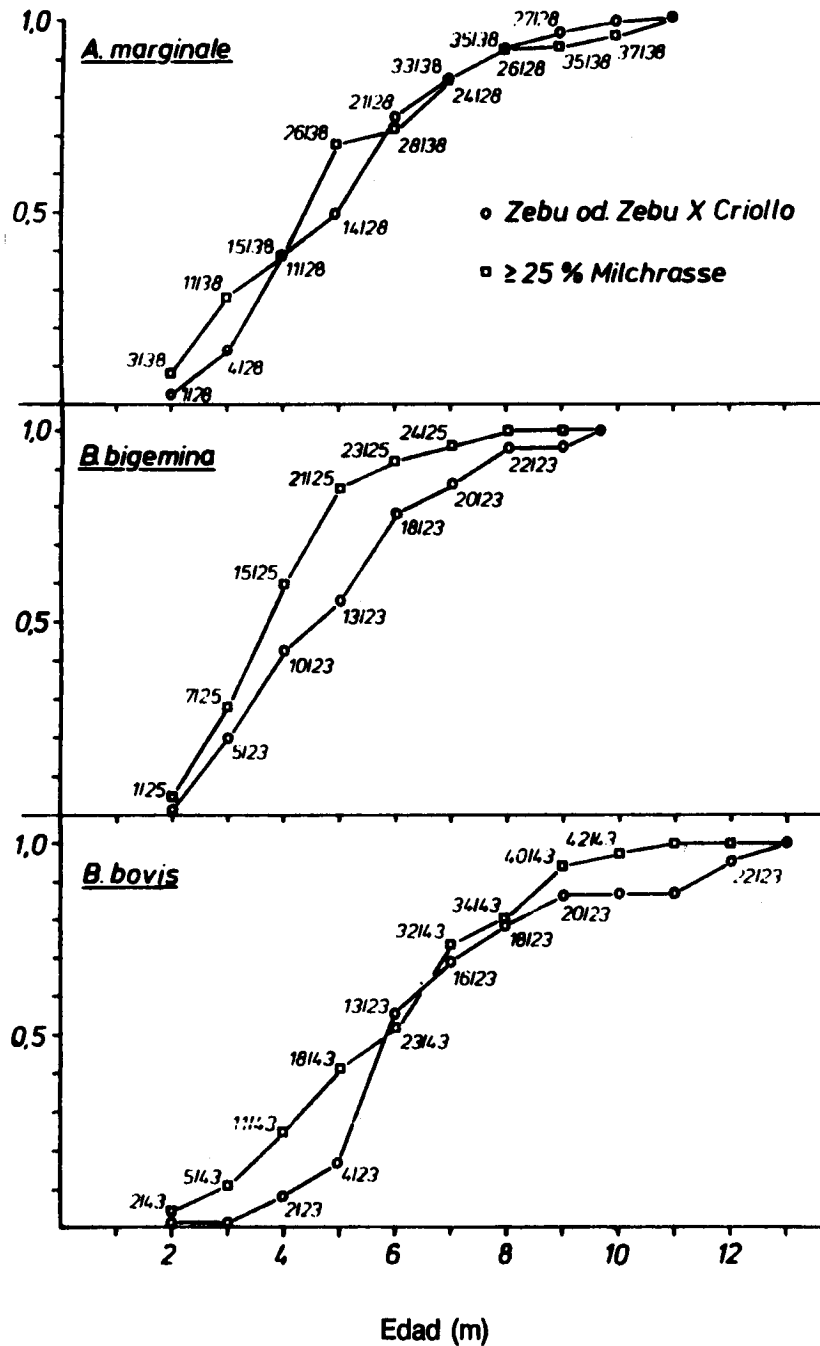


FIGURA 2 FRECUENCIA RELATIVA ACUMULADA DE SEROCONVERSIONES SEGUN RAZAS
 $x/n = \text{seroconversiones/no. total de animales}$
 $\% \text{ milchrasse} = \% \text{ genes exóticos}$

Considerando la distribución de las seroconversiones según las razas, (Figura 2), las infecciones con *B. bigemina* y *B. bovis* parecen haber tenido lugar más tarde en los animales Cebú/Criollo que en los que tenían > 25% de genes *Bos taurus*. A este respecto fue posible demostrar para *B. bovis* más no para *B. bigemina* una diferencia significativa ($p = 0.044$).

2.3 Distribución de seroconversiones durante el período de la investigación

En la Figura 3 se muestra la distribución de seroconversiones durante el período de la investigación. El número de éstas aumentó con la elevación de las tasas de infestación por garrapatas (Figura 4). En el caso de *B. bigemina* y *B. bovis* alcanzaron su pico en octubre junto con aquel de la infestación con garrapatas, aquellas para *A. marginale* lograron su culminación ya en agosto.

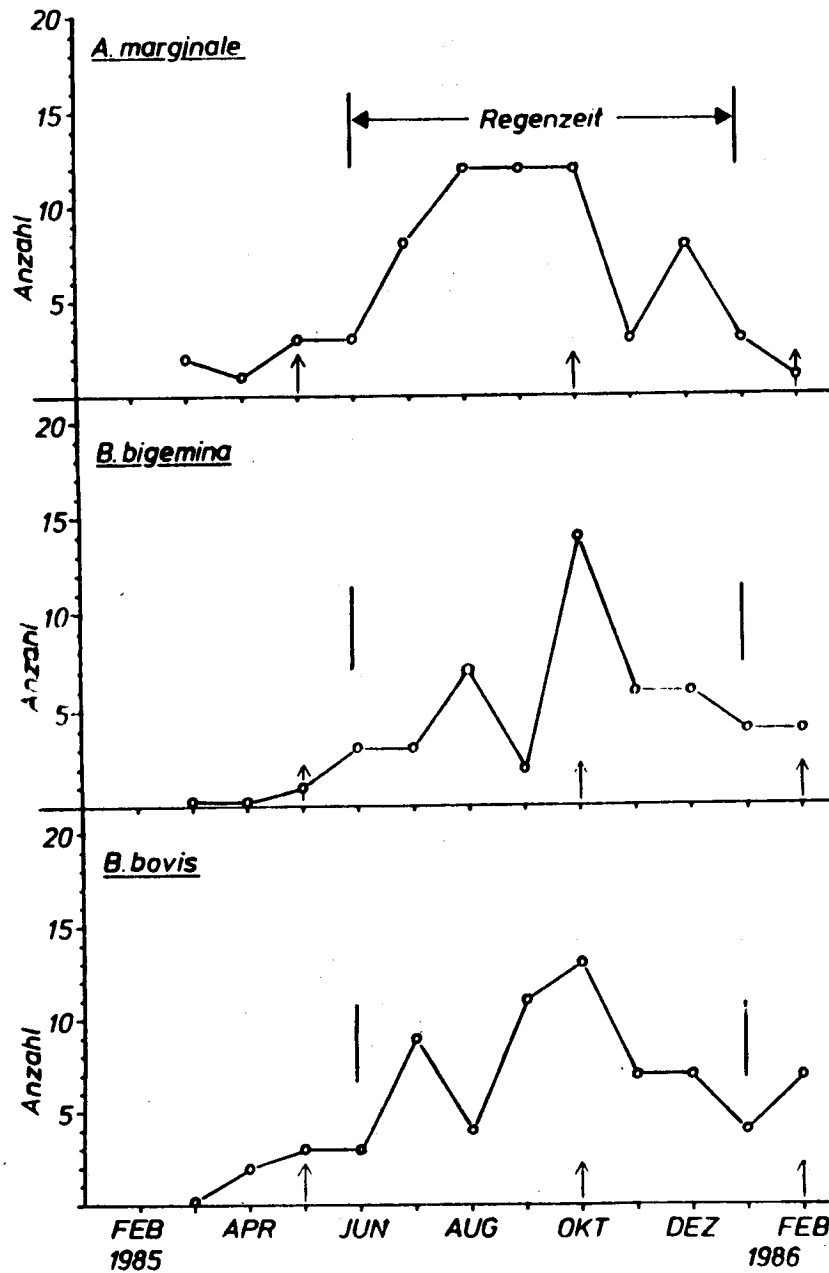


FIGURA 3 FRECUENCIA ABSOLUTA DE SEROCONVERSIONES
 flecha = niveles pico de infestación con garrapatas
 regenzeit = época de lluvias

TABLA 2.2 OCURRENCIA DE ANTICUERPOS DURANTE EL PRIMER MES DE VIDA

Finca No.	Animal No.	Edad meses	B.bovis IFAT	B.bigemina IFAT	A.marginale FC
1	086	1	+	+/-	+
	138	1	+	+	-
2	025	1	-	-	+/-
	070	1	+	-	+/-
	071	1	-	-	-
3	077	1	+	+/-	-
4	084	1	+	-	+
	085	1	+	-	-
6	071	1	-	-	+
	073	1	-	+	-
8	065	1	+	-	+/-
12	058	1	-	-	-
14	064	1	-	-	-
	066	1	-	-	-
	067	1	-	-	-
	068	1	+	-	-
	069	1	+/-	+/-	+/-
	070	1	+	+/-	-
15	047	1	-	-	-
	064	1	+	+	+
	067	1	-	-	-
16	067	1	-	+	+
	073	1	-	-	-
	075	1	-	-	-

+ = positivo - = negativo +/- = sospechoso vacío = no hay título disponible

El análisis estadístico (t-test) para averiguar posibles diferencias en la frecuencia de las seroconversiones entre las épocas de verano y de invierno de 1985 dió como resultado diferencias significativas ($p = 0.013$ en el caso de *B. bovis*, $p = 0.026$ para *B. bigemina* y 0.016 para *A. marginale*) a favor del período de lluvias. Sólo se pudo demostrar una pequeña diferencia entre los meses de verano comprendidos entre

enero/febrero, 1986 y la época de lluvias anterior en 1985 en el caso de *A. marginale* ($p = 0.038$). Sin embargo, en las seroconversiones para *B. bovis* se presentaron diferencias significativas en julio ($p = 0.006$) y en septiembre ($p = 0.007$) de 1985 y para *A. marginale* en agosto, 1985 ($p = 0.0001$); para *B. bigemina* se registró un incremento significativo en junio, 1985 ($p = 0.022$).

2.4 Anticuerpos durante el primer mes de vida

Se demostró la ocurrencia de anticuerpos contra *B. bovis* en la sangre de 10 de 24 terneros durante el primer mes de vida; un animal mostró una reacción sospechosa. En el caso de *B. bigemina*, se observaron cuatro reacciones seropositivas y tres sospechosas entre los 24 terneros, en el caso de *A. marginale* la relación fue cinco reactores seropositivos y cinco sospechosos (Tabla 2.2).

2.5 Resultados de la comparación de los antígenos de *B. bovis*

En la Tabla 2.3 se presentan los resultados de las pruebas efectuadas para comparar los antígenos preparados a partir de las cepas australiana (Lismore) y la colombiana (Chinú). Los títulos en el (muy probablemente) sistema homólogo (cepa Chinú antígeno/suero de Córdoba) son, sin excepción, iguales o más altos (hasta 4 diluciones) que aquellos en el sistema heterólogo (antígeno australiano/sueros de Córdoba).

TABLA 2.3 RESULTADOS DE LA COMPARACION DE LOS ANTIGENOS (Lismore y Chinú)

Títulos recíprocos de IFAT					
Antígeno Chinú	Antígeno Lismore				
	0	1-40	41-80	81-160	161-320
0	14	-	-	-	-
1-40	3	-	-	-	-
41-80	-	2	-	-	-
81-160	-	2	3	2	-
161-320	-	1	10	4	1
321-640	-	1	2	3	5
>640	-	-	-	1	-

Título recíproco de IFAT: promedio geométrico de tres pruebas cada uno

2.6 Comparación de los resultados de la prueba de Fijación del complemento y microscópicos para *A. marginale*

En la Tabla 2.4 se presenta una comparación de los resultados de las reacciones a la prueba de fijación del complemento y de los exámenes microscópicos. Se consideró la existencia de parasitemia sólo cuando se encontraron más de 10 eritrocitos parasitados entre un total de 10^5 . Los hallazgos microscópicos y los resultados de la FC concordaron en 55% de los animales; se observó divergencia en 45% pero únicamente en 6.3% de los casos se encontró *A. marginale* en el frotis aunque el animal no (o no aún?) reaccionó positivamente a la FC.

TABLA 2.4 COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA DE FC Y DE LOS EXAMENES MICROSCOPICOS PARA *A. marginale*

Hato No.	Reacción FC/frotis delgado				Tasa parasitemia positiva/n	Relación
	+/+	-/-	+/-	-/+		
1	7	2	6	0	9/15	0.60
2	7	3	10	1	8/21	0.38
3	7	1	3	1	8/12	0.66
4	7	0	5	1	8/13	0.62
6	8	3	6	1	9/18	0.50
7	4	1	2	0	4/7	0.57
8	11	0	5	0	11/16	0.69
11	1	2	15	1	2/19	0.11
12	8	0	6	0	8/14	0.57
14	3	5	9	1	4/18	0.22
15	8	5	1	4	12/18	0.66
16	8	3	6	2	10/19	0.53
Total	79	25	74	12	93/190	0.49
%	41.6	13.2	38.9	6.3		

2.7 Comparación de los resultados de la prueba IFAT y las tasas de parasitemia para *B. bovis*

En la Tabla 2.5 se presentan los resultados de las pruebas serológicas y aquellos de los exámenes microscópicos para parasitemias de *B. bovis*. Se presentó disparidad entre éstos en 52.4% de los animales; en 45% de los casos los animales resultaron positivos a la prueba IFAT y no presentaron parasitemias, lo cual no es sorprendente conociendo las características de la infección de *B. bovis*.

TABLA 2.5 COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA IFAT Y DE LOS EXAMENES MICROSCOPICOS PARA B. bovis

Hato No.	Reacción IFAT/frotis delgados				Tasa parasitemia positiva/n	Relación
	+/+	-/-	+/-	-/+		
1	0	8	5	2	2/15	0.13
2	6	0	14	0	6/20	0.30
3	3	1	8	0	3/12	0.25
4	9	0	4	0	9/13	0.69
6	2	7	5	4	6/18	0.33
7	3	0	4	0	3/7	n.c.
8	14	0	2	0	14/16	0.88
11	4	4	10	1	5/19	0.26
12	5	1	7	1	6/14	0.43
14	4	2	12	0	4/18	0.22
15	6	1	11	0	6/18	0.33
16	2	8	3	6	8/19	0.42
Total	58	32	85	14	72/189	0.38
%	30.7	16.9	45.0	7.4		

positivo/n = animales positivos microscopio/total animales examinados

n.c. = no calculada, muestra pequeña

2.8 Comparación de los resultados de la prueba IFAT y las tasas de parasitemia para B. bigemina

En la Tabla 2.6 se presentan los resultados de las pruebas IFAT y de los exámenes microscópicos para B. bigemina. En este caso, se observó disparidad entre los dos resultados sólo en 12.7% de los análisis.

2.9 Resultados de los recuentos de garrapatas

Las infestaciones con garrapatas en bovinos se determinaron efectuando el recuento de hembras adultas ingurgitadas de B. microplus (> 5 mm de longitud). Los resultados se presentan en la Figura 4. Se observaron tres picos en las infestaciones: uno en mayo, 1985, uno en octubre, 1985 y otro en febrero, 1986.

TABLA 2.6 COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA IFAT Y DE LOS EXAMENES MICROSCOPICOS PARA *B. bigemina*

Hato No.	Reacción IFAT/frotis delgados				Tasa Parasitemia positiva/n	Relación
	+ / +	- / -	+ / -	- / +		
1	5	3	7	0	5/15	0.33
2	18	0	1	1	19/20	0.95
3	11	0	1	0	11/12	0.93
4	13	0	0	0	13/13	1.00
6	18	0	0	0	18/18	1.00
7	7	0	0	0	7/7	n.c.
8	15	0	0	1	16/16	0.94
11	16	0	2	1	17/19	0.89
12	14	0	0	0	14/14	1.00
14	13	0	4	1	14/18	0.78
15	14	0	4	0	14/18	0.78
16	18	0	1	0	18/19	0.95
Total	162	3	20	4	166/189	0.88
%	85.7	1.6	10.6	2.1		

positiva/n = animales positivos microscopio/total animales examinados

n.c. = no calculada, muestra pequeña

2.10 Ganancia mensual de peso

En la Figura 5 se presenta la ganancia mensual de peso de los animales bajo consideración. Después de unas cifras inicialmente bajas durante marzo, abril y mayo, 1985, se observaron marcados incrementos en la ganancia de peso a principios del invierno en junio, persistiendo en los meses de julio y agosto. Después de ésto, las cifras de la ganancia de peso retornaron a los niveles bajos encontrados anteriormente.

2.11 Niveles de hematocrito

Al analizar los datos de los niveles mensuales del hematocrito de los animales, surgió el siguiente cuadro (Figuras 6 y 7): los bovinos con un porcentaje de genes exóticos de *Bos taurus* superior al 25% presentaron durante todo el período de la investigación niveles de hematocrito significativamente más bajos que aquellos con niveles altos de genes *Bos indicus* ($p < 0.001$). Por otra parte, los niveles del hematocrito decayeron significativamente ($p = 0.004$) en animales Cebú/Criollos entre julio y agosto y se incrementaron ligeramente de nuevo hasta diciembre, mientras la evolución correspondiente en los bovinos con influencia *Bos taurus* fue casi a la inversa. Los niveles del hematocrito aumentaron significativamente hasta julio ($p = 0.002$) y luego descendieron ligeramente hasta octubre y en forma más marcada hasta febrero.

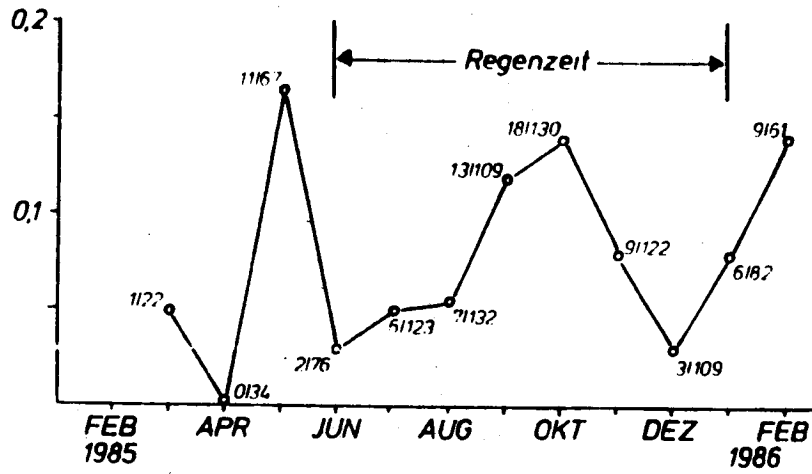


FIGURA 4 FRECUENCIA RELATIVA DE ANIMALES CON > 10 GARRAPATAS
 $x/n = \text{animales con } > 10 \text{ garrapatas/no. total de animales}$

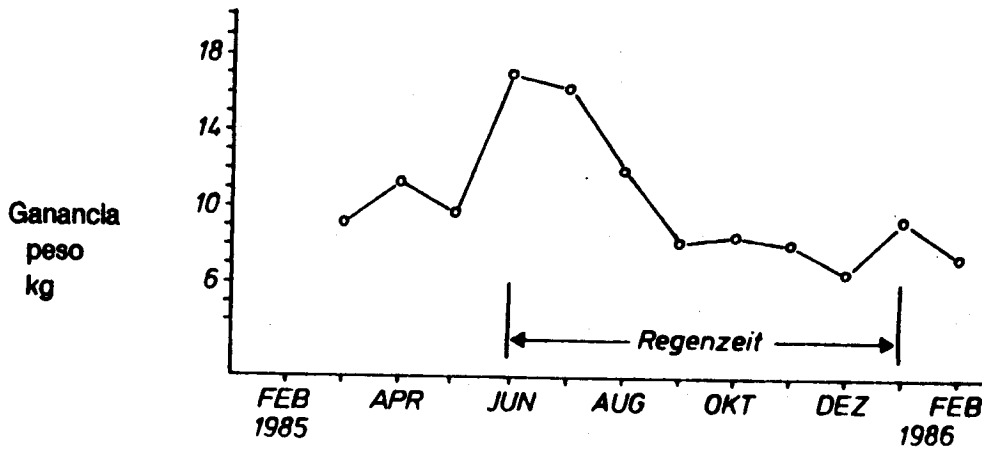


FIGURA 5 PROMEDIO GANANCIA MENSUAL DE PESO
 regenzeit = época de lluvias

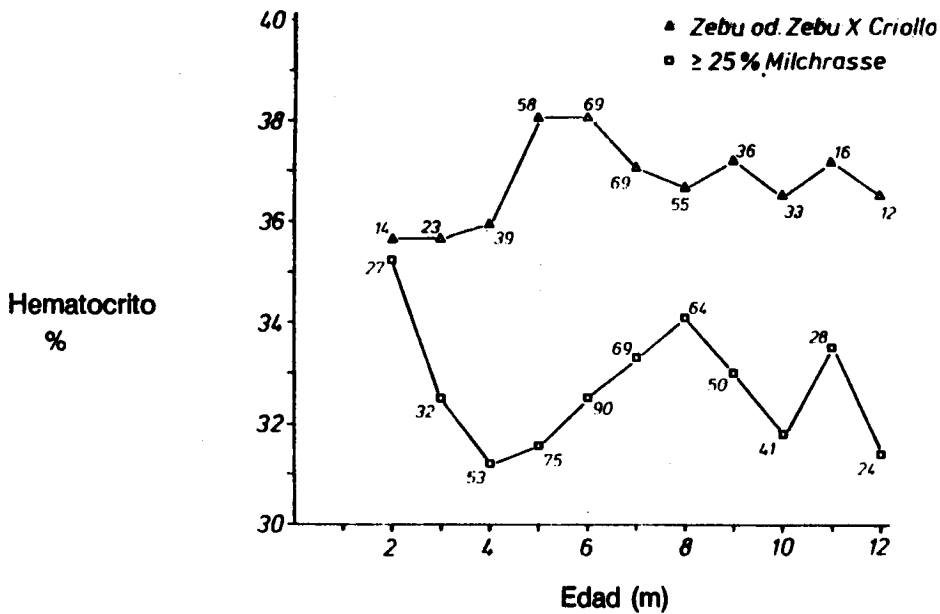


FIGURA 6 VALORES DEL HEMATOCRITO SEGUN LA EDAD Y LA RAZA
 n = No. de valores Milchrasse = % genes exóticos

La dependencia de la edad de los niveles del hematocrito también mostró diferentes cuadros en las dos categorías de bovinos. En los animales con genes *Bos taurus*, decrecieron los niveles del hematocrito hasta el cuarto mes de vida y luego aumentaron hasta el octavo mes, aquellos de los animales Cebú/Criollo se incrementaron después del cuarto mes y descendieron a partir del sexto mes.

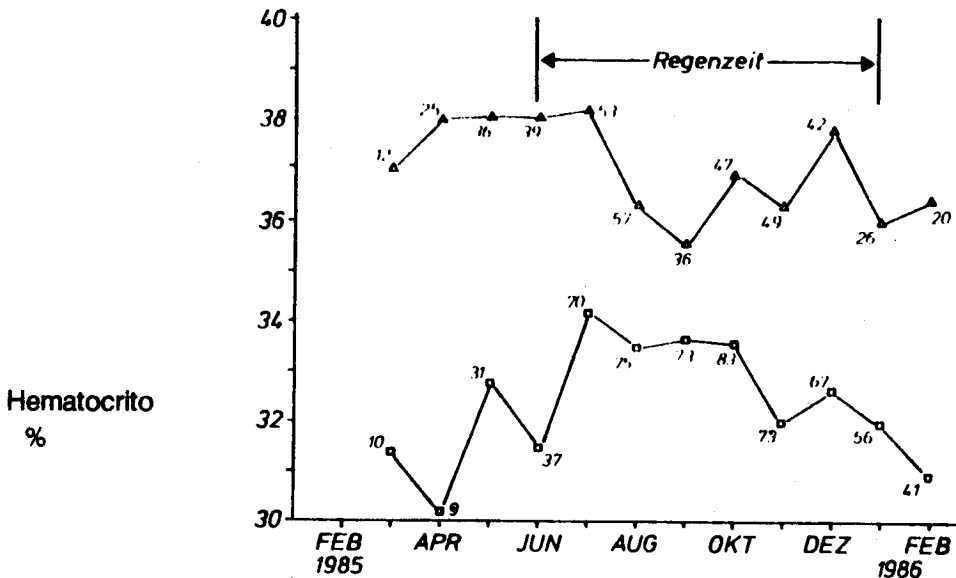


FIGURA 7 HEMATOCRITO SEGUN LA EPOCA DEL AÑO Y LA RAZA
 n = No. de valores Regenzeit = invierno

En general, los niveles del hematocrito de bovinos *Bos indicus*/Criollo fueron significativamente más altos que los de aquellos con infusión de sangre *Bos taurus* ($p < 0.001$).

2.12 Ocurrencia de infecciones múltiples

La Tabla 2.7 muestra la frecuencia de la ocurrencia de las infecciones múltiples. Se encontraron muy pocos animales infectados por uno sólo de los hemoparásitos bajo consideración o por ninguno de ellos (8.5% en total). Las infecciones con los tres parásitos fueron los más corrientes (45.2%), pero las infecciones combinadas de *B. bovis* y *A. marginale* fueron relativamente escasas (2.1%).

TABLA 2.7 INFECCIONES SOLAS Y MULTIPLES

Hato	-	a	b	c	a+b	a+c	b+c	a+b+c	Total
1	2	0	1	1	0	0	8	3	15
2	0	0	0	0	5	1	0	13	19
3	0	0	0	0	2	0	1	9	12
4	0	0	0	0	3	1	0	9	13
6	0	0	2	0	2	0	9	5	18
7	0	0	0	0	1	0	0	6	7
8	0	0	0	0	0	1	15	0	16
11	0	1	0	1	3	0	5	8	18
12	0	0	0	0	0	0	3	11	14
14	0	0	1	0	5	1	2	10	19
15	1	0	2	0	7	0	1	7	18
16	0	0	4	0	1	0	10	4	19
Total	3	1	10	2	29	4	54	85	188
%	1.6	0.5	5.3	1.1	15.4	2.1	28.7	45.2	100

- = no infectados; a = *B. bovis*; b = *B. bigemina*; c = *A. marginale*

3. DISCUSION

3.1 Prevalencia

En la Tabla 3.1 se presenta la prevalencia serológica y microscópica de *A. marginale*, *B. bovis* y *B. bigemina* en los terneros bajo investigación.

Se observaron discrepancias relativamente vastas entre las tasas de prevalencia serológica y microscópica en los casos de *A. marginale* y *B. bovis* (comparadas con *B. bigemina* donde el margen fue bastante estrecho), explicadas por el hecho que la persistencia de los títulos puede esperarse que sea más prolongada que la persistencia de las parasitemias y, en el caso de *B. bovis*, porque las tasas de parasitemia periférica tienden a ser muy bajas y fácilmente pasan desapercibidas. Por otra parte, el

porcentaje de casos donde se observaron parasitemias mientras la prueba serológica permanecía negativa, fue bajo (lo más bajo en el caso de **B. bigemina**), lo cual proporciona alguna evidencia del nivel de sensibilidad del método serológico utilizado.

TABLA 3.1 PREVALENCIA DE A.marginale, B.bovis y B.bigemina

	No.	No. (%) positivos	No. (%) negativos serologicos/ positivos microscopio
A. marginale	190		
FC		153 (80.5)	12 (6.3)
microscópica		91 (47.9)	
B. bovis	189		
IFAT		143 (75.7)	14 (7.4)
microscópica		72 (38.1)	
B. bigemina	189		
IFAT		182 (96.3)	4 (2.1)
microscópica		166 (87.8)	

Otro hecho sobresaliente, si no exactamente inesperado, fue la frecuencia con que ocurrieron las infecciones múltiples de **A. marginale**, **B. bovis** y **B. bigemina** (Tabla 2.7), estando el porcentaje más alto en la combinación de estos tres organismos, las infecciones con uno solo de ellos o con la combinación **B. bovis/A. marginale** fueron extremadamente escasas.

3.2 Anticuerpos maternos

Aunque, bajo las condiciones prevalentes, no se pueden excluir las posibilidades de terneros que adquieren inmunidad activa para **B. bovis**, **B. bigemina** y **A. marginale** durante su primer mes de vida, se debe considerar como bastante alta la probabilidad que las reacciones a la prueba IFAT y a la FC observadas en terneros de un mes de edad puedan deberse a inmunización pasiva. Si además se tiene en cuenta el hecho que los anticuerpos calostrales siempre ocurren en niveles bajos y que la lectura de IFAT en la presente investigación fue de 1:40 y 1:160 para **B. bovis** y de 1:80 y 1:320 para **B. bigemina**, se esperaría que una proporción considerable de anticuerpos en los sueros de los terneros experimentales hubieran permanecido sin detectar. Bajo estas circunstancias, no se puede catalogar como baja la cifra de 10/24 terneros positivos a **B. bovis** en este grupo. Esto aboga por una tasa de inmunidad más bien alta entre las vacas aunque ésta posiblemente no encontró una expresión adecuada en las cifras de prevalencia serológica, ya que en las vacas viejas a menudo se pierden los títulos, mientras que ésto no es cierto también en cuanto a la inmunidad.

La situación puede ser similar en lo referente a **A. marginale**, aunque sólo 5 de los 24 terneros resultaron

positivos a este organismo a la FC en su primer mes de edad; sin embargo, 5 más eran sospechosos. En este caso, deben considerarse las deficiencias conocidas de esta prueba cuando se trata de demostrar Inmunoglobulinas G.

En lo que respecta a **B. bigemina**, se habría esperado el porcentaje más alto de terneros con anticuerpos maternos en su suero durante el primer mes de vida, dado el hecho que éste hemoparásito tuvo las tasas de inoculación más elevadas en todas las 12 fincas y que todas éstas se presentaron por sí mismas en un estado sólido de estabilidad endémica para **B. bigemina**. No obstante, se observaron solamente 4/24 casos positivos; 3 resultaron sospechosos. No existe explicación para este fenómeno, excepto tal vez que éste puede ser la expresión de la pérdida de anticuerpos en la progenitora detectable por IFAT a pesar de la inmunidad continuada.

En general, estos resultados parecen confirmar el papel que generalmente se atribuye a los anticuerpos maternos respecto al desarrollo temprano de la inmunidad activa.

3.3 Comparación de los antígenos

El antígeno **B. bovis** preparado con base en los aislamientos de campo de Chinú, Córdoba y que produjo títulos significativamente más altos con los sueros del área que con el antígeno australiano (Lismore), puede considerarse como homólogo para las cepas de **B. bovis** de ocurrencia en el departamento y áreas adyacentes, aunque ésta observación no concuerda con los resultados obtenidos por Callow et al. (1976), quien obtuvo títulos más elevados en un sistema heterólogo. Esto destaca la importancia aparente de utilizar sistemas homólogos en las investigaciones seroepidemiológicas con **B. bovis**.

3.4 Incidencia

Se encontró que las seroconversiones para **B. bovis** ocurrían en terneros de mayor edad que aquellas para **B. bigemina** y **A. marginale** (Figura 1). Esto probablemente se debe a la mayor probabilidad de contraer infección con estas dos últimas especies. Por otra parte, se observó una tendencia en terneros Cebú a sufrir la infección más tarde que las otras razas, lo cual puede ser ocasionado por una mayor resistencia a las garrapatas de los animales Cebú y la resultante menor probabilidad de infección.

El número de seroconversiones para las babesias aumentó durante la época de lluvias, pero se presentaron fuertes oscilaciones que no pudieron explicarse. Las infecciones con **A. marginale**, por otra parte, estuvieron distribuidas uniformemente durante todo el invierno, ya que en éste caso estaban involucrados otros vectores diferentes a las garrapatas. Pero en general, los meses con los números más elevados de seroconversiones fueron idénticos a aquellos con las tasas más altas de infestación.

3.5 Tasas de inoculación e infección

Las tasas de infección para **A. marginale** y las discrepantes tasas de inoculación para **B. bovis** y **B. bigemina** observadas durante el presente estudio corresponden a los resultados obtenidos por otros investigadores (Applewhaite, 1979; Corrier y Guzmán, 1977; James et al., 1985). Sin embargo, en lo que se refiere a su uso para el cálculo de estabilidad endémica tienen que considerarse con cierta reserva

porque (a) el número de animales examinados fue más bien bajo y (b) los períodos de su examen no siempre coincidieron.

No obstante, se reconoce que la situación para *B. bovis* fue crítica en las fincas Nos. 1, 6 y 16, y probablemente también en las fincas Nos. 2 y 11. En los hatos 1, 6, 11 y 16 dominan fuertemente los animales Cebú y Cebú x Criollo, con su conocida alta resistencia a las garrapatas (Utech y Wharton, 1982) y, por lo tanto, bajo riesgo de infección, pero las tasas de inoculación relativamente bajas para *B. bovis* observadas en estos hatos justifican aún una investigación posterior.

La situación en lo que respecta a *B. bigemina* fue estable endémicamente en todas las fincas. Sin embargo, en la finca 1 fue significativamente ($p = 0.0001$) más baja que en todas las otras fincas (0.00655 versus > 0.01 en el resto). La finca 1 está situada en un área donde las inundaciones de ocurrencia regular están diezmando cada año las garrapatas.

Las tasas de infección encontradas para *A. marginale* indicaron estabilidad endémica en todos los hatos examinados.

4. RESUMEN

Se recolectó un total de 1.130 muestras de suero de 191 terneros y novillas en 12 hatos seleccionados en el departamento de Córdoba en la región de la costa norte de Colombia, desde febrero, 1985 hasta febrero, 1986. Los sueros se analizaron para anticuerpos contra *B. bovis* y *B. bigemina* utilizando la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT) y se examinaron para anticuerpos contra *A. marginale* mediante la técnica de la fijación del complemento (FC).

Las tasas de inoculación para *B. bovis* fluctuaron de 0.001 a 0.013, aquellas para *B. bigemina* entre 0.007 y > 1 . Las tasas de inoculación más bajas para ambos parásitos se presentaron en los hatos con los porcentajes más altos de genes de *B. indicus* ($p = 0.001$).

Las tasas de infección para *A. marginale* oscilaron de 55% a 92%.

Se encontraron anticuerpos probablemente de origen calostrual (no se podría excluir con certeza la inmunización activa natural post-parto), para *B. bovis* en 10 de 24 terneros durante el primer mes de vida, en 4 de 24 terneros para *B. bigemina* y también en 4 para *A. marginale*.

Las seroconversiones relacionadas con *B. bovis* ocurrieron predominantemente a la edad de 6 meses, mientras que la mayoría de las referentes a *B. bigemina* y *A. marginale* se presentaron a la edad de 4 a 5 meses ($p > 0.001$). Las seroconversiones de *B. bovis* se observaron más tarde en los animales con niveles altos de genes de *B. indicus* que en los bovinos con $>25\%$ genes de *Bos taurus* ($p = 0.044$). Se observó un número significativamente más alto de seroconversiones en la época de lluvias que durante el verano en 1985 (*B. bovis*: $p = 0.013$; *B. bigemina*: $p = 0.026$; *A. marginale*: $p = 0.016$).

Los antígenos de *B. bovis* para la prueba IFAT preparados a partir de la cepa australiana Lismore por una parte y de la cepa de campo de Chinú, Córdoba, por la otra, se compararon utilizando los sueros del área. El sistema probablemente homólogo (antígeno Chinú) ofreció consistentemente títulos más altos que el

sistema heterólogo (antígeno australiano).

En la fijación del complemento para *A. marginale* hubo un 6.3% de reacciones de negativos falsos según lo demostrado por comparación con los resultados del examen microscópico de frotis de sangre. Los resultados de negativos falsos en la IFAT fueron de 2.1% para *B. bigemina* y 7.4% para *B. bovis*.

**IV. INVESTIGACIONES EPIDEMIOLOGICAS EN FINCAS GANADERAS
EN EL VALLE DEL SINU MEDIO (CORDOBA, COLOMBIA)**

Por

Frank Nowak

**Extractado de: Epidemiologische Untersuchungen in Rinderbeständen im
mittleren Sinutal. Dissertation, Hannover, 1990.**

INDICE DE CONTENIDO

	Página
1. MATERIALES Y METODOS	89
1.1 Características de las fincas investigadas	89
1.1.1 Modo de producción	89
1.2 Procedimiento del muestreo	90
1.3 Exámenes realizados	92
1.3.1 Frotis delgados	92
1.3.2 Preparaciones de gota gruesa	92
1.3.3 Sangre citratada	92
1.3.4 Prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes	92
1.3.5 Exámenes post-mortem	93
1.3.6 Exámenes bacteriológicos	93
2. RESULTADOS DE LAS INVESTIGACIONES DE CAMPO	93
2.1 Ocurrencia de artrópodos hematófagos	93
2.2 Infestación con garrapatas	93
2.3 Infecciones con hemoparásitos	93
2.3.1 Tasas de incidencia y de parasitemia de <i>A. marginale</i> y <i>B. bigemina</i>	94
2.3.2 Tasas de incidencia e infección de <i>B. bovis</i>	95
2.3.3 Efectos clínicos de infecciones con hemoparásitos	97
2.4 Mortalidad registrada en las fincas	100
2.4.1 Tasas de mortalidad	100
2.4.2 Causas de mortalidad	101
2.4.2.1 Muertes causadas por infecciones bacterianas	101
2.4.2.2 Muertes perinatales	102
2.4.2.3 Muertes en conexión con la castración y por otros traumas	103
2.4.2.4 Muertes ocasionadas por hemoparásitos	103
3. DISCUSION	103
4. RESUMEN	106
5. ANEXO 1	108

INDICE DE TABLAS

		Página
TABLA 1.1	Datos de producción en las 4 fincas de referencia	91
TABLA 1.2	Clave para la evaluación de los parámetros de condición física, piel y pelaje e infestación con garrapatas	92
TABLA 2.1	Artropodos hematófagos en el área de investigación (departamento de Córdoba)	94
TABLA 2.2	Tasas de incidencia y parasitemia de <i>A. marginale</i>	95
TABLA 2.3	Tasas de incidencia y parasitemia de <i>B. bigemina</i>	96
TABLA 2.4	Prevalencia de <i>B. bovis</i> en 4 fincas obtenidas en una investigación seccional-cruzada	96
TABLA 2.5	Tasas de incidencia e infección de <i>B. bovis</i> en tres fincas obtenidas en una investigación longitudinal	97
TABLA 2.6	Subdivisión en cinco fases del período de reacción a la infección con hemoparásitos en bovinos	98
TABLA 2.7	Promedio de los valores de hematocrito (%) de aproximadamente 80 animales jóvenes (hasta 10 meses) en el curso de las infecciones con <i>A. marginale</i> , <i>B. bigemina</i> y <i>B. bovis</i>	99
TABLA 2.8	Proporción (%) terneros en mala condición física en el curso de las infecciones con anaplasma y babesia	99
TABLA 2.9	Proporción (%) terneros con pelaje áspero y sucio durante el curso de las infecciones con anaplasma y babesia	100
TABLA 2.10	Proporción (%) terneros con infestación por garrapatas durante el curso de infecciones con anaplasma y babesia	100
TABLA 2.11	Tasas de mortalidad (%) en bovinos de tres grupos de edad en cuatro fincas de referencia	101
TABLA 2.12	Resumen de causas de mortalidad en bovinos de las fincas examinadas	102
TABLA 2.13	Muertes causadas por hemoparásitos	103

1. MATERIALES Y METODOS

1.1 Características de las fincas investigadas

Las presentes investigaciones se realizaron en un área de aproximadamente 40 km², situada en el valle del Sinú medio en Córdoba, Colombia, donde el clima es uniformemente cálido durante todo el año, con pocas variaciones en las temperaturas diarias y anuales pero con variación estacional pronunciada en cantidad pluvial (períodos húmedos y secos; Duehnen, 1987). Las fincas ganaderas en estas zonas, difieren en tamaño entre 50 y 1000 ha y mantienen un total cercano a 4000 cabezas de bovinos (desde 100 hasta 1000 aproximadamente por finca). La densidad ganadera fluctúa entre 1 y 3 cabezas por ha.

Se seleccionaron cuatro de estas fincas, a saber: Diluvio, Mercedes, Danubio y San Miguel, para un programa de monitoreo de la salud durante un período de un año. El autor estaba ubicado en una de ellas (Diluvio) y visitó las otras regularmente (cada semana) a caballo; además efectuó visitas a otros tres predios ocasionalmente o a solicitud de los interesados.

Las fincas eran típicas de la región en cuanto a su meta de producción (la leche y la carne), con varios grados de infusión de genes exóticos lecheros o de doble propósito mediante programas de mejoramiento genético en sus hatos básicamente Cebú/Criollo.

1.1.1 Modo de producción

La fuerza de trabajo regular de las fincas consistía en 2 a 6 empleados permanentes, más un número variado de trabajadores ocasionales.

La rutina diaria era la siguiente:

- 3 a 5 a.m. Ordeño (manual)
- 5 a 6 a.m. Soltaban las vacas con sus terneros a los potreros
- 13 a 15 p.m. Separación de los terneros lactantes de las vacas
- 18 a 19 p.m. Reunían las vacas para que permanecieran separadas de los terneros durante la noche.

El ternero tenía que estar presente mientras ordeñaban a su madre para asegurar la salida de la leche y que la vaca permaneciera quieta. Los terneros se llevaban antes del ordeño a donde estaban sus progenitoras y se les permitía lactar durante un rato. Después de esto eran atados a una de las patas delanteras de las vacas durante el tiempo restante del ordeño. Este procedimiento se mantuvo durante todo el período de lactancia (9 a 10 meses).

Las siguientes medidas relacionadas con la salud fueron realizadas en forma rutinaria por el personal de la finca:

1. Aplicaciones con acaricidas

En forma regular a intervalos de 14 ó 21 días o irregular o aún esporádicamente según el grado de infestación con garrapatas.

2. Inmunoprofilaxis

Fiebre aftosa: cada 6 meses

Carbón sintomático/Carbón bacteridiano/Pasteurellosis (vacuna triple): a intervalos de 3 a 4 meses.

3. Aplicación antihelmínticos

oral o intramuscular, 1 a 2 veces por año.

4. Antibióticos

usualmente tetraciclinas, i.m., en casos de enfermedad severa, aguda, la mayoría de génesis desconocida.

5. Tratamiento de heridas e infecciones del ombligo

"Blue-spray" o una mezcla de polvos astringentes, antibióticos e insecticidas.

6. Castración

7. Atención de Partos

Incluyendo desinfecciones del ombligo.

En la Tabla 1.1 se suministra un resumen de las características de las 4 fincas de referencia en las cuales se efectuó el monitoreo de la salud en forma regular.

1.2 Procedimiento del muestreo

En los cuatro hatos monitoreados en forma regular, se establecieron grupos de referencia conformados por 15 a 30 terneros. Estos animales se marcaron con orejeras plásticas y se registró su fecha de nacimiento, sexo, raza y el número de partos de sus progenitoras. Además, se colectaron los siguientes datos cada mes: peso (con cinta métrica), condición física, piel y pelaje, infestación con garrapatas, temperatura corporal, enfermedades visibles (Tabla 1.2).

Para estudios entomológicos, al caer la noche en el corral, se pasó alrededor de los terneros una jama de malla fina durante dos minutos. El diagnóstico del género de los insectos colectados se hizo con una lupa. Los dípteros activos en el día se cogieron con un beaker cuando estaban sobre el animal.

Finalmente, a intervalos de 4 semanas, se sangraron los terneros de la punta de la cola para preparaciones de frotis delgados y gota gruesa, y de la vena yugular para obtener sangre citratada y natural.

TABLA 1.1 DATOS DE PRODUCCION EN LAS 4 FINCAS DE REFERENCIA

Datos de Producción	FINCAS			
	Danubio	Diluvio	Mercedes	San Miguel
Area, ha	120	400	360	320
Topografía	Plana	Pantanosa	Plana	Plana
Pasto, ha.	100	300	250	315
Pasto, calidad	Buena	Mala	Moderada	Buena
No. bovinos	377	303	130	832
Cabezas/ha.	3.7	1	0.5*	2.6
Vacas lecheras**	90 (23.9%)	104 (34.3%)	55 (42.3%)	152 (18.3%)
Vacas carne	78 (20.7%)	50 (16.5%)	0	272 (32.7%)
Terneros	105 (27.9%)	65 (21.5%)	35 (26.9%)	265 (31.9%)
Animales jóvenes	94 (24.9%)	77 (25.4%)	40 (30.8%)	93 (11.2%)
Toros	10 (2.7%)	7 (2.3%)	0	50 (6.0%)
Ganancia peso***	288 g/d	388 g/d	394 g/d	462 g/d
Leche/vaca/lt.	1.6	3.0	2.9	2.8
Aspersión#	14	Esporádico	21	<14
Indice Garrapatas ##	1.2	1.35	1.4	1.2
Estándar Educación @	2	1	3	3

* Fuera de los bovinos, 60 caballos reproductores en pastura

** % estimado de Infusión de genes exóticos

*** Ganancia de peso de los terneros de referencia

Intervalo entre tratamientos de acaricidas en días

Promedio índice garrapatas (Ver Tabla 1.2)

@ Estándar de educación del encargado de la finca

1 = analfabeta; 2 = estudios de primaria incompletos; 3 = estudios de primaria completos

TABLA 1.2 CLAVE PARA LA EVALUACION DE LOS PARAMETROS DE CONDICION FISICA, PIEL Y PELAJE E INFESTACION CON GARRAPATAS*

Indice	Condición física	Piel/pelaje	Infestación garrapatas*
1	Gordo	suave, limpio	0
2	buena - moderada	suave, sucio	1-10
3	moderada - mala	áspera, sucio	11-50
4	flaca	afecciones piel	> 50

* Número de hembras Ingurgitadas de > 4 mm.

1.3 Exámenes realizados

1.3.1 Frotis delgados

Los frotis delgados se colorearon con solución Giemsa al 12%. Se analizaron 50 campos en cada frotis utilizando un objetivo de 40X, aceite de Inmersión y un ocular de ángulo amplio 10X, empezando por el extremo delgado perpendicularmente a la dirección del frotis. Al terminar 50 campos, se había examinado aproximadamente 100.000 eritrocitos y se pudo calcular la parasitemia. De esta manera se determinaron la incidencia y la parasitemia de *A. marginale* y *B. bigemina*.

1.3.2 Preparaciones de gota gruesa

Las gotas gruesas que se habían colocado al extremo grueso del frotis sobre la laminilla se colorearon por separado con Naranja-Acrídina (Trees, 1974). Las muestras de la finca Danubio, donde no se había demostrado la presencia de babesia en los frotis delgados, se sometieron a una prueba con microscopio de luz fluorescente.

1.3.3 Sangre citratada

La sangre citratada se utilizó para la demostración de tripanosomas móviles y microfilaria mediante la técnica Woo (1971).

1.3.4 Prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes

En el Instituto de Parasitología de Hannover se analizaron sueros provenientes de 7 fincas de la región, para anticuerpos fluorescentes contra *B. bovis*, empleando la técnica mejorada por Mueller (1984). En tres de estas fincas, se habían obtenido los sueros mensualmente y por lo tanto, fue posible calcular las tasas de incidencia de *B. bovis*. En los otros cuatro predios, se tomaron las muestras a intervalos irregulares o sólo una vez. En éstos casos, únicamente se pudieron establecer las tasas de infección (prevalencia).

1.3.5 Exámenes post-mortem

A todos los animales cuyas muertes se reportaron en las siete fincas, se les practicaron exámenes post-mortem, incluyendo histopatología. Para ésta última se hicieron frotis de los órganos afectados; se fijaron en formalina al 10% y se enviaron al departamento de Patología del Laboratorio de Investigaciones Veterinarias de Enfermedades Tropicales (LIVET) en Cereté.

1.3.6 Exámenes bacteriológicos

Donde fue posible se envió también al LIVET, dentro del término de 24 horas después del examen post-mortem, el material para examen bacteriológico. Se hicieron preparaciones de frotis de cerebro para el diagnóstico de *B. bovis*, según Hadani et al. (1982).

2. RESULTADOS DE LAS INVESTIGACIONES DE CAMPO

2.1 Ocurrencia de artrópodos hematófagos

Durante el curso de la investigación de campo se observaron los artrópodos hematófagos detallados en la Tabla 2.1; se estudió su dinámica de población.

2.2 Infestación con garrapatas

En el área de investigación, las tasas de infestación con garrapatas en bovinos de hasta 10 meses de edad, aumentaron durante el verano (enero a abril) a 39.9%, comparada con 27.9% en la época de lluvias (mayo a noviembre). El promedio del índice de garrapatas (para definición ver Tabla 1.2) se elevó correspondientemente de 1.31 a 1.46 ($p < 0.001$; $t = 4.83$).

2.3 Infecciones con hemoparásitos

Se identificaron los siguientes hemoparásitos mediante examen microscópico de muestras de sangre:

Rickettsia

Anaplasma marginale

Eperythrozoon wenyonii

Piroplasma

Babesia bigemina

Babesia bovis

Trypanosoma

Trypanosoma vivax

Trypanosoma theileri

Trypanosoma ingens

Microfilaria

TABLA 2.1 ARTROPODOS HEMATOFAGOS EN EL AREA DE INVESTIGACION (DEPARTAMENTO DE CORDOBA)

Artrópodos	Nombre local	Intensidad infestación	Ocurrencia estacional
Culicidae	Zanudo	Masiva	Invierno
<i>Aedes</i> spp. <i>Anopheles</i> spp.			
Culicoides spp.	Jején	Masiva	Invierno
Haematobia	Mosca	Masiva	Verano
Tabanidae*	Tábano	Frecuente	Finales invierno Principio verano
<i>T. nebulosus</i> <i>T. pungens</i> <i>T. claripennis</i> <i>Lepiselaga crassipes</i>	Congo		
<i>Stomoxys</i> spp.	Mosca picadora	Esporádica	
Ixodidae	Garrapata		Todo el año
<i>Boophilus microplus</i> <i>Dermacentor nitens</i> <i>Amblyomma cajennense</i>		Frecuente Esporádica Esporádica	Aumenta verano

* Diagnóstico de la especie realizado por el Dr. P. Barreto, Universidad del Valle

2.3.1 Tasas de incidencia y de parasitemia de *A. marginale* y *B. bigemina*

A. marginale y *B. bigemina* se encontraron con mucha frecuencia en frotis delgados coloreados con Giemsa. En las Tablas 2.2 y 2.3 se presentan las tasas de incidencia y de parasitemia.

La incidencia de infecciones por *B. bigemina* fue apenas suficiente en la finca Danubio como para

proporcionar estabilidad endémica ($h = 0.005$). En los otros predios, ésta última fue sólida tanto para *A. marginale* como para *B. bigemina*.

2.3.2 Tasas de incidencia e infección de *B. bovis*

Los sueros de terneros de siete fincas en el departamento de Córdoba que habían sido obtenidos en una investigación seccional-cruzada(3) y en una longitudinal(4), sobre las limitantes de la producción y la salud en el área, durante el período comprendido entre 1982 y 1988, se analizaron para anticuerpos contra *B. bovis* mediante la prueba IFAT y se calcularon las tasas de inoculación para los mismos (Tablas 2.4 y 2.5).

TABLA 2.2 TASAS DE INCIDENCIA Y PARASITEMIA DE *A. marginale*

Edad	Nombre de la finca (x/n*)				Total (%)
	Diluvio	Danubio	Mercedes	S.Miguel	
1	0/34	1/17	0/20	0/20	1/91 (1.1)
2	8/34	2/17	3/20	2/20	15/91 (16.5)
3	14/34	4/17	8/20	4/20	30/91 (33.0)
4	2/34	3/17	2/20	3/20	10/91 (11.0)
5	3/34	6/17	2/20	6/20	17/91 (18.7)
6	2/34	1/17	0/20	2/20	5/91 (5.5)
7	1/34	0/17	3/20	2/20	6/91 (6.6)
8	0/34	0/17	1/20	0/20	1/91 (1.1)
p**	88.2%	100%	90.0%	95.0%	92.3%

* x/n = número de primeras infecciones/total terneros examinados

** p = prevalencia

TABLA 2.3 TASAS DE INCIDENCIA Y PARASITEMIA DE B.bigemina

Edad	Nombre de la finca (x/n*)				
	Diluvio	Danubio	Mercedes	S.Miguel	Total (%)
1	7/34	0/17	2/20	1/20	10/91 (11.0)
2	12/34	0/17	2/20	3/20	17/91 (18.7)
3	5/34	3/17	1/20	7/20	16/91 (17.6)
4	1/34	1/17	3/20	5/20	10/91 (11.0)
5	4/34	1/17	3/20	1/20	9/91 (9.9)
6	1/34	3/17	4/20	1/20	9/91 (9.9)
7	1/34	3/17	1/20	0/20	5/91 (5.5)
8	0/34	0/17	0/20	0/20	0/91 (0)
p**	91.2%	64.7%	80.0%	90.0%	83.5%
h***	0.0116	0.005	0.008	0.011	0.0086

* x/n = No. primeras infecciones/total terneros examinados

** p = Tasas acumuladas de infección

*** h = Tasa de inoculación

TABLA 2.4 PREVALENCIA DE B. bovis EN 4 FINCAS OBTENIDAS EN UNA INVESTIGACION SECCIONAL-CRUZADA

	Nombre de la finca (x/n*)			
	Danubio	La Ganga	Mercedes	S. Miguel
p**	1/13	23/46	21/21	14/20
Edad(m)	7	6	10	10
h***	0.0004	0.0039	0.0768	0.004

* x/n = número de primeras infecciones/total terneros examinados

** p = prevalencia

*** h = tasa inoculación

TABLA 2.5 TASAS DE INCIDENCIA E INFECCION DE B. bovis EN TRES FINCAS OBTENIDAS EN UNA INVESTIGACION LONGITUDINAL

Edad	Nombre de la finca (x/n*)			
	Campiña	Diluvio	G. Carne	Total (%)
1	0/20	1/24	0/23	1/67 (1.5)
2	2/20	3/14	0/23	5/67 (7.5)
3	7/20	8/24	6/23	21/67 (31.3)
4	2/20	4/24	5/23	11/67 (16.4)
5	1/20	4/24	6/23	11/67 (16.4)
6	2/20	2/24	0/23	4/67 (6.0)
7	0/20	1/24	1/23	2/67 (3.0)
8	2/20	1/24	3/23	6/67 (9.0)
I**	80.0%	100%	91.3%	91.0%
h***	0.0067	0.096	0.01	0.01

* x/n = número de primeras infecciones/total terneros examinados

** I = tasa acumulada de infección

*** h = tasa de inoculación

Se encontró que la estabilidad endémica (> 0.005) prevalecía en cuatro de las siete fincas (Campiña, Diluvio, Ganado de Carne y Mercedes). Esto no sucedió en las tres restantes. Mientras las fincas la Ganga y San Miguel estaban aún cerca al límite de la estabilidad endémica ($h = 0.0039$ y 0.004 respectivamente), el Danubio, con una tasa de inoculación de 0.0004 , estaba muy por debajo de este nivel.

2.3.3 Efectos clínicos de infecciones con hemoparásitos

Las investigaciones longitudinales proporcionaron la posibilidad de dividir en fases la reacción a la infección con hemoparásitos. Esto se aprovechó en la presente investigación, usando la prevalencia y la incidencia en el caso de *B. bovis* (Tablas 2.4 y 2.5) y las tasas de parasitemia y de su incidencia para *A. marginale* y *B. bigemina* (Tablas 2.2 y 2.3). De esta manera, se pudieron correlacionar los parámetros clínicos y otros de cada ternero de referencia y en cada fecha de examen con cada una de las fases. Las definiciones de las etapas de reacción clínica a la infección se presenta en la Tabla 2.6; en las Tablas 2.7 a 2.10 se muestran las correlaciones con los parámetros "hematocrito", "condición física", "piel y pelaje".

TABLA 2.6 SUBDIVISION EN CINCO FASES DEL PERIODO DE REACCION A LA INFECCION CON HEMOPARASITOS EN BOVINOS

DEFINICION DE LAS FASES	
Fase 1	más de un mes antes del diagnóstico de la primera infección; o permanentemente negativo durante todo el período
Fase 2	un mes antes del diagnóstico de la primera infección
Fase 3	mes del diagnóstico de la primera infección
Fase 4	un mes después del diagnóstico de la primera infección
Fase 5	más de un mes después del diagnóstico de la primera infección

La Tabla 2.7 muestra que los valores de hematocrito estuvieron sometidos a variaciones significativas ($p < 0.001$) durante el curso de las infecciones con *A. marginale*. Hubo un leve aumento en los valores desde la fase 1 hasta la 2, seguido por una disminución significativa (inferior al 30%) en la fase 3 (fase de la primera infección).

Las infecciones con *B. bigemina* produjeron un efecto menos marcado pero aún significativo ($p < 0.05$). Los valores del hematocrito aumentaron en la fase 3 (mes de la infección) seguido por un descenso moderado hasta el nivel más bajo en el curso de la reacción, en la fase 4 (un mes después de la infección).

En el caso de infecciones con *B. bovis* no se presentaron variaciones significativas en los niveles del hematocrito; tampoco se observaron correlaciones significativas entre la fase de infección y el porcentaje de terneros en mala condición física (Tabla 2.8), a la vez el parámetro "piel/pelaje, Índice 3", la típica si no específica expresión de enfermedad subaguda y crónica, mostró un aumento significativo ($p < 0.01$) en el porcentaje de terneros afectados en el caso de *A. marginale* (Tabla 2.9).

El porcentaje de terneros infestados con garrapatas (Índices Nos. 2, 3 y 4, Tabla 1.2) comparados con aquellos libres de garrapatas estaba significativamente elevado ($p < 0.001$) en el caso de los tres organismos. Con *A. marginale* el pico ocurrió en la fase 2 (el mes anterior a la infección); con *B. bigemina* y *B. bovis* se presentó durante la fase 3, el mes del primer diagnóstico de la infección (Tabla 2.10).

Durante el curso de las infecciones con *B. bovis*, la tasa de terneros infestados con garrapatas versus el número total de terneros fue significativamente heterogénea ($p > 0.05$; $\chi^2 = 6.87$ con 4 grados de libertad), en contraste con las infecciones con *B. bigemina* ($p < 0.01$). Las tasas de parasitemia de *A. marginale* fueron tan altas en las fincas con índices promedios bajos de garrapatas como en todos los otros predios (Tablas 1.1 y 2.2, 2.3).

TABLA 2.7 PROMEDIO DE LOS VALORES DE HEMATOCRITO (%) DE APROXIMADAMENTE 80 ANIMALES JOVENES (HASTA 10 MESES) EN EL CURSO DE LAS INFECCIONES CON A. marginale, B. bigemina y B. bovis (DEFINICIONES EN LA TABLA 1.2)

Agente	Promedio valores hematocrito (%) durante la fase				
	1	2	3	4	5
infectivo					
A. marginale	34.3	36.7	29.5*	32.3	34.1
n	170	75	88	86	324
B. bigemina	33.9	33.3	35.0	31.7	33.6
n	154	47	89	79	357
B. bovis	36.6	35.7	35.1	35.8	34.1
n	128	50	66	57	439

* $p < 0.001$

TABLA 2.8 PROPORCION (%) TERNEROS EN MALA CONDICION FISICA (INDICE No. 3, TABLA 1.2) EN EL CURSO DE LAS INFECCIONES CON Anaplasma y Babesia

Agente	% terneros en mala condición física durante fase				
	1	2	3	4	5
A. marginale	10.2	17.1*	16.0*	10.2	8.8
Chi ² proporción	0.1	2.64	2.16	0.04	1.47
B. bigemina	11.2	7.8	13.0	10.0	11.5
Chi ² proporción	0.0	0.51	0.28	0.12	0.03
B. bovis	3.9	3.7	4.6	4.9	3.9
Chi ² proporción	0.01	0.01	0.05	0.13	0.02

* $p < 0.05$

TABLA 2.9 PROPORCION (%) TERNEROS CON PELAJE ASPERO Y SUCIO (INDICE No. 3, TABLA 1.2) DURANTE EL CURSO DE LAS INFECCIONES CON Anaplasma y Babesia

Agente	% terneros con pelaje áspero y sucio durante fase				
	1	2	3	4	5
Infectivo					
A. marginale	10.3	8.0	18.0*	5.3	4.3
Chi ² proporción	0.73	0.06	7.32	0.12	1.97
B. bigemina	11.8	0	10.3	10.3	4.4
Chi ² proporción	2.68	0.83	0.50	0.63	1.92

* $p < 0.01$

TABLA 2.10 PROPORCION (%) TERNEROS CON INFESTACION POR GARRAPATAS (INDICE 2-4, TABLA 1.2) DURANTE EL CURSO DE INFECCIONES CON Anaplasma y Babesia

Agente	% terneros con infestación por garrapatas durante fase				
	1	2	3	4	5
Infectivo					
A. marginale	35.0	43.4*	20.2	21.6	27.5
Chi ² proporción	2.1	5.3	2.6	1.8	0.4
B. bigemina	28.0	29.4	45.7*	27.8	25.6
Chi ² proporción	0.1	0	8.6	0.1	1.4
B. bovis	25.4	33.3	37.9*	27.9	24.3
Chi ² proporción	0.1	0.9	3.1	0	0.1

* $p < 0.01$

2.4 Mortalidad registrada en las fincas

2.4.1 Tasas de mortalidad

Se registró un total de 85 muertes en bovinos en las siete fincas incluidas en la investigación, 44 de éstas ocurrieron en las 4 fincas de referencia, donde es probable que se hubiesen reportado todas las pérdidas por muerte. Las tasas de mortalidad observadas en tres grupos de edad se presentan en la Tabla 2.11. El número de terneros nacidos por año se calculó multiplicando el número de vacas por el factor 0.75 (la tasa promedio de partos en la región). La cifra obtenida de esta manera, probablemente está más cerca a la realidad que cualquiera de las logradas a través de los registros de la finca, considerando la calidad

general de éstos y en el hecho de registrarse cambios muy frecuentemente entre los empleados de la misma.

TABLA 2.11 TASAS DE MORTALIDAD (%) EN BOVINOS DE TRES GRUPOS DE EDAD EN CUATRO FINCAS DE REFERENCIA

Edad meses	Fincas (x/n*) investigadas durante un período de			
	12 meses		6 meses	
	Diluvio	Mercedes	Danubio	S. Miguel
0-10	12/116 (10.3)	2/42 (4.9)	6/126 (4.8)	9/318 (2.8)
10-24	3/77 (3.9)	0/40 (0)	0/94 (0)	5/93 (5.4)
>24	6/161 (3.7)	1/55 (1.8)	4/178 (2.2)	6/474 (1.3)
Total	21/354 (5.9)	3/136 (2.2)	10/398 (2.5)	20/885 (2.3)

* número de muertes/número total de bovinos

2.4.2 Causas de mortalidad

Se pudo determinar, con un grado razonable de exactitud, la causa de mortalidad en 58 de 85 casos, en particular cuando el encargado de la finca o el propietario estaban en posición de proporcionar un historial aceptable de la enfermedad, lo cual sucedió usualmente en las cuatro fincas de referencia. En la Tabla 2.12 se resumen las causas de la muerte; en el Anexo 1 se suministran más detalles.

2.4.2.1 Muertes ocasionadas por infecciones bacterianas

Ocho bovinos de aproximadamente 18 meses de edad, todos Cebú/Criollo, mostraron lesiones indicativas de septicemia hemorrágica a la necropsia, o la historia de la enfermedad al menos se encaminaba a este diagnóstico. La sección de Patología del LIVET demostró la presencia de *Pasteurella* spp. (prueba en ratones y cultivos subsecuentes) en muestras de órgano de animales enviados para su examen.

En dos terneros de 9 y 10 meses de edad con lesiones típicas de carbón sintomático (Infección por *Clostridium chauvoei*), al examinar las laminillas hechas a partir de los músculos afectados se observaron únicamente bacterias gram-positivas formando esporas.

TABLA 2.12 RESUMEN DE CAUSAS DE MORTALIDAD EN BOVINOS DE LAS FINCAS EXAMINADAS

Causas de muerte	Número (n=58)	Edad meses	% genes exóticos
Parasitarias			
Anaplasmosis	2	2;3	50;75
Babesiosis	1	19 días	75
Tripanosomiasis	1	7	0
Miasis (región laringeal)	1	84	0
Bacterianas			
Pasteurelosis	9	18-31	0
Infeción anaeróbica después de castración	6	20-30	0
Carbón sintomático	2	9-10	0;50
Bronconeumonía	3	2-14	50;75
Nefritis	2	4;18	0
Onfalitis metastática	1	1	50
Perinatal			
Distocia materna	6	18-84	0
Distocia fetal	3	0	0-75
Debilidad general	6	0.2-0.5	0-50
Otras			
Trauma, sacrificio	7	8-72	0-75
Hemorragia	3	0-20	0-75
Intoxicación por acaricidas	1	2	50
Ahogados	1	24	50
Falla cardíaca	1	2	75
Obstipación, Pelobezoar	1	2	50
Debilidad (vejez)	1	144	0

2.4.2.2 Muertes perinatales

Tres vacas murieron por falta de asistencia en el parto o por fallas en la misma, mientras que 10 terneros murieron al nacer ó durante los primeros días de vida sin haber tenido la posibilidad de un diagnóstico etiológico.

2.4.2.3 Muertes en conexión con la castración y por otros traumas

Dos toros jóvenes murieron después de haber sido castrados, debido a una intensa hemorragia en la cavidad abdominal y en seis casos más la castración estuvo seguida de un edema maligno. Un total de 10 animales se sacrificó ó murió a causa de accidentes u otros traumas.

2.4.2.4 Muertes ocasionadas por hemoparásitos

Cuatro terneros murieron después de haber sufrido infecciones con hemoparásitos (Tabla 2.13).

TABLA 2.13 MUERTES CAUSADAS POR HEMOPARASITOS

Agente	Número	Edad (días)	% genes exóticos
A. marginale	2	60; 90	50
B. bovis	1	19	75
T. vivax	1	210	0

3. DISCUSION

El presente estudio formó parte de un programa de investigación general realizado en Córdoba, encaminado a obtener un cuadro real de los antecedentes de la situación de producción y salud animal en este departamento, que representa una parte importante del potencial global de producción animal de Colombia. Su objetivo específico fue lograr, de una fuente directa, información sobre la situación real de la salud en las fincas, en particular respecto a la verdadera dimensión y las causas de mortalidad, haciendo énfasis especial en las enfermedades hemoparasitarias. De ahí, la presencia permanente del autor en una finca localizada estratégicamente, de donde también podía observar de cerca tres predios más situados en la vecindad.

Los métodos utilizados preferencialmente para la demostración cuali-cuantitativa de los hemoparásitos fueron los frotis delgados y las preparaciones de gota gruesa. Los resultados obtenidos con estos métodos durante la investigación longitudinal realizada en cuatro fincas, fueron suficientes para evaluar su situación epidemiológica en cuanto a *B. bigemina* y *A. marginale* se refiere. El grado de exactitud de la demostración del primer organismo se amplió empleando las preparaciones de gota gruesa coloreadas con Naranja-Acrídina (Ganse-Dumrath, 1986).

Sin embargo, para *B. bovis* se empleó la serología, debido a su tendencia a la cito-adherencia y a su relativa escasa presencia en sangre periférica, circunstancias que no permiten hacer una determinación fiable de las tasas de infección con base en el examen microscópico. Similar a lo realizado por Tropberger

(1987) y Zips (1989), se usó la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT) en su forma modificada (Mueller, 1984). No obstante, mientras Zips reconoció títulos de 1:20 como positivos, en el presente caso se fijó el límite en 1:40. Los sueros examinados provinieron de grupos de terneros de las cuatro fincas de referencia; los animales se sangraron a intervalos de un mes. Algunos de ellos eran muy jóvenes aún; tres por ejemplo, cuando tenían un mes de edad presentaron títulos de 1:40 que descendieron a 1:10 ó 1:20 durante los dos meses siguientes, período en el cual volvieron a elevarse a 1:80 o más. Los títulos iniciales obviamente se debieron a anticuerpos maternos.

Durante el curso de la investigación muy pronto se hizo evidente, que una alta proporción de la mortalidad en los bovinos, ocurrida en las fincas bajo investigación, era ocasionada por fallas en el manejo de los animales, debidas principalmente a los bajos estándares de educación, a la falta de idoneidad del personal de la finca y, a un factor usualmente muy subestimado, una carencia total de motivación de los trabajadores responsables de esta labor. Las intervenciones rutinarias como castraciones, asistencia en los partos, tratamiento de las heridas, etc. estaban a cargo del personal, a menudo utilizando métodos arcaicos (la castración con un cuchillo corriente) y sin observar los principios básicos de higiene. En algunas fincas, por ejemplo, los toros eran castrados a la edad de 2 a 3 años, sin anestesia ni tratamiento quirúrgico de las heridas, como la ligadura de los vasos sanguíneos, aplicándose sólo en ocasiones el tratamiento antiséptico. En consecuencia, no fue sorprendente el que se registraran muertes debidas a hemorragia en la cavidad abdominal y algunas por edema maligno, ocurrido después de la castración. En estos casos, las pérdidas económicas fueron relativamente altas puesto que los animales ya de por sí representaban un valor considerable.

El grupo de edad entre los 18 y los 36 meses se encontraba además expuesto a un peligro agudo de enfermedades bacterianas contagiosas, tales como pasteurelosis y carbón sintomático. En la mayoría de las fincas vacunan regularmente contra estas condiciones, aunque muchas de ellas no se adhieren a la recomendación de revacunación. Podría exigirse la tipificación de la *Pasteurella* que se presenta en algunos predios.

En los bovinos del área bajo investigación se encontraron tasas de mortalidad relativamente altas. Si las tasas observadas en aquellas fincas sólo durante seis meses, se multiplican por dos y éste resultado se adiciona a las de los predios con 12 meses de observación, se obtienen las siguientes tasas promedio de mortalidad para tres grupos de edad diferentes:

- terneros, hasta 10 meses: 7.3%
- animales jóvenes, hasta 2 años: 4.3%
- animales mayores de 2 años: 3.1%

Se presentó un total de cuatro casos de muertes por infección con hemoparásitos; todos ocurrieron en terneros lactantes. Dentro de este grupo fue posible llegar a un diagnóstico ó al menos descartar los hemoparásitos como causa posible en 25 casos de mortalidad, por lo tanto, el 16% se debió a ellos. Con base en la tasa general de mortalidad de terneros del 7.3%, se deduce que el 1.2% de los terneros en el área de investigación murió por esta razón (*A. marginale*, *B. bovis*, *T. vivax*) durante un período de 12 meses. No se pudo comprobar la significancia estadística de éste estimativo dada la escasez de datos. La cifra real probablemente es más alta ya que las causas de la muerte siempre son difíciles de identificar bajo condiciones de campo.

Por esta razón, posteriormente se realizó una investigación sobre hemoparásitos a través del estudio

longitudinal mencionado. Las infecciones con estos organismos se diseminaron ampliamente en Córdoba puesto que en éste departamento los bovinos están expuestos durante todo el año a un gran número de ectoparásitos hematófagos. Por lo general se subestima la importancia de este fenómeno en sí y su efecto en la productividad. Los pastos que están ampliamente sujetos a inundaciones regulares en las épocas de lluvia, constituyen campos ideales para la reproducción de *Culicidae*, *Tabanidae* y *Simuliidae*. Sin embargo, las medidas que se tomaron en todas las fincas para controlar los ectoparásitos fueron diseñadas y aptas para actuar sólo en aquellos que tuvieran el hábito de permanecer sobre el huésped durante largos períodos, en especial *Haematobia* y garrapatas. Es muy difícil y costoso controlar los insectos que se quedan en el huésped por períodos muy cortos. En el área de operación de ésta investigación se identificaron ocho especies diferentes de ectoparásitos.

Los resultados de la presente investigación, en lo que se refiere al estado epidemiológico de las infecciones con *Anaplasma* y *Babesia* concuerdan con los obtenidos por Tropberger (1987) (las fincas Nos. 1 y 12 del estudio de Tropberger son idénticas a la Ganga y al Diluvio). Existe una concordancia total en cuanto a la evaluación cualitativa de la situación; ligeras desviaciones cuantitativas se explican por las diferencias en el procedimiento diagnóstico (demostración serológica o microscópica de la infección), tamaño de la muestra, tiempo y lugar de la colección de las mismas.

Los efectos de la infección con *A. marginale* (tasas de parasitemia, hematocrito, condición física, piel y pelaje) fueron más pronunciados durante el mes en el cual la infección se había vuelto patente, mientras que el pico de la infestación con garrapatas había sido en el mes anterior (Tabla 2.7 a 2.10). Esto puede tomarse como evidencia del papel que desempeñan otros artrópodos y el período de incubación relativamente largo de la anaplasmosis en su transmisión.

En los casos de *B. bigemina* y *B. bovis*, las tasas de infestación por garrapatas aumentaron significativamente durante el mes de la primera infección (Tabla 2.10). El hecho que Tropberger (1987) no hubiera podido demostrar una correlación entre las medidas de control de garrapatas aplicadas y el grado de infestación de las mismas, aunque hubo una correlación negativa entre el control de garrapatas y la tasa de mortalidad, se debe probablemente a que la mayoría de los ganaderos no efectúan el control de una manera regular y sistemática, sino basados en la necesidad aparente (número de garrapatas ingurgitadas visibles en los animales).

En general, se puede asumir una estabilidad endémica de *B. bovis* en la región. Sin embargo, existen excepciones a la regla. Por ejemplo, en las fincas Danubio y San Miguel, las tasas de inoculación para *B. bovis* estaban por debajo del límite asumido por Smith (1984) para indicar estabilidad endémica. Ambas fincas tienen hatos con niveles relativamente altos de genes exóticos y probablemente por esta razón aplican baños de inmersión a su ganado regularmente cada dos semanas, en cualquier caso con más frecuencia y regularidad que en las otras fincas bajo investigación. Esto confirma la influencia conocida del control de garrapatas en la estabilidad endémica.

Es relativamente fácil y seguro demostrar *B. bovis* en frotis de cerebro como la causa de muerte, empleando la técnica descrita por Hadani et al. (1982). Por lo general, no existe otra posibilidad bajo condiciones de campo, ya que los animales que se alimentan de carroña (buitres en Córdoba) normalmente se han comido la mayor parte de las canales antes de la llegada del veterinario. Sólo se observó una muerte debida a *B. bovis* durante el período de investigación. Esta ocurrió en un ternero de 19 días con un alto nivel de genes exóticos, proveniente de una finca con bajos estándares de higiene y una fuerte fluctuación en el número de bovinos.

En todas las fincas examinadas se encontró *T. vivax*; se presentaron varios brotes de la enfermedad coincidiendo con períodos de presencia masiva de *Tabanus nebulosus*.

En varias fincas se encontró esporádicamente *T. theileri*. Por otra parte, fue posible demostrar la ocurrencia en el área de un tripanosoma de 120 micrones de longitud, morfológicamente similar a aquel llamado *T. ingens* por algunos investigadores y que, hasta donde tiene conocimiento el autor, no se ha descrito aún su ocurrencia en Colombia. Esporádicamente se encontraron *Microfilaria* y *Eperythrozoon* en la sangre de terneros.

En el área bajo consideración, la probabilidad de infectarse los bovinos con hemoparásitos es tan alta, que es muy probable que los terneros estén en contacto con los varios agentes para la época en que ellos están protegidos por anticuerpos maternos o por otros mecanismos (Levy, et al. 1982). En consecuencia, las muertes ocasionadas por hemoparásitos fueron escasas y las pérdidas económicas por lo tanto bajas, en particular, porque la mayor parte del grupo de terneros lacruado no representa mucho valor para el ganadero de la región. Por esta razón, las campañas de vacunación parecen no tener sentido y se podrían evitar (Mahoney, 1972). La única intervención hecha hasta ahora en la región es el tratamiento con acaricidas, lo cual puede alterar significativamente la situación epidemiológica respecto a dos de las especies de hemoparásitos encontradas. Es obvio que las aplicaciones de acaricidas realizadas frecuentemente, a la vez que pueden no ser suficientes para erradicar las garrapatas, pueden trastornar el balance epidemiológico y ocasionar inestabilidad endémica.

4. RESUMEN

En la región de la costa atlántica colombiana durante un estudio de campo se observaron la prevalencia, los efectos clínicos y la significancia relativa de los hemoparásitos bovinos.

Las tasas promedias anuales de mortalidad en cuatro fincas fueron 7.3% en terneros de 0-10 meses de edad, 4.3% en animales jóvenes de 11-24 meses y 3.1% en bovinos adultos.

Las causas más frecuentes de muerte fueron complicaciones después de la castración, distocias y heridas originadas por accidentes con subsecuente sacrificio. Cuatro de los 25 casos de mortalidad se debieron a los hemoparásitos *A. marginale* (n=2), *B. bovis* (n= 1) y *T. vivax* (n= 1) en terneros de hasta 10 meses de edad.

Además, en la sangre de los bovinos se detectaron *E. wenyoni*, *B. bigemina*, *T. theileri*, *T. ingens* y *Microfilaria spp.*

Se examinaron frotis delgados de sangre de 91 terneros provenientes de cuatro fincas de referencia, mensualmente hasta una edad de 8 meses. Las tasas de infección de *A. marginale* fluctuaron desde 88.2% hasta 100% y aquellas de *B. bigemina* de 64.7% a 91.2%. Así, ambas infecciones fueron endémicas en los predios arriba mencionados.

Se analizaron (IFAT) las muestras de suero de 167 terneros de 7 fincas para anticuerpos contra *B. bovis*. En tres de estos predios las tasas de inoculación de este hemoparásito fueron 0.0004 y 0.0039, indicando inestabilidad endémica. En las otras cuatro fincas, las tasas de infección con *B. bovis* oscilaron entre

80% y 100% en terneros de 8 meses de edad. Esto corresponde a las tasas de inoculación de 0.0067 a 0.096 que significan estabilidad endémica.

Las garrapatas se controlaron a intervalos de 14 días ó menos en las fincas con tasas de inoculación de <0.005 para *B. bovis*. La infestación promedio por garrapatas fue significativamente más baja ($p < 0.001$) en éstas fincas que en las otras donde se aplicaron tratamientos con acaricidas a intervalos de 21 días o esporádicamente. Las tasas de inoculación fueron >0.005 en estos predios. La prevalencia de *A. marginale* no estuvo influenciada por el control de garrapatas o por el grado de infestación de las mismas.

Los aumentos significativos en las tasas de infestación con garrapatas ($p < 0.001$) coincidieron con las tasas más altas de infección con *Babesia* spp., mientras que la incidencia de la infección por *A. marginale* presentó su pico un mes después de haberse observado el de la infestación con garrapatas.

No se observaron efectos clínicos debidos a infecciones con hemoparásitos, excepto aquellas por *A. marginale* que produjeron un descenso significativo en los valores del volumen celular ($p < 0.001$), en la condición física ($p < 0.03$), y de la condición de la piel/pelaje ($p < 0.003$).

ANEXO 1

DETALLES SOBRE LAS MUERTES OBSERVADAS

FINCA DANUBIO

Fecha	Edad (m)	Raza	Historia	Hallazgos	Diagnóstico
02/06/87	3	C	Subalimentación tratado	Hematocrito 19%, Anaplasmosis parasitemia de 1% anaplasma	
30/06/87	6	C/Cr	"Huequera", tratado	Secreción fibrinosa (membrana) del ano	
04/07/87	30	C	Prolapso del útero ternero 45kg		Distocia; hemorragia
17/07/87			Ternero muerto después parto		
19/07/87	1	PS/Cr	Decúbito diarrea, tratado	Hematocrito 14%, onfalitis, neumonía	Onfalitis metastasis purulenta
16/08/87			Ternero muerto después parto		
26/08/87	0	PS/Cr	Ternero nació ciego	Ciego, anémico	Sub-nutrición
7/10/87	36	C	Secreción amarillenta nariz		Pasteurelosis
30/10/87	7	C	Débil	Hematocrito 19% T. vivax	Tripanosomiasis

FINCA DILUVIO

09/10/86	8	PS/Cr	Accidente	Fractura del húmero	Sacrificio emergencia
21/11/86	84	Cr		Necrosis de la laringe	Miasis

Continuación ...

FINCA DILUVIO

Fecha	Edad (m)	Raza	Historia	Hallazgos	Diagnóstico
02/01/87	3	H/Cr	Debilidad general		
12/01/87	2	C	Espasmos tónico clónicos	Colitis severa y apendicitis	Intoxicación por acaricidas
07/02/87	144	Cr	Decúbito, estéril por 3 años	Endocarditis valvular fibrosa; nefritis amiloidea	Debilidad, vejez
11/02/87	24	PS/Cr		Parálisis laringea	Sacrificio
12/03/87	2	H/Cr	Anemia, meteorismo del rumen, diarrea	Rumenitis hematocrito 14%, parasitemia de 20% anaplasmas	Anaplasmosis
25/03/87	72	H/Cr	Emaciado, debilidad durante último día		
15/04/87	4	Cr	Meteorismo		
13/05/87	20	Z	Somnolencia últimas 24 horas	Areas atelectásicas en ambos pulmones; pocas B.bovis en frotis cerebro	Pasteurellosis
14/05/87	0	Sl	Lesiones en ombligo por bultres	Anemia; coágulo sangre ombligo	Hemorragia
24/06/87	0	Sl/Cr	Debilidad nacimiento intento de alimentar biberón	Marasmo	Deshidratación subnutrición
04/07/87	36	Sl/Cr	Fractura cuerno	Seno frontal abierto; parálisis	Sacrificio emergencia

Continuación ...**FINCA DILUVIO**

Fecha	Edad (m)	Raza	Historia	Hallazgos	Diagnóstico
23/07/87	36	Cr	Robo	Se encontraron cola y patas	Sacrificio
10/08/87	18	C		Feto autolítico	Distocia endotóxicos
0/08/87	0	C		Autolítico	Distocia hipoxia
05/09/87	0	Cr		Membrana serosa y yeyuno con decoloración rojiza	
05/09/87	20	Si	Asistencia al parto		Distocia
11/09/87	60	H/Cr	Asistencia al parto		Distocia Septicemia
22/10/87	3	Si	Enfermo 4 días. Temperatura 41.7 °C	Sangre/fibrinosa coágulo en el cuello	Trauma latrogénico
06/11/87	3	Si/Cr	Subnutrición		

FINCA LAS MERCEDES

02/03/87	2	PS	Enfermo tetraciclina atropina	Obstrucción fibrinosa vasos sanguíneos y cavidad cardíaca	Falla cardíaca
15/07/87	6	C			
3/08/87					

Continuación ...

FINCA SAN MIGUEL					
Fecha	Edad (m)	Raza	Historia	Hallazgos	Diagnóstico
26/01/87	1	C	No aceptado por la madre		Subnutrición
05/02/87	3	PS/C		41.2 °C; sonidos anormales fuertes del pulmón	Bronco-neumonía
09/03/87	8	Cr	Mordedura culebra?		
24/03/87	0	C	Intento alimentar con biberón		Subnutrición
25/06/87	0	PS/C	Nació débil y flaco		Debilidad perinatal
02/07/87	18	C	Accidente a la castración	Fractura del fémur	Sacrificio emergencia
17/08/87	60	PS/Cr			
26/08/87	24	Ha/C	Ahogado		Accidente
03/09/87	18	Z/Cr	Moco de nariz/boca		
10/09/87	0		No lacta		Debilidad perinatal
12/09/87	4				
05/10/87	72	C	Fractura cuerno, miasis		Sacrificio emergencia
06/10/87	2	H/C	Accidente		
07/10/87	18	C	Muerte repentina		
31/10/87	84	C	Complicación al parto	Pelvis estrecha	Distocia
31/10/87	0	C	Ver arriba	Ver arriba	Distocia; asfíxia

Continuación ...

FINCA SAN MIGUEL

Fecha	Edad (m)	Raza	Historia	Hallazgos	Diagnóstico
07/11/87	10	H/C	Enfermedad aguda por varias horas; tratamiento tetraciclina	35.7 °C; músculo glúteo inflamado y crepitación; bacterias gram-positivas; esporas	Carbón Sintomático
09/11/87	48	C	Prolapso del útero y del recto en conexión con distocia		Prolapso visceral
11/11/87	144	Ha	Tratamiento constipación		
28/11/87	36	C	Prolapso visceral en conexión con distocia		Sacrificio emergencia

OTRAS FINCAS (visitas ocasionales atendiendo llamada)

03/02/87	2	PS/C	Enfermo 4 días	Neumonía purulenta enfisema subcutáneo	Bronco-neumonía
13/02/97	14	H	Débil	41.4 °C, sonidos fuertes anormales del pulmón	Bronco-neumonía
19/12/86			Edema de la papada		
13/01/87	2	PS/Cr	Diarrea; Sulfonamida	Ligero edema pulmonar; bacterias en capilares de cerebro	
21/01/87	1	PS/Cr	Meteorismo tos, somnolencia. Tratamiento con sulfonamida	Bilis espesa y turbia; cerebro: muchos B. bovis	Babesiosis

Continuación ...**OTRAS FINCAS (visitas ocasionales atendiendo llamada)**

Fecha	Edad (m)	Raza	Historia	Hallazgos	Diagnóstico
30/01/87			Somnolencia;	Cerebro negro	
11/02/87	4	C	Hematuria	40.9 °C; secreción sanguínea/purulenta de la vagina	Nefritis purulenta
19/02/87	31	C	Secreción sanguinolenta de la boca y el ano		Pasteurelosis
24/02/87	18	C	Disnea	Edema de la papada; hemorragia de la membrana serosa, Pasteurella en cultivo	Pasteurelosis
10/04/87			Mordedura culebra		
11/06/87	2	H/Cr	Flaco, piel áspera		
08/07/87	60	C/Cr	Accidente	Fractura húmero	Sacrificio emergencia
09/07/87	20	C	Castración el 8/7	Coágulo sangre en cavidad abdominal	Hemorragia
09/07/87	20	C	Castración el 8/7	Coágulo en la cavidad abdominal	Hemorragia
15/07/87	20	C	Castración el 8/7	Tumefacción dura región umbilical	Edema Maligno
15/07/87	20	C	Castración el 8/7	Tumefacción dura región umbilical	Edema Maligno

Continuación ...

OTRAS FINCAS (visitas ocasionales atendiendo llamada)

Fecha	Edad (m)	Raza	Historia	Hallazgos	Diagnóstico
15/07/87	20	C	Castración el 8/7	Tumefacción dura región umbilical	Edema Maligno
16/07/87	20	C	Edemas fuertes nariz y cuello		Pasteurelisis?
22/08/87	24	C	Tos; del mismo hato arriba mencionado		Pasteurelisis
26/08/87	24	C	Robado		Sacrificio
28/09/87	18	C	Castración	Edema abdominal	Edema Maligno
28/09/87	18	C	Castración	Edema abdominal	Edema Maligno
21/10/87	18	C	Murieron 6/60 novillos de engorde comprados	Tráquea enrojecida petequias en el yeyuno	Pasteurelisis
04/11/87	2	PS/Cr	Subalimentación		
05/11/87	30	C	Castración	Tumefacción dura región abdominal baja, cocos	Edema Maligno
06/11/87	9	Cr	Inyección creolina músculo hombro	Tumefacción crepitante brazuelo	Carbón Sintomático
07/11/87	2	H/Cr	No lacta	Pelobozoar en rumen; ictericia	Constipación

Continuación ...

OTRAS FINCAS (visitas ocasionales atendiendo llamada)

Fecha	Edad (m)	Raza	Historia	Hallazgos	Diagnóstico
13/11/87	30	C	Ver 21/10, otro caso mismo hato		Pasteurellosis
13/11/87	48	PS	Accidente		Sacrificio emergencia
03/12/87	3	H/Z	Hematocrito 10%, terramicina, ganaseg	Ictérico, hematocrito 8%; parasitemia A. marginale 5%	Anaplasmosis
04/12/87	18	C	Incapacidad levantarse 4 días	Edemas, pielo- nefritis fibrosa crónica	Uremia

Abreviaturas:

Cr : Criollo
Ha : Hartón del Valle
H : Holstein
PS : Pardo Sulzo
SI : Simmental
C : Cebú

**V. INVESTIGACIONES SOBRE LA EPIDEMIOLOGIA DE LAS
HEMOPARASITOSIS EN FINCAS PRODUCTORAS DE LECHE EN LOS
DEPARTAMENTOS DEL VALLE Y DEL QUINDIO (COLOMBIA)**

Por

Dr. Rita Zintz

**La Discusión, Conclusiones y Resumen fueron elaborados
conjuntamente con el Dr. Ewald Otte.**

**Extractado de: Untersuchungen zur Epidemiologie der Haemoparasitosen in
milchproduzierenden Betrieben in Valle und Quindío (Kolumbien).
Dissertation, Hannover, 1990.**

INDICE DE CONTENIDO

	Página
1. MATERIALES Y METODOS	125
1.1 Información general	125
1.2 Exámenes del hato en las fincas	125
1.3 Exámenes de laboratorio	128
1.4 Serología	128
1.4.1 Ejecución de las pruebas serológicas	129
1.4.1.1 IFAT	129
1.4.1.2 CAT (prueba de aglutinación en tarjeta)	130
1.4.1.3 ELISA	130
2. RESULTADOS DE LAS INVESTIGACIONES DE CAMPO	130
2.1 Hato 1	130
2.1.1 Hallazgos microscópicos y resultados de las pruebas serológicas para <i>B. bovis</i> , <i>A. marginale</i> y <i>B. bigemina</i>	130
2.1.1.1 Prevalencia	130
2.1.1.2 Incidencia	133
2.1.2 Manifestaciones clínicas de las hemoparasitosis	133
2.1.3 Datos sobre el clima, infestación por garrapatas y tratamientos con acaricidas	134
2.1.4 Costos de los tratamientos con acaricidas	134
2.2 Hato 2	134
2.2.1 Hallazgos microscópicos y resultados de las pruebas serológicas para <i>B. bovis</i> , <i>A. marginale</i> y <i>B. bigemina</i>	134
2.2.1.1 Prevalencia	134
2.2.1.2 Incidencia	135
2.2.2 Manifestaciones clínicas de las hemoparasitosis	135
2.2.3 Datos sobre el clima, infestación con garrapatas y tratamientos con acaricidas	135
2.2.4 Costos de los tratamientos con acaricidas	138
2.3 Hato 3	139
2.3.1 Hallazgos microscópicos y resultados serológicos para <i>B. bovis</i> , <i>A. marginale</i> y <i>B. bigemina</i>	139
2.3.1.1 Prevalencia	139
2.3.1.2 Incidencia	139
2.3.2 Manifestaciones clínicas de las hemoparasitosis	142
2.3.3 Datos sobre el clima, infestaciones con garrapatas y tratamientos con acaricidas	142
2.3.4 Costos de los tratamientos con acaricidas	143
2.4 Hato 4	143
2.4.1 Hallazgos microscópicos y resultados serológicos para <i>B. bovis</i> , <i>A. marginale</i> y <i>B. bigemina</i>	143
2.4.1.1 Prevalencia	143
2.4.1.2 Incidencia	145

	Página
2.4.2 Manifestaciones clínicas de las hemoparasitosis	147
2.4.3 Datos sobre el clima, infestación de garrapatas y tratamientos con acaricidas	147
2.4.4 Costos de los tratamientos con acaricidas	148
2.5 Incidencia, tasas de inoculación e infección en terneros	148
3. DISCUSION	150
3.1 Metodología	150
3.2 Situación de las cuatro fincas	150
3.2.1 Clima, infestación con garrapatas y tratamientos con acaricidas	150
3.2.2 Efectos de las hemoparasitosis y situación epidemiológica en las fincas	153
3.2.2.1 Finca 1	155
3.2.2.2 Finca 2	157
3.2.2.3 Finca 3	158
3.2.2.4 Finca 4	160
4. CONCLUSIONES	161
5. RESUMEN	163

INDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1.1	Sistemas de manejo animal en las cuatro fincas126
TABLA 1.2	Datos de producción en las cuatro fincas del Valle y el Quindío127
TABLA 1.3	Composición de los grupos de animales investigados128
TABLA 1.4	Resultados de la prueba de control IFAT129
TABLA 2.1	Manifestaciones clínicas de hemoparasitosis en el hato 1133
TABLA 2.2	Manifestaciones clínicas de hemoparasitosis en el hato 2138
TABLA 2.3	Manifestaciones clínicas de las hemoparasitosis142
TABLA 2.4	Manifestaciones clínicas de las hemoparasitosis147
TABLA 2.5	Incidencia, tasas de inoculación y de infección149
TABLA 3.1	Tasas de infestación con garrapatas en las fincas: Número promedio garrapatas/animal (todos los estadios/hembras ingurgitadas)154
TABLA 3.2	Datos sobre tratamientos con acaricidas, desde septiembre, 1988 hasta julio, 1989155
TABLA 3.3	Número de seroconversiones relacionadas con la edad en meses158
TABLA 3.4	Manifestaciones clínicas de las hemoparasitosis observadas en las cuatro fincas (casos en %)159
TABLA 3.5	Resumen de las tasas de infección e inoculación159
TABLA 3.6	Algunas características de las fincas posiblemente relacionadas con la morbilidad y la mortalidad debidas a las hemoparasitosis162
TABLA 3.7	Número de seroconversiones relacionado con los grupos por edad162

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1	Hato 1. Resultados de parasitemias e IFAT131
FIGURA 2	Hato 1. Resultados de parasitemias e IFAT132
FIGURA 3	Hato 2. Resultados de parasitemias e IFAT136
FIGURA 4	Hato 2. Resultados de parasitemias e IFAT137
FIGURA 5	Hato 3. Resultados de parasitemias e IFAT140
FIGURA 6	Hato 3. Resultados de parasitemias e IFAT141
FIGURA 7	Hato 4. Resultados de parasitemias e IFAT144
FIGURA 8	Hato 4. Resultados de parasitemias e IFAT146
FIGURA 9	Datos sobre el clima, infestaciones con garrapatas e intervalos del tratamiento efectuado al hato151
FIGURA 10	Datos sobre el clima, infestaciones con garrapatas e intervalos del tratamiento acaricida efectuado al hato152

1. MATERIALES Y METODOS

1.1 Información general

La presente investigación se realizó en dos fincas, situadas en el Departamento del Valle y dos en el departamento del Quindío, Colombia, entre agosto de 1988 y julio de 1989. En estas áreas los grados de intensidad y los estándares de producción y manejo son altos comparados, por ejemplo, con los de la región de la costa Atlántica de Colombia. En estos dos departamentos los niveles de genes exóticos son relativamente elevados en los hatos bovinos y la leche constituye un elemento importante -si no el único- en las metas de producción de muchas de las fincas. En general, las cuatro fincas fueron representativas del sector progresista, no tradicional de la producción bovina en la Colombia sub-tropical, aún en términos geográficos, ya que tres de ellas estaban localizadas en uno de los fértiles y bien desarrollados valles del río Cauca y la otra a una altitud moderada con tendencia a la producción de café, donde el gobierno está estimulando la diversificación hacia la producción de leche.

Las dos fincas, en el departamento del Valle (designadas en adelante como Nos. 1 y 2), estaban ubicadas en los municipios de Palmira (No. 1) y la Candelaria (No. 2), mientras las otras dos estaban situadas en las comunas de Circasia (No. 3) y Tebaida (No. 4), en el norte y sureste del departamento del Quindío respectivamente.

En la Tabla 1.1 se resumen los sistemas de manejo animal aplicados en las cuatro fincas, en particular el levante de terneros, dada su importancia básica para el desarrollo de inmunidad y estabilidad endémica; las características generales de las fincas se detallan en la tabla 1.2.

1.2 Exámenes del hato en las fincas

En cada una de las fincas se conformaron tres grupos de animales de referencia, marcados en la oreja, es decir un grupo de terneros (hasta aproximadamente 12 meses de edad), uno de novillas de reproducción y otro de vacas. En la Tabla 1.1 se explica la forma en que eran manejados los animales.

En las fincas 1 y 2, los grupos de terneros establecidos en la primera visita se mantuvieron tan constantes como fue posible durante todo el año de la investigación. En las fincas 3 y 4 se examinaron los terneros de 2 a 4 meses de edad que estaban disponibles y en las visitas siguientes se adicionaron al grupo todos los terneros que habían alcanzado esta edad en el transcurso de ese tiempo (Tabla 1.3).

En las fincas 1, 3 y 4 se mantuvo invariable el número de animales y los miembros de los grupos de novillas y el de las vacas; en la finca 2, la composición de estos grupos fue un poco inestable y en el de las vacas, el encargado de finca por razones técnicas, decidió intercambiar durante el curso de la investigación sus vacas Holstein por aquellas de raza Hartón del Valle. Además de esto, la abrumadora mayoría de los bovinos en las fincas 1, 2 y 3 eran Holstein Friesian, mientras que en la 4 por lo menos uno de los progenitores de la generalidad de los animales era de ésta raza.

TABLA 1.1 SISTEMAS DE MANEJO ANIMAL EN LAS CUATRO FINCAS*

FINCA No.			
1	2	3	4
1er.día con la madre; hasta día 75 en compartimientos individuales; luego en grupo en establos con corrales y acceso al pasto durante varias horas c/día; no pastaje para novillas reproductoras; vacas casi todo el tiempo en establos abiertos.	Hasta el día 3 con la madre; hasta día 100 en compartimientos individuales hasta día 180 en grupo en el establo con corrales; hasta el primer parto en pasto; vacas casi todo el tiempo en establos abiertos.	Hasta el día 3 con la madre; hasta día 90 en compartimientos individuales; hasta día 240 en grupo en establo, pero acceso al pasto desde el día 104; después tiempo completo en pastaje.	Todo el tiempo desde el nacimiento en pastaje.

* Sólo las fracciones lecheras del hato

Las fincas se visitaron y los terneros de referencia se sangraron a intervalos de un mes, las vacas y las novillas cada tres meses. Se tomó sangre (con y sin anticoagulante) de la vena yugular y también de la punta de la cola, cuando se hicieron frotis delgados y preparaciones de gota gruesa. Además, se registraron la temperatura corporal, el peso (medido con cinta métrica), las fechas de aplicaciones de acaricidas, el tipo, la cantidad y la concentración de los acaricidas usados y el número de animales tratados; los datos referentes al clima se sacaron de la literatura disponible. También se registró la información sobre las posibles manifestaciones clínicas de las enfermedades hemoparasitarias y su grado de severidad, al igual que los métodos de diagnóstico; el tratamiento aplicado y el tipo de educación de la persona responsable de estas labores fueron suministrados por el personal de la finca. En un número considerable de casos se logró consultar a los veterinarios que habían sido llamados por los ganaderos. Donde fue posible se interrogó a más de una persona. Sólo en pocas ocasiones se había confirmado el diagnóstico por examen microscópico.

Todos los animales se examinaron para averiguar la presencia y el número de garrapatas, mediante palpación de un lado de su cuerpo y conteo de las hembras ingurgitadas (> 4.5 mm de longitud) (Anon, 1984a) y también de aquellos estadios inmaduros (<4.5 mm) que eran fáciles de palpar y estaban visibles. Las cifras obtenidas para ambas categorías se multiplicaron luego por dos para establecer la carga de garrapatas por animal.

TABLA 1.2 DATOS DE PRODUCCION EN LAS 4 FINCAS DEL VALLE Y EL QUINDIO

	Finca 1	Finca 2	Finca 3	Finca 4
Departamento	Valle	Valle	Quindío	Quindío
Altitud, m	920	910	1,780	1,040
Tamaño, ha	160	228	170	173
Bovinos				
No. Total	1500	2000	150	290
Ganado leche	1300	2000	120	74
Ganado carne	200	-	30	216
Razas, leche	H*	H 90% HaV 10%***	H	H/C**
Razas, carne	C****	-	C	C
Estructura				
Hatos Lecheros:				
Vacas	600	1,100	86	30
Novillas reproducción	400	300	18	22
Terneros	300	600	16	22
Toros	3	4	1	-
Hatos carne:				
Vacas	100	-	-	30
Novillas reproducción	-	-	-	13
Terneros	100	-	30	173
Toros	1	-	-	-
Meta Producción	leche,carne	leche	principalmente leche	leche,carne
Reproducción				
No. vacas por IA	500	1,100	43	30
No. vacas monta natural	100	-	43	-
Ventas, vacas/año	50	100	3	-
Compras, vacas/año	-	intercambio animales entre diferentes fincas del propietario	raro, pocas, de la región	raro, pocas, de la región
Producción				
Leche/vaca/lactancia kg	3,840	3,000	2,914	2,700
Período promedio lactancia días	320	305	310	300
Tasa nacimientos vivos (%)	96	82	88	90
No. promedio mortalidad/a				
Terneros	-	72	1	4
Novillas preñadas	1	12	3	?
Vacas	12	22	1	1
Principales problemas	Garrapatas y hemoparásitos	Abortos, hemoparásitos	Infértil, accidentes en pastoreo	Accidentes en pastoreo

* H = Holstein-Friesian
*** HaV = Hartón del Valle

** HC = Holstein x Cebú
**** C = Cebú

TABLA 1.3 COMPOSICION DE LOS GRUPOS DE ANIMALES INVESTIGADOS

Finca	Termeros		Novillas de reproducción		Vacas	
	No.	n	n	n	n	n
1	30-31	3/88-6/88	12	5/87-12/87	12-13	2/85-3/86
2	18-33	5/88-6/88	11-12	6/87-4/88	12-15	5/78-3/85
3	9-20	4/88-5/89	11-12	3/86-12/86	12	1/81-12/86
4	8-23	4/88-5/89	8-10	9/85-8/87	5-12	9/84-4/86

1.3 Exámenes de laboratorio

Las muestras de sangre sin citrato se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su coagulación; después se transfirieron a una caja con hielo (para transportarlas al laboratorio) y a un refrigerador para conservarlas durante la noche. Al siguiente día, se desprendió el coágulo de la pared del tubo y se centrifugó la muestra a 2.700 g y a 4 °C por 15 minutos. El suero se conservó luego a -20 °C.

Las muestras con anticoagulante se utilizaron para determinar el hematocrito.

Los frotis delgados de sangre periférica coloreados con Giemsa se examinaron en aumentos de 450X o 1.000X, utilizando un objetivo Acromat 4X ó 100X y aceite de inmersión. El número de eritrocitos parasitados se determinó en 150.000 eritrocitos. La muestra se consideraba positiva a *A. marginale* cuando las laminillas alcanzaban parasitemias de 10⁴ glóbulos infectados.

Las preparaciones de gota gruesa se hicieron utilizando una asa al tomar la muestra de sangre de la punta de la cola para garantizar el que se pudieran examinar cantidades comparables (Mahoney y Saal, 1961). Las gotas se dejaron secar en una posición estrictamente horizontal, se deshemoglobinizaron y se fijaron en metanol durante por lo menos tres minutos. Después de la fijación, se colorearon durante 35 segundos en solución Naranja-Acrídina al 0.01% y luego se lavaron en solución buffer McIlvanes durante 5 minutos. Cuando se conservaron las preparaciones por un período de 6 a 8 semanas posterior a la fijación y se colorearon únicamente después, los eritrocitos tomaron la forma de discos oscuros contra un campo verde oscuro (modificación según Winter, 1967).

Las preparaciones de gota gruesa se examinaron al microscopio de fluorescencia, a un aumento de 400X ó 1.000X y aceite de inmersión, durante por lo menos 10 minutos cuando no se podían hallar los eritrocitos parasitados.

1.4 Serología

Se utilizó la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT) para demostrar la presencia de anticuerpos

contra *B. bovis*, para *A. marginale* se empleó la prueba de aglutinación en tarjeta (CAT). *B. bigemina* se diagnosticó sólo por evaluación microscópica.

Como antígeno para *B. bovis* se empleó una cepa obtenida en Chinú, Córdoba (Colombia), aislada en el Instituto de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de Hannover y mantenida en cultivo de tejidos. Para preparar el antígeno se utilizó el sedimento de los pasajes 100 y 101 que contenían 5-6% de eritrocitos parasitados.

Los sueros de referencia negativos para *B. bovis* y *A. marginale* se obtuvieron de tres toros jóvenes nacidos y levantados en el norte de Alemania, comprados por el Instituto y los cuales no habían sido utilizados hasta la fecha para inoculación con hemoparásitos.

Los sueros de referencia positivos para *B. bovis* estaban disponibles en el Instituto a raíz de investigaciones previas (Mueller, 1984); además se proporcionó el suero de una novilla recientemente inoculada con un estabilizado-esporozooito de *B. bovis*, tomado los días 14 y 36 post-infección.

Los sueros de referencia positivos a *A. marginale* se obtuvieron de dos novillos de la finca No. 1, tomados 30 días después de haberse observado parasitemias intensas.

1.4.1 Ejecución de las pruebas serológicas

1.4.1.1 IFAT

Se examinó un total de 1.275 sueros para *B. bovis* por el método modificado según lo sugerido por Zuerner (1983) y Mueller (1984), incluyendo su modo de interpretar los resultados. El título IFAT de un suero se tomó como la dilución más alta que se valoró en 3/3, 3/2 ó 2/2 en pruebas paralelas. Se consideraron negativas o sospechosas otras combinaciones.

TABLA 1.4 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE CONTROL IFAT

	n	RESULTADOS			
		negativos	sospechosos	1/10	1/20
Termeros	14	14	0	0	0
Novillas	12	12	0	0	0
Vacas	34	30	0	2	2
Total	60	56	0	2	2

Se examinaron 60 muestras de sueros bovinos que habían nacido y siempre habían permanecido en una finca a 2.650-3.500 m.s.n.m., (libre de garrapatas, según Evans, 1978), con el fin de probar la confiabilidad

del método (Tabla 1.4). Las reacciones de todos los animales a excepción de 4 fueron negativas. Dos de éstos reaccionaron a 1/10 y dos a 1/20. Por esta razón, las de los bovinos de las cuatro fincas bajo investigación se consideraron negativas hasta una dilución de 1/20.

1.4.1.2 CAT (prueba de aglutinación en tarjeta)

Se utilizó la prueba de aglutinación en tarjeta (CAT) (Brewers Diagnostic Kits, Hynson, Westcott y Dunning, Baltimore, Maryland), para la demostración de anticuerpos contra *A. marginale*. Se examinó un total de 1.275 sueros bovinos. La prueba, además del suero a ser examinado para anticuerpos (0.03 ml) y de la suspensión de *A. marginale* (coloreado verde, libre de hemoglobina, 0.015 ml), requiere 0.03 ml de suero bovino negativo (Rose et al., 1974). Los tres componentes se mezclan durante 4 minutos y el resultado tiene que leerse inmediatamente.

1.4.1.3 ELISA

Doherr también examinó un total de 309 sueros, utilizando la prueba de ELISA para anticuerpos de *B. bovis* frente a un antígeno colombiano y a uno australiano; los resultados se compararon con los obtenidos en la prueba IFAT (Doherr, 1990).

2. RESULTADOS DE LAS INVESTIGACIONES DE CAMPO

2.1 Hato 1

2.1.1 Hallazgos microscópicos y resultados de pruebas serológicas para *B. bovis*, *A. marginale* y *B. bigemina*

2.1.1.1 Prevalencia

Terneros (Figura 1)

Al examen microscópico se encontró *B. bovis* en un ternero en marzo (n=30) y en otro en mayo (n=30) con niveles de parasitemia muy bajos; no obstante, sólo uno de los terneros reaccionó positivamente a la prueba IFAT al iniciar su tercer mes de edad.

Para *A. marginale*, la tasa máxima de parasitemia entre septiembre, 1988 y abril, 1989 fue 4/31 y aumentó significativamente en mayo y junio. Hubo una concordancia aceptable con los resultados serológicos correspondientes. Cuatro de los terneros (n = 30) reaccionaron positivamente a la prueba de aglutinación en tarjeta a los 11 meses de edad, pero la tasa de infección se incrementó a 15/30 en el transcurso de los dos meses siguientes.

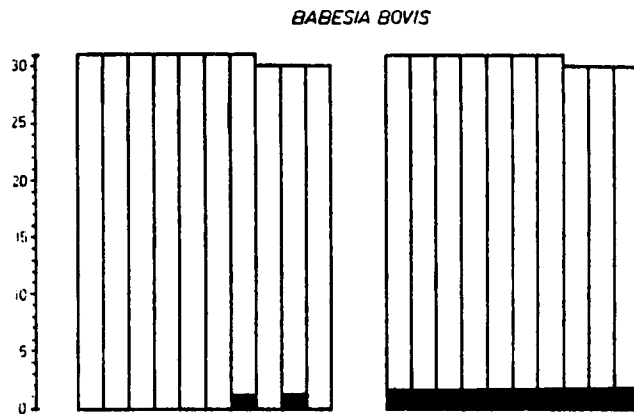
Novillas reproductoras (Figura 1)

Las 12 novillas entre 12 y 20 meses de edad permanecieron negativas a *B. bovis* en lo que respecta a parasitemia y a la prueba IFAT. Todas resultaron positivas a *A. marginale* al examen microscópico, en dos fechas diferentes de muestreo y a la prueba serológica un máximo de dos en tres ocasiones distintas.

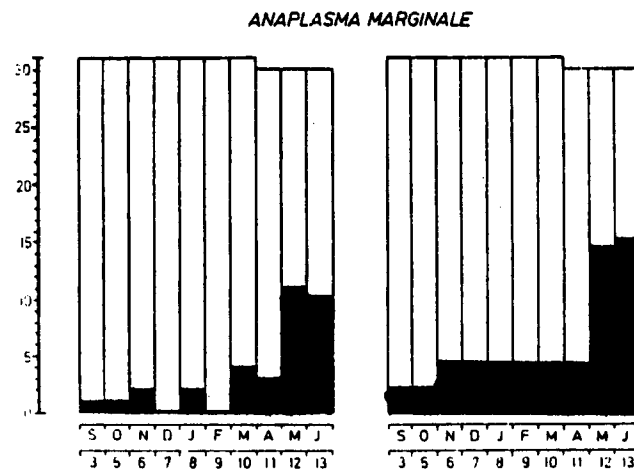
FIGURA 1 HATO 1. RESULTADOS DE PARASITEMIAS E IFAT

Terneros

No. de animales



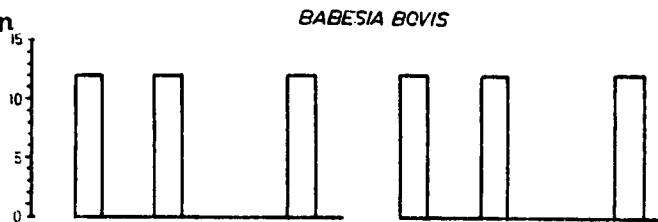
No. de animales



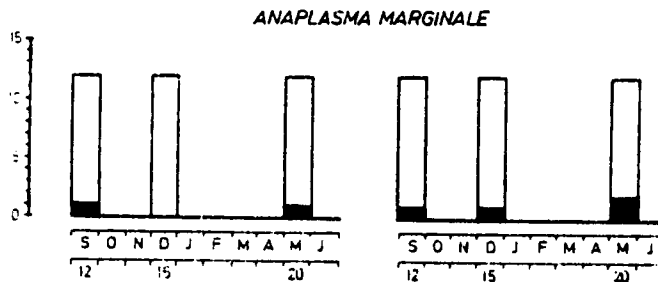
Meses
Edad, m.

Novillas reproducción

No. de animales



No. de animales



Meses
Edad, m.

Parasitemia

Serología

Vacas (Figura 2)

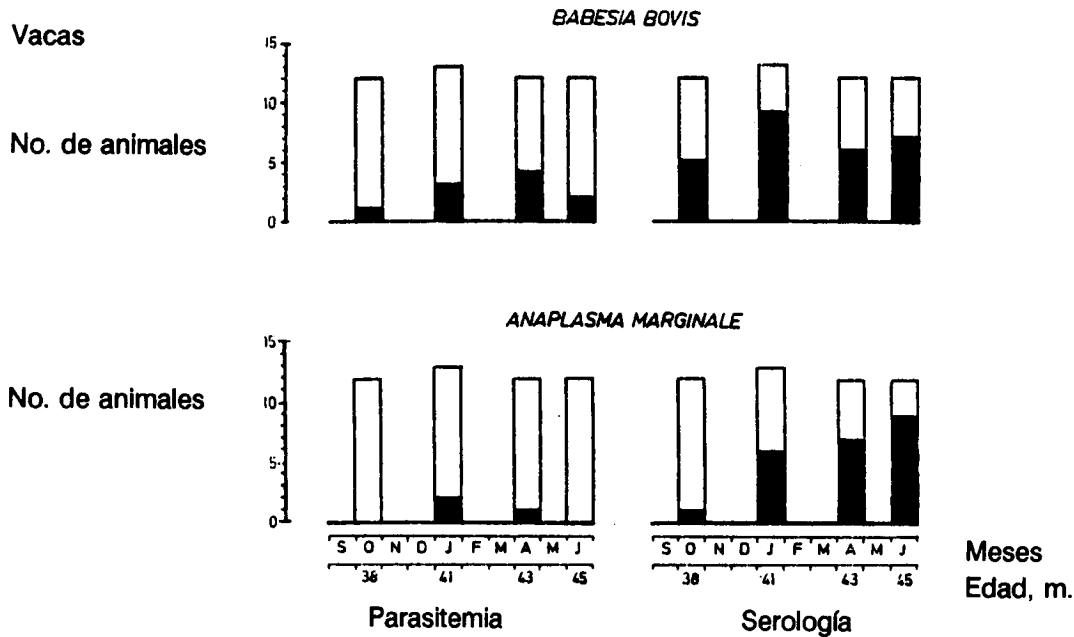
Para *B. bovis*, la tasa más alta de parasitemia se registró en 4/12, la tasa más elevada de seropositivos fue de 9/13.

A. marginale se demostró microscópicamente en enero y abril de 1989 en dos y una vaca respectivamente, de un total de 13 animales; su seroprevalencia se elevó de 1/12 en octubre, 1988 a 9/12 en julio, 1989.

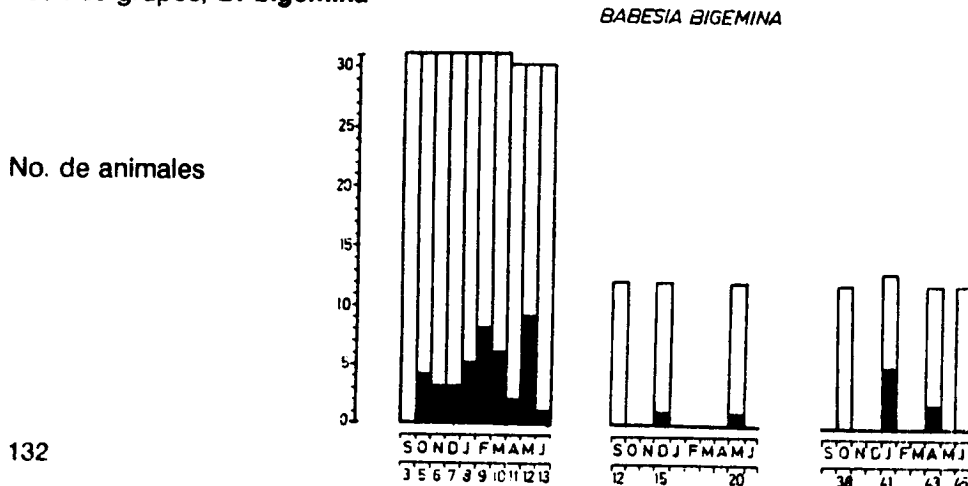
B. bigemina. Terneros, novillas y vacas (Figura 2)

Las tasas más altas de parasitemia de *B. bigemina* se observaron en terneros (9/30 en mayo, 1989) y las más bajas en el grupo de novillas reproductoras (2/12, una en cada uno de los muestreos efectuados en diciembre, 1988 y en mayo, 1989), ocupando las vacas una posición intermedia.

FIGURA 2 HATO 1. RESULTADOS DE PARASITEMIAS E IFAT



Los tres grupos, B. bigemina



2.1.1.2 Incidencia

Se logró demostrar seroconversiones de **B. bovis** en tres vacas de 40-46 meses de edad.

Para **A. marginale** se observaron seroconversiones en 22 animales de 5 a 52 meses de edad. En mayo, se presentaron 11/22 seroconversiones para **B. bovis** y **A. marginale** en terneros entre 11 y 13 meses de edad.

2.1.2 Manifestaciones clínicas de las hemoparasitosis

En ésta finca, la morbilidad debida a hemoparásitos fue de 15.4% en el transcurso de 10 meses; la mortalidad fue insignificante (0.08%).

Las manifestaciones clínicas fueron más frecuentes en el grupo de novillas (146 casos, 36.5%), seguido por el de las vacas (46 casos, 7.7%). Los terneros fueron los que menos sufrieron (7 casos, 2.3%). El único caso con resultado fatal se presentó en el grupo de las novillas. En este grupo las manifestaciones clínicas se acumularon en los meses de marzo, mayo y junio (Tabla 2.1).

En siete casos, cuando se sospechaba que la hemoparasitosis había resultado en enfermedad clínica aguda, se pudo identificar **B. bovis** como el agente causal, en cinco casos fue **B. bigemina** ó **A. marginale**. Las parasitemias de **B. bovis** fueron bajas (0.001% a 0.004%; sólo en un caso se observó una parasitemia de 0.03%). Los animales que estaban afectados por **A. marginale** tuvieron parasitemias de 0.2 a 5.1%.

TABLA 2.1 MANIFESTACIONES CLINICAS DE HEMOPARASITOSIS EN EL HATO 1

1988/89	Terneros (n=300)		Novillas reproducción (n=400)		Vacas (n=600)	
	Morbilidad n/ %	Mortalidad n/ %	Morbilidad n/ %	Mortalidad n/ %	Morbilidad n/ %	Mortalidad n/ %
Agosto	3/1.0	0/0.0	3/0.8	0/0.0	5/0.8	0/0.0
Septiembre	3/1.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	14/2.3	0/0.0
Octubre	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	9/1.5	0/0.0
Noviembre	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	7/1.2	0/0.0
Diciembre	0/0.0	0/0.0	4/1.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Enero	0/0.0	0/0.0	4/1.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Febrero	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Marzo	0/0.0	0/0.0	35/8.8	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Abril	1/0.3	0/0.0	0/0.0	0/0.0	5/0.8	0/0.0
Mayo	0/0.0	0/0.0	40/10.0	1/0.2	2/0.3	0/0.0
Junio	0/0.0	0/0.0	60/15.0	0/0.0	5/0.8	0/0.0
Total	7/2.3	0/0.0	146/36.5	1/0.3	46/7.7	0/0.0

Total general: n=1300; Morbilidad 200/15.3%; Mortalidad 1/0.08%

Se identificó *T. vivax* en laminillas coloreadas con Giemsa, de muestras de cinco animales de esta finca.

2.1.3 Datos sobre el clima, infestación por garrapatas y tratamientos con acaricidas

La humedad relativa promedio durante el período de investigación en el área donde estaba localizada la finca fue de 75% (69 a 80%) y la temperatura diaria promedio de 23 °C. (22.1 a 24.2). Esto explica la tasa de evaporación casi constante. La precipitación anual (800 a 1.000 mm, según Castaño, et al., 1986) por lo general está uniformemente distribuida; no hay períodos secos distintos.

La tasa promedio de infestación con garrapatas entre septiembre de 1988 y febrero de 1989 estuvo cercana a 0 considerándose todos los estadios de desarrollo de éstas. No obstante, el hato se trató con acaricidas cuatro veces en el transcurso de éste período. Se presentó una elevación moderada en la infestación con garrapatas en marzo/abril, pero los recuentos promedios de hembras ingurgitadas nunca llegó a 1.0. Las novillas permanecieron libres de garrapatas durante todo el tiempo.

El hato (todos los animales) se trató (aspersión mecánica) entre septiembre, 1988 y junio, 1989 en ocho ocasiones, utilizando una preparación piretroide (Flumetrina*) a intervalos de 41 a 58 días, a excepción de mayo/junio/89, cuando se redujo el intervalo a 9 días por lo que se consideró una infestación con garrapatas excepcionalmente severa. El proceso de aspersión por animal tomó alrededor de 5 segundos y un promedio de 3 lt de solución acaricida (1.9 a 5.4 lt.).

2.1.4 Costos de los tratamientos con acaricidas

El concentrado de flumetrina utilizado para cada tratamiento del hato costaba entre US\$81 y US\$231**. Considerando los gastos por mano de obra y los costos por depreciación (10% p.a.), el mantenimiento y la operación de la aspersora mecánica, los gastos totales ascienden de 115 a 278 dólares por tratamiento del hato, es decir US\$0.09 a 0.22/cabeza/tratamiento. Así, entre agosto, 1988 y mayo, 1989, el valor de las ventas de 4.688 kg de leche se invirtió en el control de garrapatas mediante tratamientos acaricidas, correspondientes a 0.2% de la leche producida por el hato.

2.2 Hato 2

2.2.1 Hallazgos microscópicos y resultados de las pruebas serológicas para *B. bovis*, *A. marginale* y *B. bigemina*

2.2.1.1 Prevalencia

Terneros (Figura 3)

En este grupo no se encontró microscópicamente ni *B. bovis* ni *A. marginale* hasta enero de 1989. Las tasas más altas de parasitemia de *B. bovis* se presentaron en marzo (13/29) y de *A. marginale* en junio, 1989 (15/18).

* Bayticol, Bayer

** Tasa de cambio el 31.1.89: \$342.4/1 US\$

La tasa máxima de infección para **B. bovis** y **A. marginale** de 3/29 hasta marzo de 1989, se incrementó a 19/19 para **A. marginale** y a 14/19 para **B. bovis** hasta junio, 1989.

Novillas reproductoras (Figura 3)

La tasa máxima de parasitemia para **B. bovis** fue 5/11, para **A. marginale** 7/12.

La tasa de seropositivos se elevó a 11/12 para **B. bovis** y a 11/11 para **A. marginale**.

Vacas (Figura 4)

Se encontró parasitemia de **B. bovis** en sólo una de 15 vacas. La tasa máxima de seropositivos fue 3/15.

Para **A. marginale**, la tasa más alta de parasitemia fue 2/13, la tasa de seropositivos 8/12.

B. bigemina. Terneros, novillas y vacas (Figura 4)

La tasa más alta de parasitemia de **B. bigemina** se encontró en el grupo de terneros (6/26) en abril de 1989, comparada con 2/12 en el grupo de novillas reproductoras y con 2/13 en el de vacas.

2.2.1.2 Incidencia

Se demostraron seroconversiones para **B. bovis** en un total de 22 animales, todos ellos menores de 18 meses de edad, 14 de éstas en abril, 1989. Las seroconversiones se concentraron en el subgrupo por edad de terneros de 10 y 11 meses (16/22).

Las seroconversiones para **A. marginale** se presentaron entre abril y julio, 1989, en 35 animales cuyas edades oscilaron entre 10 y 74 meses. Una alta proporción de éstas ocurrió en animales de 10 a 14 meses (23/35), las restantes 7/35 en vacas maduras (51 a 74 meses de edad).

2.2.2 Manifestaciones clínicas de las hemoparasitosis

La morbilidad y mortalidad general debidas a enfermedad hemoparasitaria fueron más altas en ésta finca que en la No. 1 (20.4% morbilidad y 1.7% mortalidad), siendo la morbilidad casi igualmente alta en los terneros de mayor edad y en las novillas (28.8% y 27.8% respectivamente). De éstos casos de enfermedad, 27 (4.5%) fueron fatales en los terneros, 3 (1.0%) en las novillas y 3 (0.3%) en las vacas (Tabla 2.2).

Se identificó **T. vivax** en laminillas coloreadas con Giemsa de cinco animales de esta finca.

2.2.3 Datos sobre el clima, infestación con garrapatas y tratamientos con acaricidas

Los datos climáticos para esta finca son muy similares a los de la No. 1.

Las tasas de infestación con garrapatas fueron mucho más altas que en la finca 1, pero el recuento de hembras ingurgitadas fue aún bajo (inferior a 10), con una excepción en las novillas de reproducción en noviembre de 1988, fecha en la cual se incrementó a un promedio de 52.8.

FIGURA 3 HATO 2. RESULTADOS DE PARASITEMIAS E IFAT

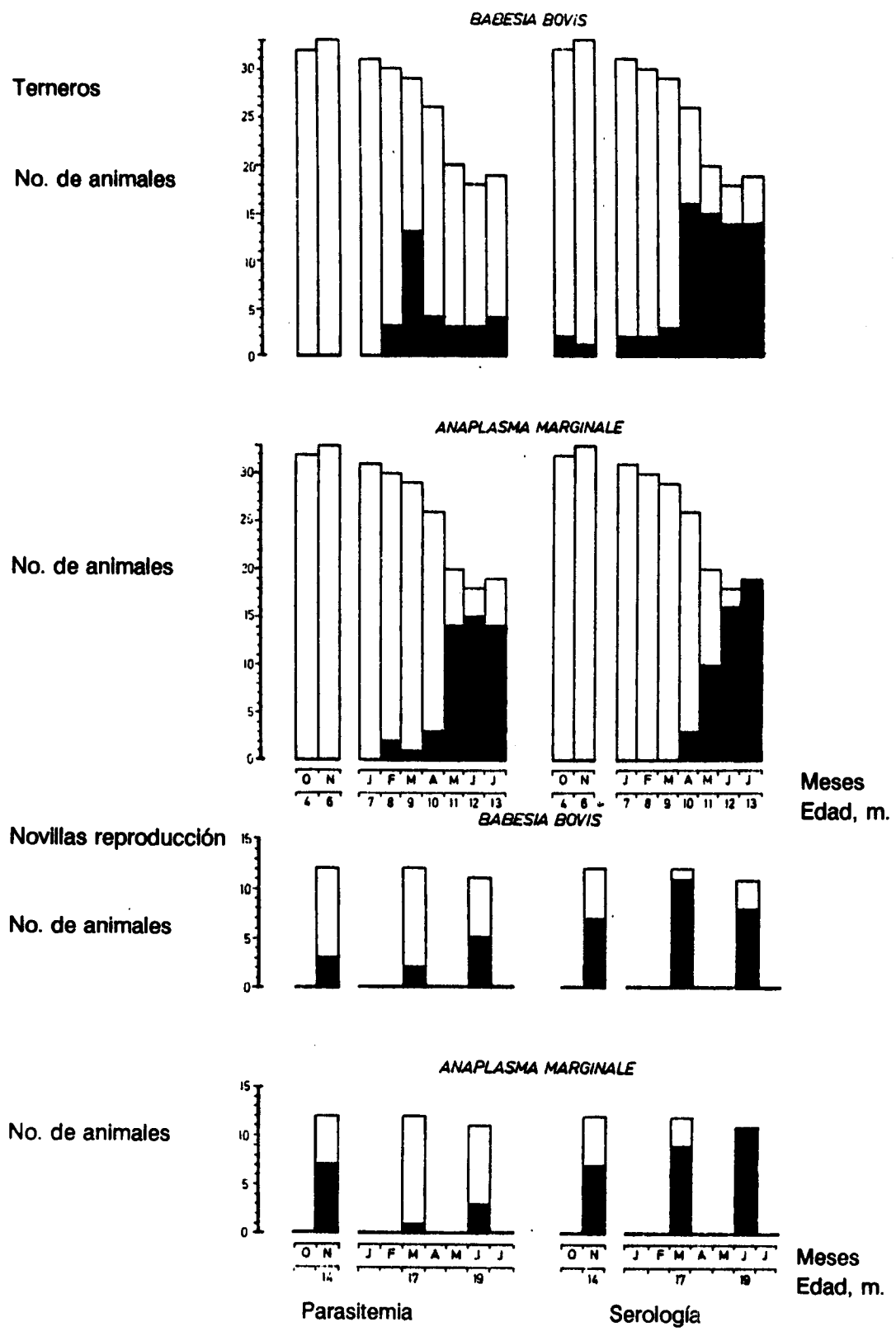
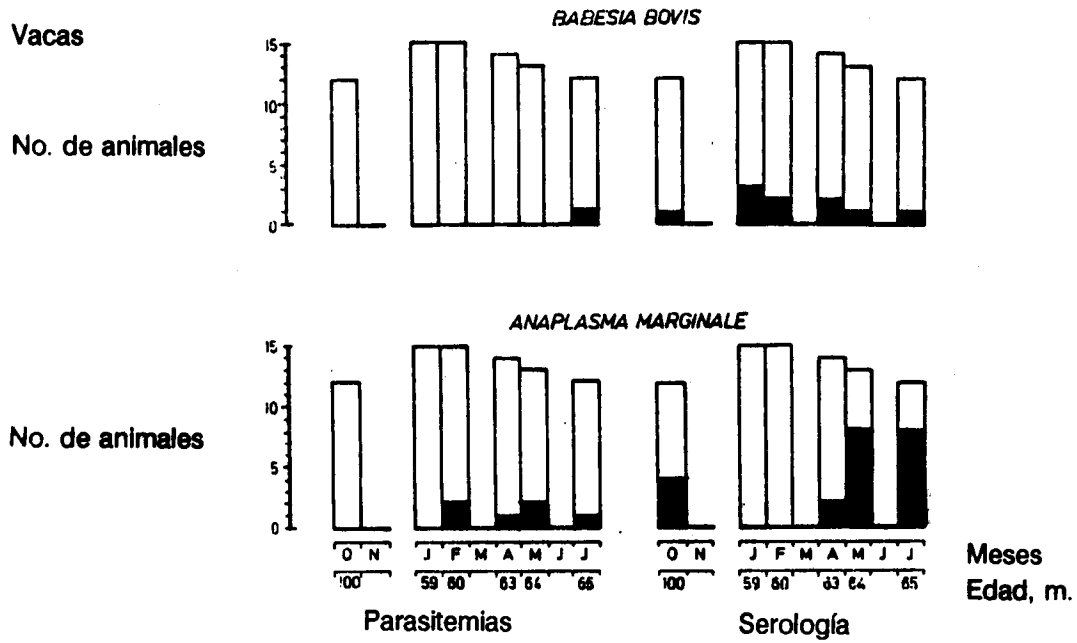


FIGURA 4 HATO 2. RESULTADOS DE PARASITEMIAS E IFAT



Los tres grupos por B. bigemina

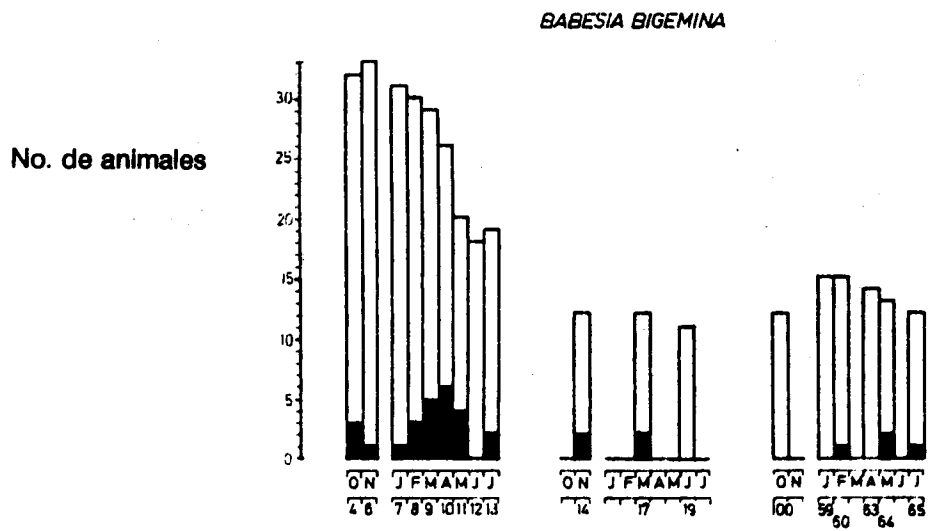


TABLA 2.2 MANIFESTACIONES CLINICAS DE HEMOPARASITOSIS EN EL HATO 2

1988/89	Terberos (n=600)		Novillas reproducción (n=300)		Vacas (n=1100)	
	Morbilidad n/ %	Mortalidad n/ %	Morbilidad n/ %	Mortalidad n/ %	Morbilidad n/ %	Mortalidad n/ %
Septiembre	6/1.0	2/0.3	4/1.3	0/0.0	15/1.4	0/0.0
Octubre	3/0.5	0/0.0	3/1.0	0/0.0	6/0.5	0/0.0
Noviembre	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	6/0.5	0/0.0
Enero	8/1.3	1/0.2	5/1.7	0/0.0	7/0.6	1/0.1
Febrero	24/4.0	3/0.5	5/1.7	0/0.0	6/0.5	1/0.1
Marzo	0/0.0	0/0.0	15/5.0	2/0.7	15/1.4	0/0.0
Abril	6/1.0	6/1.0	6/2.0	0/0.0	6/0.5	0/0.0
Mayo	60/10.0	6/1.0	5/1.7	1/0.3	15/1.4	1/0.1
Junio	6/1.0	3/0.5	20/6.7	0/0.0	40/3.6	0/0.0
Julio	60/10.0	6/1.0	20/6.7	0/0.0	10/0.9	0/0.0
Total	173/28.8	27/4.5	83/27.8	3/1.0	126/11.5	3/0.3

Total general: n = 2000 Morbilidad 408/20.4%
Mortalidad 33/1.7%

Se aplicaron 9 tratamientos con acaricidas al hato (todos los animales) entre septiembre, 1988 y julio, 1989, usando una Formamidina (Amitraz*) solo o en combinación con un piretroide (Cipermetrina**) o un organofosforado (Metriphonato***). El proceso de aspersión por animal tomó 3 segundos en promedio y 3 lt de solución acaricida (2.2 a 3.7 lt). Los intervalos entre tratamientos fueron 21 a 57 días. Las tasas altas de infestación, observadas en noviembre, descendieron a 0 después de dos tratamientos en el transcurso de 2.5 meses. Para obtener el mismo resultado con la severa infestación ocurrida en marzo, se requirieron cinco tratamientos en el lapso de 4 meses.

2.2.4 Costos de los tratamientos con acaricidas

El costo del acaricida utilizado para el tratamiento del hato fluctuó entre US\$113 y US\$354; considerando la mano de obra y la depreciación anual por construcción y mantenimiento de la aspersora mecánica, el costo por tratamiento del hato ascendió a US\$211-489, es decir, de US\$0.14 a US\$0.31 por animal/tratamiento. Así, entre septiembre, 1988 y junio de 1989, se invirtió el valor de 7.348 kg de leche en el control de garrapatas, lo cual corresponde a 0.02% de la producción del hato.

* Triatox (Coopers)

** Barricade (Shell)

*** Neguvón (Bayer)

2.3 Hato 3

2.3.1 Hallazgos microscópicos y resultados serológicos para *B. bovis*, *A. marginale* y *B. bigemina*

2.3.1.1 Prevalencia

Terneros (Figura 5)

La tasa máxima de parasitemia para *B. bovis* fue 2/9, registrada en octubre. La tasa más alta de seropositivos fue de 5/9 en los terneros, en septiembre cuando los animales tenían de 3 a 4 meses de edad. Luego en noviembre/diciembre declinó a 0, pero a partir de enero aumentó otra vez a 4/9.

Se demostró microscópicamente *A. marginale* en sólo 1 de los grupos con 9 a 20 terneros. El animal en cuestión resultó sero-positivo a éste parásito desde noviembre.

Novillas reproductoras (Figura 5)

En éste grupo, la tasa más alta de parasitemia para *B. bovis* fue 3/11 y la tasa de seropositivos 1/11.

La tasa máxima de parasitemia para *A. marginale* fue 3/12, la tasa de seropositivos no fué superior a 7/11.

Vacas (Figura 6)

Las tasas máximas de parasitemia y seropositivos para *B. bovis* fueron 1/12 y 2/12 respectivamente.

Para *A. marginale*, la tasa de parasitemia fue 1/12 mientras que la de seropositivos aumentó de 7/12 a 9/12 entre octubre y julio.

B. bigemina. Terneros, novillas y vacas (Figura 6)

Las más altas tasas de parasitemia para *B. bigemina* se observaron en los terneros, las más bajas en las vacas; parasitemias fueron particularmente bajas en los terneros en noviembre (6/9) y marzo (6/14). Sólo dos de 12 en el grupo de novillas de reproducción y 1/12 vacas tuvieron parasitemias de este organismo.

2.3.1.2 Incidencia

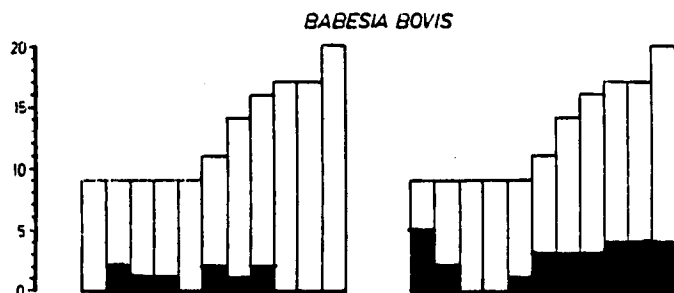
Para *B. bovis*, se observó un total de 8 seroconversiones en animales entre 7 y 87 meses de edad, 5 de ellas en el grupo de terneros de 7 a 12 meses.

Se observaron seroconversiones para *A. marginale* en 7 animales entre 4 y 72 meses de edad, sólo uno de ellos pertenecía al grupo de terneros (< 12 meses de edad).

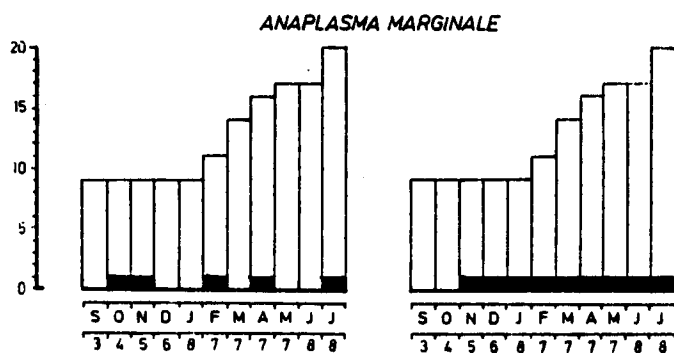
FIGURA 5 HATO 3. RESULTADOS DE PARASITEMIAS E IFAT

Terberos

No. de animales



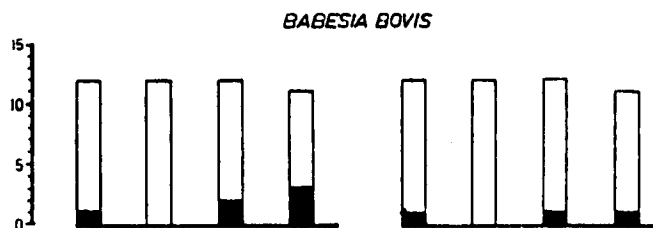
No. de animales



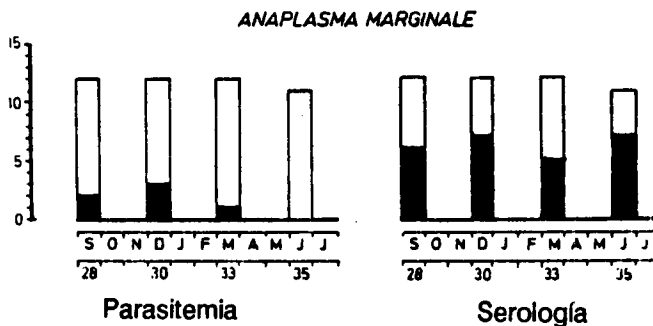
Meses
Edad, m.

Novillas reproducción

No. de animales



No. de animales



Meses
Edad, m.

Parasitemia

Serología

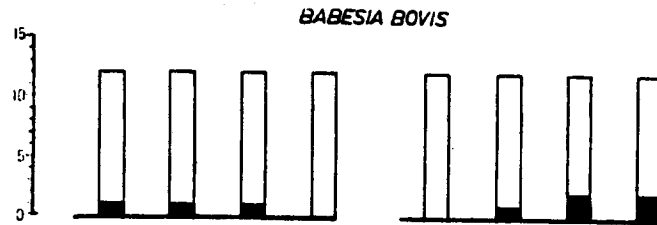
FIGURA 6

HATO 3.

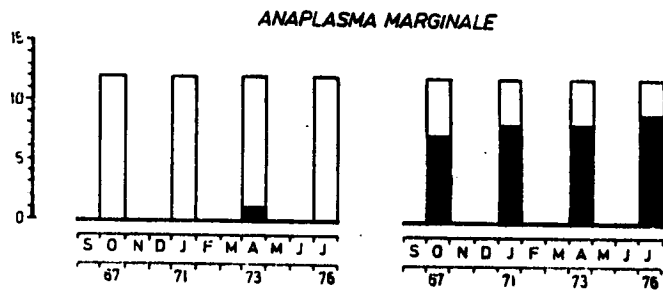
RESULTADOS DE PARASITEMIAS E IFAT

Vacas

No. de animales



No. de animales



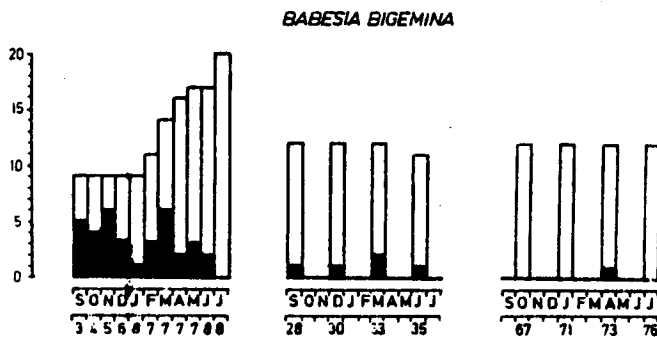
Meses
Edad, m.

Parasitemias

Serología

Los tres grupos, *B. bigemina*

No. de animales



2.3.2 Manifestaciones clínicas de las hemoparasitosis

En el hato 3, 1/16 terneros y 4/18 novillas en reproducción contrajeron enfermedad hemoparasitaria en agosto y septiembre, 14/86 vacas entre febrero y junio. 1/16 terneros y 1/18 novillas en reproducción murieron (Tabla 2.3).

2.3.3 Datos sobre el clima, infestaciones con garrapatas y tratamientos con acaricidas

La humedad promedio relativa en esta finca fue 72% (68% a 88%) entre septiembre, 1988 y julio, 1989; la temperatura promedio diaria fué 14.9 °C (13.4 a 17.0). La precipitación anual en el área es de 2.000 a 4.000 mm (Cabrera y Giraldo, 1985).

Las tasas de infestación con garrapatas en esta finca también fueron bajas en general, más bajas que en la finca 2 pero no tanto como en la finca 1. Los conteos de hembras ingurgitadas nuevamente eran muy inferiores a 10, con excepción de un recuento en los terneros efectuado en septiembre, 1988, el cual era tan alto como 47.1.

TABLA 2.3 MANIFESTACIONES CLINICAS DE LAS HEMOPARASITOSIS

1988/89	Terneros n = 16		Novillas reproducción n = 18		Vacas n = 86	
	Morbilidad n/ %	Mortalidad n/ %	Morbilidad n/ %	Mortalidad n/ %	Morbilidad n/ %	Mortalidad n/ %
Agosto	1/6.3	1/6.3	3/16.7	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Septiembre	0/0.0	0/0.0	1/5.6	1/5.6	0/0.0	0/0.0
Octubre	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Noviembre	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Diciembre	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Enero	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Febrero	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	4/4.7	0/0.0
Marzo	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	5/5.8	0/0.0
Abril	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	2/2.3	0/0.0
Mayo	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	2/2.3	0/0.0
Junio	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	1/1.2	0/0.0
Julio	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Total	1/6.3	1/6.3	4/22.2	1/5.6	14/16.3	0/0.0

Total general: n = 120
Morbilidad 19/15.8%
Mortalidad 2/1.7%

Entre agosto, 1988 y junio, 1989, se aplicaron 11 tratamientos con acaricidas a todo el hato utilizando bomba de balde. Se usó Cipermetrina* (piretroide) en todas estas ocasiones. El proceso de aspersion por animal tom6 un promedio de 62 segundos y 2 lt de soluci6n acaricida (1.1 a 2.6 lt). El tratamiento se administr6 a intervalos de 21 a 57 d6as.

Se presentaron infestaciones por garrapatas m6s severas en agosto y diciembre de 1988, por lo cual se les aplic6 a los animales acaricida por aspersion. En ambos casos, la infestaci6n decreci6 casi a 0 despu6s del tratamiento y permaneci6 en un nivel bajo despu6s del 6ltimo, efectuado en diciembre. Se aplicaron cinco tratamientos m6s entre febrero y julio.

2.3.4 Costos de los tratamientos con acaricidas

Los costos del concentrado acaricida fluctuaron entre US\$4 y US\$10 por tratamiento del hato. Si se consideran la mano de obra y la depreciaci6n anual de la bomba de balde, los costos totales ascienden a US\$27-34/tratamiento, es decir, entre US\$0.22 y 0.28/animal/tratamiento. De este modo, entre agosto, 1988 y junio, 1989, el valor de las ventas de 921 kg de leche se invirti6 en el control de las garrapatas, correspondiente a 0.4% de la producci6n total de leche del hato.

2.4 Hato 4

2.4.1 Hallazgos microsc6picos y resultados serol6gicos para B. bovis, A. marginale y B. bigemina

2.4.1.1 Prevalencia

Terneros (Figura 7)

En este grupo se alcanzaron tasas de parasitemia de **B. bovis** de 1/23 a 5/10. Las tasas de seropositivos m6s altas se observaron entre noviembre, 1988 y marzo, 1989 (9/22).

Las tasas de parasitemia para **A. marginale** fueron altas en noviembre, 1988 (8/13) y en marzo, 1989 (9/22). La tasa de seropositivos para **A. marginale** se increment6 gradualmente desde septiembre, 1988 hasta junio, 1989, llegando finalmente a 15/15 en julio.

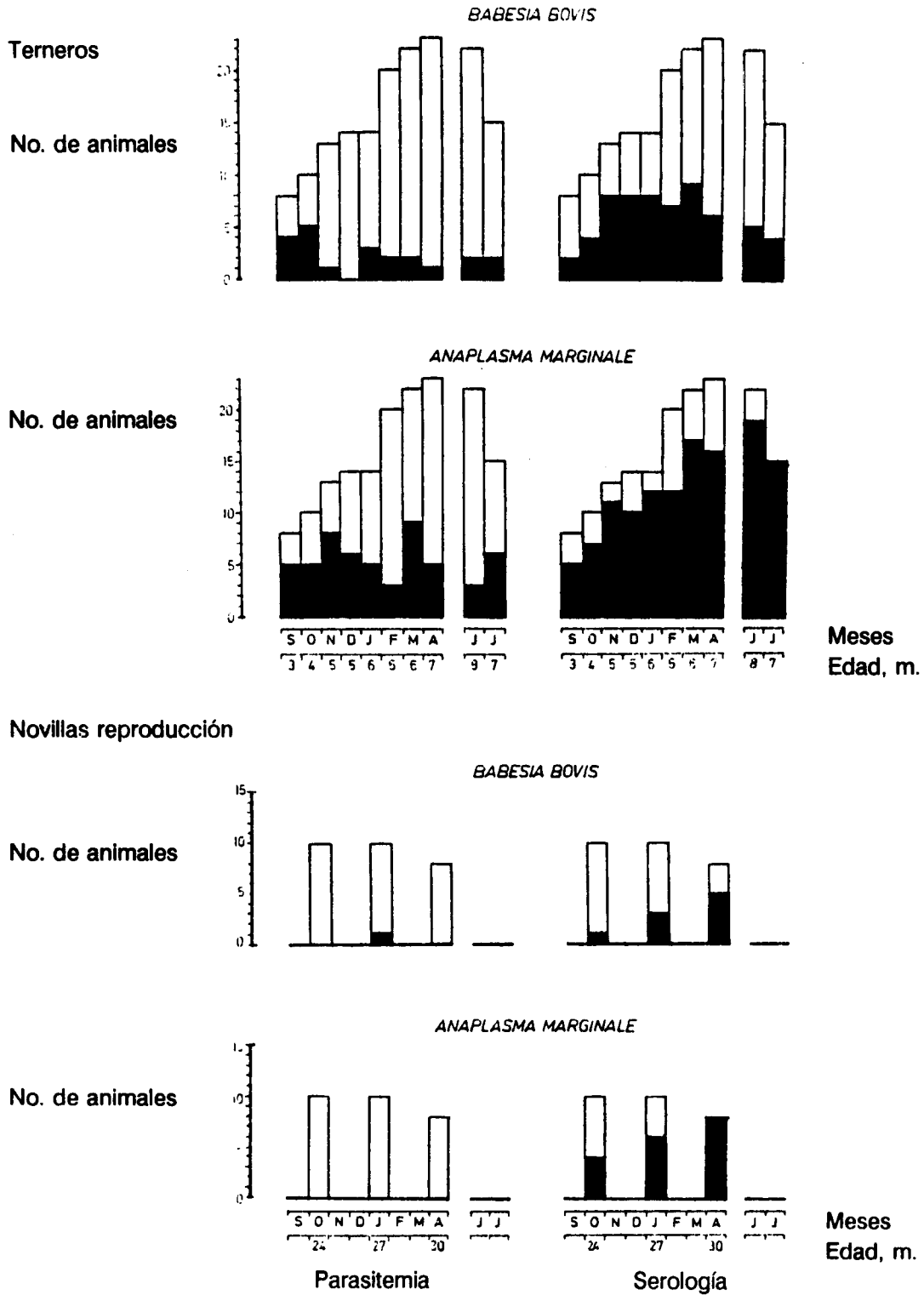
Novillas reproductoras (Figura 7)

Se encontr6 **B. bovis** al examen microsc6pico en s6lo 1/10 de animales. La tasa de seropositivos se increment6 de 1/5 a 5/8.

Aunque no se observ6 parasitemia para **A. marginale** en ninguna de las novillas del grupo, la seroprevalencia ascendió de 4/10 a 8/8.

* Barricade (Shell)

FIGURA 7 HATO 4. RESULTADOS DE PARASITEMIAS E IFAT



Vacas (Figura 8)

En marzo, 1989 sólo fue posible demostrar tasas de parasitemia tanto de **B. bovis** como de **A. marginale** en 2/12 animales. La tasa de seropositivos para **B. bovis** permaneció todo el tiempo en 2/12; ésta se incrementó a 6/12 para **A. marginale**.

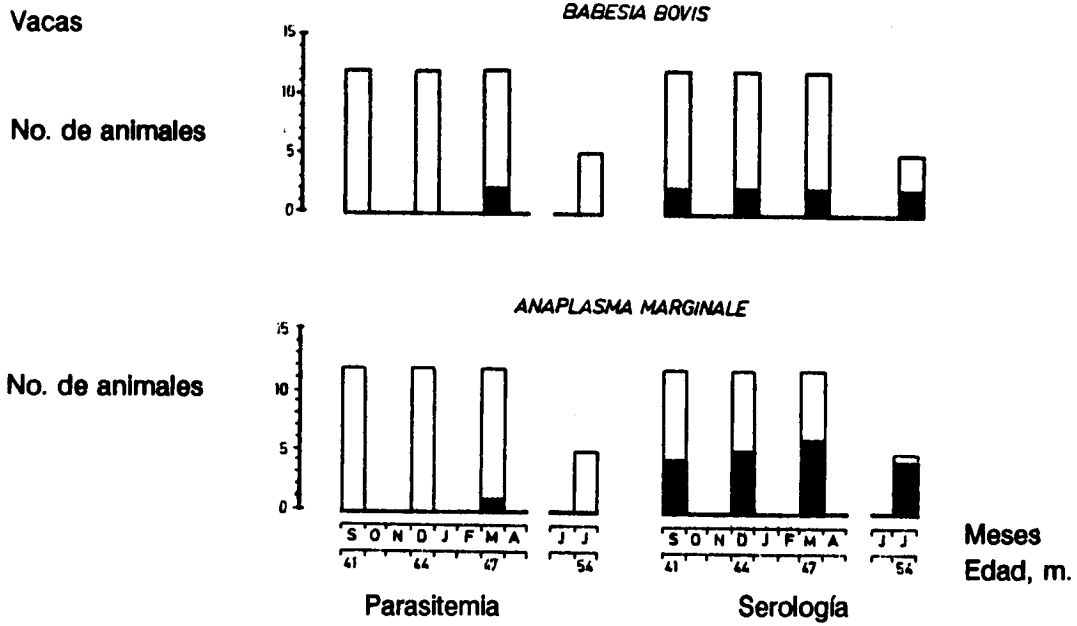
B. bigemina. Terneros, novillas y vacas (Figura 8)

En el grupo de terneros se observaron regularmente parasitemias de **B. bigemina** entre septiembre, 1988 y julio, 1989. En noviembre (5/13) y en junio (4/22) se presentaron las tasas más altas de parasitemia. Las parasitemias fueron ocasionales en novillas y en vacas preñadas de 24 a 54 meses de edad (máximo 1/10).

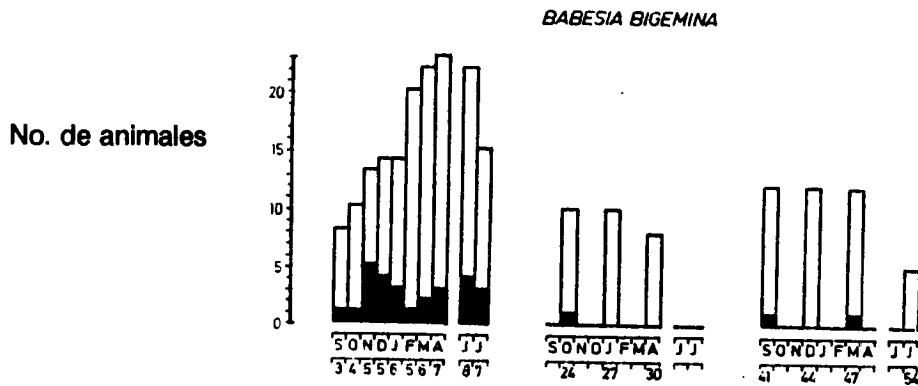
2.4.1.2 Incidencia

Se observó un total de 15 seroconversiones para **B. bovis** y de 26 para **A. marginale** en animales entre 3 y 59 meses de edad; 11/15 de aquellas para **B. bovis** y 19/26 de las correspondientes a **A. marginale** ocurrieron en terneros menores de 9 meses.

FIGURA 8 HATO 4. RESULTADOS DE PARASITEMIAS E IFAT



Los tres grupos, B. bigemina



2.4.2 Manifestaciones clínicas de las hemoparasitosis

En esta finca fueron bajas la morbilidad y mortalidad debidas a las hemoparasitosis. Sólo se afectaron una vaca y un ternero; éste último murió (Tabla 2.4).

TABLA 2.4 MANIFESTACIONES CLINICAS DE LAS HEMOPARASITOSIS

1988/89	Terneros (n=22)		Novillas reproducción (n=22)		Vacas (n=30)	
	Morbilidad n/ %	Mortalidad n/ %	Morbilidad n/ %	Mortalidad n/ %	Morbilidad n/ %	Mortalidad n/ %
Agosto	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Septiembre	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Octubre	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Noviembre	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Diciembre	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Enero	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Febrero	1/4.5	1/4.5	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Marzo	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Abril	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Junio	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0
Julio	0/0.0	0/0.0	0/0.0	0/0.0	1/3.3	0/0.0
Total	1/4.5	1/4.5	0/0.0	0/0.0	1/3.3	0/0.0

Total general: n = 74 Morbilidad 2/2.7%
Mortalidad 1/1.4%

2.4.3 Datos sobre el clima, infestación de garrapatas y tratamientos con acaricidas

La humedad relativa promedio durante el período comprendido entre septiembre, 1988 y julio, 1989 fue del 78% (70 a 84%) y la temperatura promedio correspondió a 21.4 °C. (20.4 a 23.5). La precipitación anual osciló entre 2000 y 4000 mm en el área (Cabrera y Giraldo, 1985).

Esta finca presentó el nivel más alto de infestación por garrapatas, con tres muestreos cuando los conteos de hembras ingurgitadas estaban entre 25 y 33 y uno más cuando eran >50 en las vacas y >90 en las novillas; y con recuentos muy bajos o aún negativos en los intermedios.

Se aplicó un total de 13 tratamientos con acaricidas al hato (todos los animales) entre agosto, 1988 y julio, 1989, todos mediante bomba de espalda. Los acaricidas y sus combinaciones se cambiaron por otros productos después de 3 a 4 aplicaciones. Los acaricidas utilizados fueron piretroides (Cipermetrina*, Deltametrina** y Cyalotrina***) y un organofosforado (Metrifonato****).

El proceso de aspersión por animal tomó en promedio 131 segundos y 2 lt de solución acaricida (0.7 a 2.7 lt). Los tratamientos del hato se realizaron a intervalos de 14 a 39 días.

Se efectuaron siete tratamientos al hato, entre septiembre, 1988 y marzo, 1989 (período de tasas de infestación relativamente altas), tres se aplicaron cuando las tasas de infestación eran bastante bajas. Dos de los tratamientos tuvieron el efecto de reducir las tasas altas de infestación, otros tres no tuvieron éxito en su propósito de evitar una elevación de las mismas. Se realizaron 6 aplicaciones a intervalos de dos semanas para disminuir las tasas de infestación de su pico absoluto que ocurrió en abril/mayo.

2.4.4 Costos de los tratamientos con acaricidas

Los costos de los concentrados acaricidas utilizados variaron entre US\$2 y US\$8 por tratamiento de hato. Si se consideran los gastos por mano de obra y la depreciación anual de la bomba de espalda, los costos ascienden a US\$24-30, es decir, US\$0.33 a 0.41 por animal/tratamiento. De este modo, durante el período comprendido entre agosto, 1988 y julio, 1989, el valor de las ventas de 949 kg de leche se invirtió en el control de las garrapatas, correspondiendo a 1.2% de la producción de leche del hato.

2.5 Incidencia, tasa de inoculación e infección en terneros

Las incidencias para **B. bovis** y **A. marginale** demostradas por examen serológico (IFAT para **B. bovis**) y microscópico; y por serología (parasitemia y CAT) para **A. marginale**, no fueron superiores a 0.1 en terneros hasta 8 meses de edad en los hatos 1, 2 y 3, mientras que en el hato 4 las incidencias para **B. bovis** y **A. marginale** alcanzaron 0.6 (9/14) y 0.9 (12/14) respectivamente cuando los terneros tenían solo seis meses de edad (Tabla 2.5).

La incidencia de **B. bigemina** demostrada únicamente por la aparición de parasitemias, ascendió a 0.4 (13/31) y 0.2 (6/30) respectivamente en terneros de hasta 8 meses de edad en las fincas 1 y 2, mientras que en la No. 3 se logró una incidencia de 1.0 (9/9) ya a la edad de 6 meses. El hato 4 fue el menos afectado por **B. bigemina**; la incidencia en terneros de hasta 8 meses de edad no fue superior a 0.6 (8/14) (Tabla 2.5).

* Pigar (Ciba-Geigy), Stockade (Pfizer)

** Butox (Hoechst)

*** Grenade (Coopers)

**** Neguvón (Bayer)

TABLA 2.5 INCIDENCIA, TASAS DE INOCULACION Y DE INFECCION

	Edad (meses)	Hato 1	Hato 2	Hato 3	Hato 4
Babesia bigemina	3	0/31	-	5/9	1/8
	4	-	3/32	2/9	0/10
	5	4/31	-	1/9	4/13
	6	3/31	0/33	1/9	2/14
	7	3/31	1/31	0/9	0/14
	8	3/31	2/30	0/9	1/14
	P*	13/31	6/30	9/9	8/14
	h**	0.002	0.001	0.01	0.004
Babesia bovis	3	1/31	-	a.c.****	2/8
	4	0/31	0/32	a.c.****	2/10
	5	0/31	2/32	0/9	2/13
	6	0/31	0/33	0/9	3/14
	7	0/31	0/31	0/9	0/14
	8	0/31	0/30	1/9	0/14
	I***	1/31	2/30	1/9	9/14
	h	0.0001	0.0003	0.0005	0.005
Anaplasma marginale	3	2/31	-	0/9	5/8
	4	0/31	0/32	0/9	2/10
	5	0/31	0/32	1/9	4/13
	6	2/31	0/33	0/9	0/14
	7	0/31	0/32	0/9	1/14
	8	0/31	0/30	0/9	0/14
	I	4/31	0/30	1/9	12/14

* Tasa parasitemia ** Tasa inoculación *** Tasa infección

**** a.c. = anticuerpos calostrales

Las tasas de inoculación e infección se calcularon en terneros de hasta 8 meses de edad, asumiendo que el riesgo de infección era constante (Tabla 2.5).

Se encontró estabilidad endémica para **B. bigemina** sólo en el hato 3 y para **B. bovis** únicamente en el hato 4. En todos los otros predios la situación epidemiológica para estos dos patógenos fue inestable.

En el hato 4, casi todos los terneros estaban infectados con **A. marginale** a la edad de 8 meses. En las otras fincas, la gran mayoría de los terneros a ésta edad todavía eran completamente susceptibles a la infección con **A. marginale**.

3. DISCUSION

3.1 Metodología

Ganse-Dumrath (1986), trabajando con **B. divergens** en Europa encontró que, en el caso de parasitemias bajas, las preparaciones de gota gruesa coloreadas con naranja-acridina eran superiores a las coloreadas con Giemsa. Además, comprobó que la demostración microscópica de este hemoparásito arrojaba mejores resultados que la serología (IFAT).

Durante la presente investigación se confirmó que el primer hallazgo era también válido para **B. bovis**. Utilizando el método de gota gruesa coloreada con naranja-acridina, fue posible demostrar parasitemias de **B. bovis** hasta tres meses más temprano que con la coloreada con Giemsa en 10/252 casos y un mes más tarde en 8/252. En 25/252 se logró hacer el diagnóstico de **B. bovis** sólo mediante el método de gota gruesa coloreada con naranja-acridina.

El segundo hallazgo de Ganse-Dumrath (1986), basado en la experiencia de haber podido demostrar **B. divergens** en 21/251 casos de infecciones con éste organismo sólo por el método de gota gruesa coloreada con naranja-acridina mas no por IFAT, no se confirmó para **B. bovis**. Se presentó un número considerable de casos donde los animales con parasitemias de corta duración, demostradas por preparaciones de gota gruesa coloreadas con naranja-acridina, sólo se volvieron positivos a la prueba IFAT uno a dos meses más tarde y permanecieron así por un largo período.

No existe aún una prueba completamente satisfactoria para la demostración de anticuerpos de **A. marginale**, pero los autores concuerdan con Amerault y Roby (1968) y González et al. (1978b) en que la aglutinación en tarjeta es aceptable para el diagnóstico del hato.

La diferenciación microscópica de **B. bovis** y **B. bigemina** puede ser difícil; el porcentaje de error depende en gran parte de la experiencia de quien realiza el examen (Donnelly, 1984). En el presente caso, la confiabilidad de los resultados de diferenciación microscópica se mejoró con la disponibilidad simultánea de la serología para **B. bovis** (IFAT).

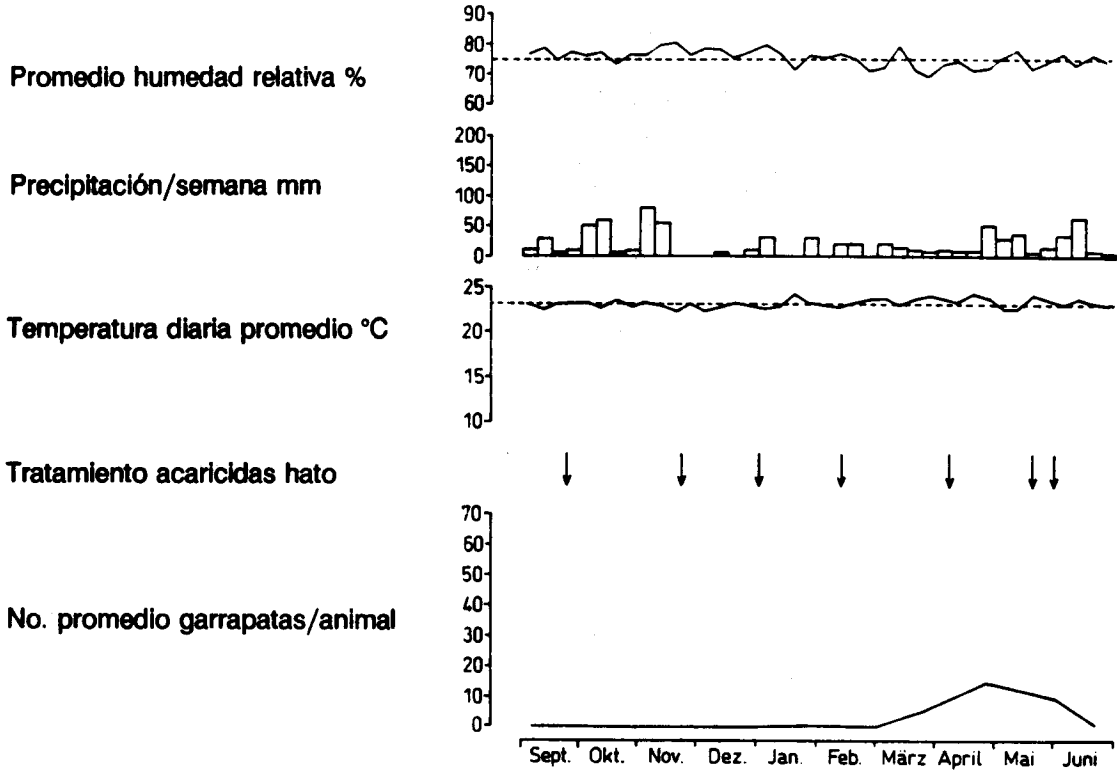
3.2 Situación de las cuatro fincas

3.2.1 Clima, infestación con garrapatas y tratamientos acaricidas

Las Figuras 9 y 10 ilustran las características climáticas de las cuatro fincas bajo investigación. No existe mucha diferencia entre las Nos. 1, 2 y 4, las cuales están situadas en el Valle del Cauca a 910, 920 y 1.040 m.s.n.m., la No. 4 alrededor de 100 km más al norte que las otras dos. La temperatura diaria promedio oscila entre 20-25 °C. y la humedad relativa promedio entre 75 y 80%; la precipitación anual es de 800 a 1000 mm en las fincas 1 y 2 y entre 2000 y 4000 mm en la No. 4; su distribución es uniforme durante todo el año en las cuatro fincas. Bajo estas condiciones, Evans (1978) estimó que sería posible el desarrollo de cinco generaciones de garrapatas por año. La No. 3 es un poco diferente dada la altitud a la cual está ubicada (1.780 m). Su temperatura diaria promedio es aproximadamente 15 °C y su humedad relativa promedio cercana al 70%, mientras que la precipitación anual distribuida en forma uniforme está entre 2000 y 4000 mm. Si embargo, según Evans (1978), aún se pueden desarrollar tres generaciones de garrapatas por año.

FIGURA 9 DATOS SOBRE EL CLIMA, INFESTACIONES CON GARRAPATAS E INTERVALOS DEL TRATAMIENTO EFECTUADO AL HATO

Finca 1 (920 m.s.n.m.)



Hato 2 (910 m.s.n.m.)

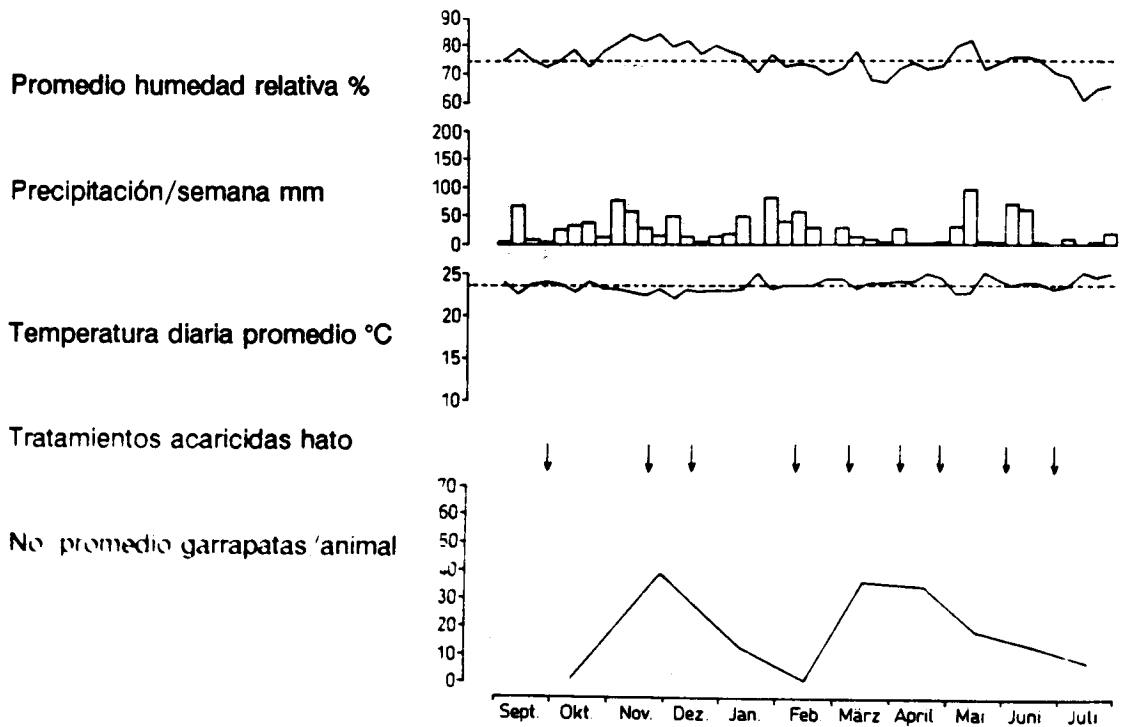
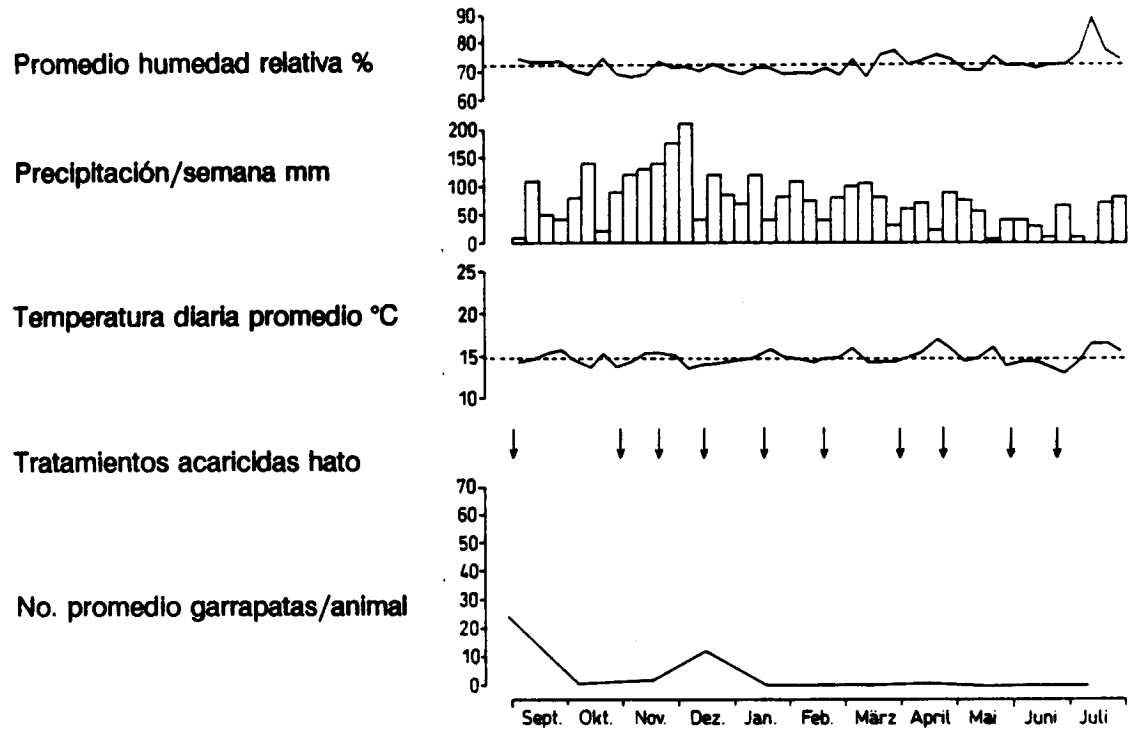
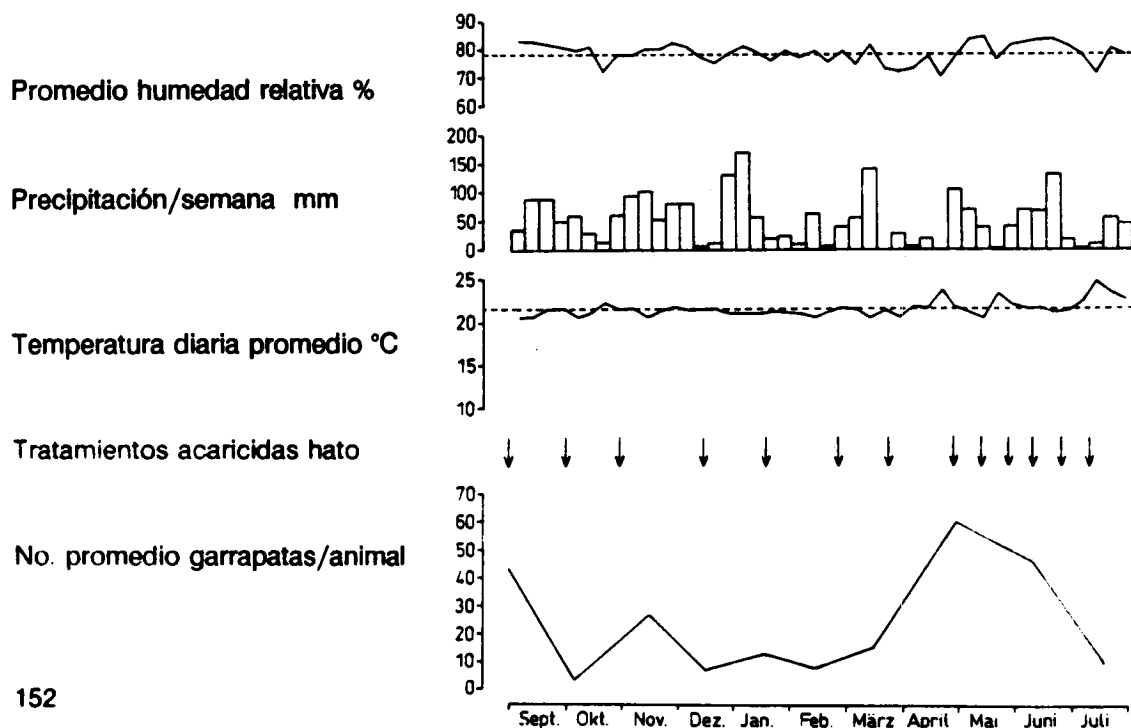


FIGURA 10 DATOS SOBRE EL CLIMA, INFESTACIONES CON GARRAPATAS E INTERVALOS TRATAMIENTO ACARICIDA HATO

Finca 3 (1.780 m.s.n.m.)



Hato 4 (1.040 m.s.n.m.)



En general, los datos climáticos para la región bajo estudio, en particular el hecho de no existir épocas de humedad y sequía distintas, indican la posibilidad de un desafío permanente de garrapatas (y mosca picadora) durante todo el año, a pesar de fluctuaciones menores. Las disparidades a este respecto, que se muestran en las Figuras 9 y 10 y en la Tabla 3.1 (entre fincas en diferentes épocas del año y aún dentro de las fincas entre grupos por edad de animales que usualmente se mantienen en potreros diferentes), se puede asumir en consecuencia que son en gran parte obra del hombre, ésto es, que se deben al control de las garrapatas mediante tratamientos con acaricidas, lo cual se relaja en ciertas épocas del año y se intensifica en otras, por lo general cuando se tiene la impresión de un incremento en el número de garrapatas.

En la Tabla 3.1 se demuestra el nivel, por lo general más bien bajo, de las tasas de infestación con garrapatas, y sus oscilaciones, producidas aparentemente en forma artificial. En cada una de las cuatro fincas existe por lo menos un vacío en el desafío de garrapatas en los terneros (tasas de infestación 0). La finca No. 1 empieza con una serie de seis ceros en éste grupo y sin infestación del todo en las novillas reproductoras. Además, existen secuencias de conteos bajos (<10 garrapatas de todos los estadios en desarrollo) en los cuatro predios cuando la probabilidad de transmisión de la enfermedad hemoparasitaria debe ser baja. Por otra parte, está el ejemplo de la elevación más bien repentina y fuerte del número de garrapatas en los terneros de la finca 2, entre marzo y abril de 1989 (de 11.4 a 68.6), que ocasionó una serie de tratamientos del hato espaciados estrechamente con el fin de disminuir el nivel de las infestaciones (a 13.4 en julio de 1989).

En cualquier caso, las tasas de infestación con garrapatas no presentaron un patrón claro y los tratamientos del hato no parecen seguir esquemas premeditados; aparentemente no siempre son efectivos en cuanto a reducir o evitar incrementos en el número de garrapatas en las praderas.

En general el número de tratamientos aplicados al hato varió desde 8 hasta 13 durante el período de la investigación en las cuatro fincas (Tabla 3.2); al igual que las cantidades de acaricidas utilizadas por animal y tratamiento (2-3 lt) y los intervalos de los baños por aspersión (desde 41-58 hasta 14-39. Tabla 3.6); lo mismo sucedió con la eficiencia inherente al equipo de aspersión, la cual declinó desde las aspersoras mecánicas utilizadas en dos fincas vía la bomba de balde hasta la bomba de espalda, como era de esperarse. Los gastos por concepto de operaciones de control de las garrapatas fueron bajos en relación con la producción de leche en las cuatro fincas, naturalmente más elevados en la finca 4 la cual tenía las tasas de infestación y el número de tratamientos más altos, mientras que los niveles de eficacia de su equipo de aspersión y de producción anual de leche fueron los más bajos de los cuatro predios.

Existen numerosas quejas de los ganaderos en el Valle del Cauca respecto a garrapatas que desarrollan resistencia a ciertos acaricidas, problema que justifica una investigación posterior. Se presume que éste fenómeno puede haber desempeñado cierto papel también en éste estudio.

3.2.2 Efectos de las hemoparasitosis y situación epidemiológica en las fincas

A pesar de pertenecer las cuatro fincas bajo investigación a elementos progresistas de la comunidad ganadera de Colombia, no presentaron un grupo homogéneo en cuanto a las prácticas de manejo y al grado de sofisticación. Las fincas 1 y 2 en realidad conformaron un subgrupo del más alto nivel de intensidad de la producción, ambas con 100% (o casi) de genes exóticos en su hato lechero.

TABLA 3.1 TASAS DE INFESTACION CON GARRAPATAS EN LAS FINCAS: No. PROMEDIO GARRAPATAS/ANIMAL (TODOS LOS ESTADIOS/HEMBRAS INGURGITADAS)

Mes	Terberos	FINCA No. 1		Terberos	FINCA No. 2	
		Novillas	Vacas		Novillas	Vacas
Septiembre	0/0	0/0				
Octubre	0/0	0/0	0/0	1.6/1.6		0.3/0.3
Noviembre	0/0			1.2/1.0	73.0/52.8	
Diciembre	0/0	0/0				
Enero	0/0	0/0	1.2/0	0/0		26.9/2.1
Febrero	0/0			0.1/0		0.1/0.1
Marzo	13.2/0.6			11.4/2.4	61.7/0	
Abril	0.1/0.1		29.4/0.2	68.6/0		0.1/0.1
Mayo	20.0/0.7	0/0		37.7/2.3		0/0
Junio	0.3/0		0/0	19.5/3.3	9.3/0	
Julio				13.4/1.7		1.2/1.2

Mes	Terberos	FINCA No. 3		Terberos	FINCA No. 4	
		Novillas	Vacas		Novillas	Vacas
Septiembre	47.1/47.1	1.2/1.2		30.5/30.5		54.5/54.5
Octubre	0/0		0.2/0.2	4.8/4.8	1.8/1.8	
Noviembre	2.0/2.0			26.8/26.8		
Diciembre	22.9/5.8	1.0/1.0		0/0		14.8/14.0
Enero	0.2/0		0/0	4.7/4.7	19.6/8.0	
Febrero	0.5/0			7.7/4.2		
Marzo	0.1/0.1	0.5/0.2		15.3/0.5		16.5/6.3
Abril	0.1/0.1		1.3/0.8	27.0/5.5	92.5/92.5	
Mayo	0/0					
Junio	0/0	1.6/0.7		45.8/32.3		
Julio	0/0		0/0	11.7/1.3		9.2/0

La finca 1 tenía un total de 1.500 cabezas, 1.300 de las cuales pertenecían a la fracción lechera del hato, en un área de 160 ha; la No. 2 tenía 2.000 cabezas de ganado de leche, en una extensión de 228 has. Esto significa que la mayoría de las áreas disponibles en estos predios, estaban dedicadas a la producción de forraje, dejando un espacio relativamente pequeño para pasto, el cual en la finca 1 estaba ocupado en parte por la fracción de carne del hato y en la finca 2 por las novillas reproductoras. Las vacas lecheras de ambos hatos se mantenían prácticamente en forma permanente en establos abiertos con corrales y se les suministraba forraje y concentrados, permitiéndoles pastar muy poco o nada; y en caso afirmativo lo hacían en turnos y en potreros relativamente pequeños cerca a los corrales de la finca. Lo mismo sucedía con el hato de terneros, a los cuales se les suministraba leche durante los primeros meses de vida con mameadores instalados en un balde.

TABLA 3.2 DATOS SOBRE TRATAMIENTOS CON ACARICIDAS, DESDE SEPTIEMBRE, 1988 HASTA JULIO, 1989

	Finca 1	Finca 2	Finca 3	Finca 4
No. tratamientos	8	9	11	13
Tipo de aspersora	Aspersora mecánica	Aspersora mecánica	Bomba balde	Bomba de espalda
Cantidad promedio acaricida usado por animal, lt	3 (1.9-5.4)	3 (2.2-3.7)	2 (1.1-2.6)	2 (0.7-2.7)
Tiempo por aspersión/ animal, segundos	5	3	62	131
Costo de tratamiento/ hato, representado en % producción de leche	0.2	0.2	0.4	1.2

La finca 3 tenía 150 animales en 170 has., 120 de los cuales eran de leche (Holstein) y 30 de carne (Cebú). Había una cantidad aceptable de pasto para todo el hato, a la fracción de leche además se le suministraba forraje y concentrados. A los terneros inicialmente se les daba el alimento en baldes, pero se les permitía el acceso al pasto desde el día 104 de vida.

La finca 4 parecía ser un híbrido entre el sistema tradicional de pastoreo y la producción moderna de leche. Tenía un área de 173 has. y sostenía 290 cabezas, 74 de las cuales eran vacas lecheras, mestizas (Holstein x Cebú) y 216 animales de carne Cebú puro. Todos los bovinos se mantenían en el pasto desde el primer día, suministrándole a los de leche suplementos de forraje y concentrados. Los terneros permanecían con sus progenitoras después del ordeño por períodos de tiempo que se reducían gradualmente con la edad y se les permitía amamantar los residuos de leche.

3.2.2.1 Finca 1 (Figuras 1 y 2)

En ésta finca, los terneros tuvieron acceso a la pradera desde el día 75 de nacidos, pero las tasas de infestación con garrapatas permanecieron muy bajas o aún en cero (Tabla 3.1). El nivel de infestación, por lo general bajo, se mantuvo a pesar de haber aplicado al hato el menor número de tratamientos (8) durante el período de la investigación. Utilizaron aspersión mecánica y trataron el hato a una velocidad de 5 segundos por animal.

Se observaron parasitemias de *B. bovis* en un ternero en cada uno de dos muestreos diferentes; un ternero resultó positivo a la prueba IFAT desde el primer muestreo. No se presentaron seroconversiones a *B. bovis* entre los terneros (Tabla 3.3). Por otra parte, se encontraron parasitemias de *B. bigemina* en diversos porcentajes (bajos) en todos los muestreos efectuados a partir de octubre, 1989, lo cual indica que unas

pocas garrapatas pasaron inadvertidas en los recuentos. No obstante, si se considera el potencial de transmisión relativamente bajo de **B. bovis**, comparado con el de **B. bigemina**, no es sorprendente el hecho de no haberse observado seroconversiones para **B. bovis**.

En los terneros se encontraron parasitemias de **A. marginale**, desde el principio y en porcentajes ascendentes, en todos a excepción de dos muestreos realizados. La prevalencia se elevó abruptamente hacia finales del período de la investigación (mayo/junio, 1989), cuando también 10 de las 22 seroconversiones a **A. marginale** ocurrieron en terneros de 12 a 13 meses de edad.

En las novillas de reproducción, las cuales tenían tan poco acceso al pasto como las vacas de leche, no se encontraron garrapatas; no se observaron parasitemias de **B. bovis** y la prevalencia serológica de éste hemoparásito fué 0 en éste grupo. Tampoco hubo seroconversiones. Sin embargo, se registraron algunas parasitemias de **B. bigemina** (una en el muestreo de diciembre y otra en el de mayo), argumentando nuevamente la presencia de algunas garrapatas que pasaron inadvertidas, si no fueron tal vez parasitemias recurrentes.

La prevalencia de **A. marginale** fue baja en las novillas (1 parasitemia en cada uno de dos muestreos diferentes y 4 animales positivos serológicamente en tres muestreos distintos). Se observaron seroconversiones en dos animales de 17 y 25-36 meses de edad.

En el grupo de vacas, donde se habían encontrado recuentos de garrapatas muy bajos en enero y en abril, se observaron parasitemias de **B. bovis** en todos los muestreos, confirmadas por prevalencia serológica. Ocurrieron tres seroconversiones (Tabla 3.3), todas en el grupo de las vacas más jóvenes (37 a 48 meses de edad). En dos ocasiones en que se efectuaron muestreos se advirtieron parasitemias de **B. bigemina**.

En ésta finca la incidencia de **A. marginale** (un total de 22 seroconversiones en 54-56 animales), demostrada por solo serología (Tabla 3.3), se inició con seroconversiones en dos terneros a la edad de 5 meses; después alcanzó un primer pico (10 de 22 seroconversiones) en terneros de 12 a 13 meses y otro pico (7/22) en vacas de 37 a 48 meses de edad.

Las tasas de inoculación para babesiosis calculadas para la finca 1 fueron de 0.002 para **B. bigemina** y 0.0001 para **B. bovis** (la más baja entre las cuatro fincas). La tasa de seropositivos para **A. marginale** fue de 0.13 (Tabla 3.5).

Las cifras de morbilidad y mortalidad, que se asevera se deben a la babesiosis y a la anaplasmosis, obtenidas en la finca (al igual que aquellas de las otras tres fincas), deben ser tomadas con cierta reserva puesto que están basadas en gran parte en un diagnóstico no profesional, aunque efectuado por personal con vasta experiencia. Además, debe considerarse que el límite entre terneros y novillas tuvo que fijarse un poco arbitrariamente a la edad de 13 meses. Puede haber alguna superposición entre los dos grupos.

En ésta finca la morbilidad total debida a las tres hemoparasitosis en cuestión fue de 15.3% y la mortalidad de 0.08%. El porcentaje más alto de morbilidad se observó en las novillas (36.5%) y la mortalidad estuvo confinada a éste grupo (0.3%), probablemente la mayoría o tal vez la totalidad se debió a anaplasmosis (Tabla 3.4).

3.2.2.2 Finca 2 (Figuras 3 y 4)

En ésta finca, a los terneros se les permitió el acceso a las praderas a partir del día 180 de nacidos y las novillas preñadas se dejaron pastar todo el tiempo hasta el parto, cuando se integraban al hato de las vacas manteniendo en establos abiertos en forma permanente, a excepción de períodos cortos y ocasionales de pastoreo. Las infestaciones con garrapatas (Tabla 3.1) fueron bajas desde octubre, 1988 hasta febrero de 1989. Empezaron a incrementarse en marzo hasta alcanzar su pico en abril y luego, después de una serie de tratamientos intensivos aplicados al hato, decayeron gradualmente hasta julio. Se registraron tasas altas de infestación en las novillas en noviembre, 1988. En la finca se usó una bomba de aspersión mecánica, el tratamiento tomó tres segundos por animal y se efectuó un total de 9 tratamientos durante el período de investigación (Tabla 3.2).

En el grupo de terneros, las primeras tres parasitemias para *B. bovis* se observaron en febrero, 1989; su número se elevó abruptamente en marzo, pero descendió nuevamente en abril junto con la prevalencia serológica para *B. bovis* y las tasas de parasitemia para *B. bigemina*. La situación de *A. marginale* evolucionó en forma similar.

Las seroconversiones para *B. bovis* (un total de 22 en 41-60 animales) (Tabla 3.3) empezaron a presentarse en los terneros con un animal de 7 meses de edad y culminaron en el subgrupo de edad de terneros de 10 y 11 meses (16 de 22 seroconversiones). De un total de 22 seroconversiones en el grupo, 21 ocurrieron en animales entre 7 y 13 meses, sin embargo, la mayoría de ellas en terneros de una edad más bien avanzada. Las correspondientes a *A. marginale* empezaron a observarse en un animal de 10 meses (1/35) y luego se acumularon en el subgrupo de terneros de 11 a 13 meses (21/35).

En el grupo de novillas reproductoras, en todos los muestreos se observaron parasitemias de *B. bovis* en números reducidos; la prevalencia serológica se elevó casi a 100% en el muestreo de marzo, pero las seroconversiones (Tabla 3.3) fueron ocasionales (1/22). Las parasitemias de *B. bovis* se presentaron en dos novillas en marzo; la evolución de *A. marginale* fue similar a aquella de *B. bovis*, pero las seroconversiones fueron más frecuentes en las novillas (4/35).

En el grupo de vacas, sólo se observó una parasitemia de *B. bovis* en julio, 1989, mientras en cada muestreo se identificó un bajo porcentaje de animales seropositivos y en tres ocasiones se presentaron porcentajes bajos de parasitemia de *B. bigemina*. Las parasitemias de *A. marginale* tampoco fueron frecuentes aunque se advirtieron en cuatro de los muestreos, la evidencia serológica de la ocurrencia de *A. marginale* fue más frecuente. En las vacas no se presentaron seroconversiones a *B. bovis* (Tabla 3.3), pero 9 de las 35 seroconversiones de *A. marginale* sucedieron en vacas, todas ellas mayores de 48 meses.

Las tasas de inoculación calculadas en ésta finca, fueron de 0.001 para *B. bigemina* y de 0.0003 para *B. bovis*, mientras que la tasa de infección para *A. marginale* fue de 0.30 (Tabla 3.5).

La morbilidad total en ésta finca posiblemente debida a las hemoparasitosis, fue de 20.4%, y la mortalidad de 1.7%. Los porcentajes más altos de morbilidad se registraron en terneros (28.8%) y en novillas (27.8%); en las vacas fue 11.5%. La mortalidad descendió de 4.5% en los terneros vía 1.0% en las novillas a 0.3% en las vacas. Nuevamente, la anaplasmosis pareció desempeñar el papel más importante en la incidencia de la morbilidad en los grupos de mayor edad (Tabla 3.4).

3.2.2.3 Finca 3 (Figuras 5 y 6)

En esta finca, los terneros tuvieron acceso al pastoreo desde el día 104 de nacidos (sin considerar los tres primeros días después del nacimiento, cuando se les permitió acompañar a sus progenitoras en la pradera). Las tasas de infestación por garrapatas (Tabla 3.1) fueron altas en septiembre y diciembre, 1988; entre 0 y bajas en los meses restantes. Las infestaciones con garrapatas en las novillas y en las vacas fueron bajas todo el tiempo. Este nivel de infestación en general bajo, equivalente al de la finca 1, se mantuvo utilizando una bomba de balde y aplicando 11 tratamientos durante el período de la investigación.

En el grupo de terneros, se observaron números reducidos de parasitemias de *B. bovis* a los 6 muestreos, de animales seropositivos a los 9 muestreos y de parasitemias de *B. bigemina* a los 10. La prevalencia de *A. marginale* (parasitemias y animales seropositivos) fue baja durante todo el tiempo.

TABLA 3.3 NUMERO DE SEROCONVERSIONES RELACIONADAS CON LA EDAD EN MESES

Edad (m)	Finca 1		Finca 2		Finca 3		Finca 4	
	B. bovis	A. marginale	B. bovis	A. marginale	B. bovis	A. marginale	B. bovis	A. marginale
3	-	-	-	-	-	-	-	5
4	-	-	-	-	-	1	1	7
5	-	2	-	-	-	-	6	1
6	-	-	-	-	-	-	1	3
7	-	-	1	-	1	-	1	1
8	-	-	-	-	1	-	1	2
9	-	-	1	-	2	-	1	-
10	-	-	10	1	-	-	-	-
11	-	1	6	8	-	-	-	-
12	-	7	2	10	1	-	-	-
13	-	3	1	3	-	-	-	-
14	-	-	-	1	-	-	-	-
17	-	1	1	1	-	-	-	-
18-24	-	-	-	2	-	-	1	-
25-36	-	1	-	-	1	2	2	3
37-48	3	6	-	-	-	2	-	-
49-60	-	1	-	4	-	-	1	4
> 60	-	-	-	5	2	2	-	-
Total	3	22	22	35	8	7	15	26
n	54-56		41-60		32-44		21-45	

TABLA 3.4 MANIFESTACIONES CLINICAS DE LAS HEMOPARASITOSIS OBSERVADAS EN LAS CUATRO FINCAS (CASOS EN %)

Finca No.	Terberos		Novillas reproducción		Vacas		Total		n
	Morb.	Mort.	Morb.	Mort.	Morb.	Mort.	Morb.	Mort.	
1	2.3	0	36.5	0.3	7.7	0	15.3	0.08	1300
2	28.8	4.5	27.8	1.0	11.5	0.3	20.4	1.7	2000
3	6.3	6.3	22.2	5.6	16.3	0	15.8	1.7	120
4	4.5	4.5	0	0	3.3	0	2.7	1.4	74

Morb. = Morbilidad

Mort. = Mortalidad

TABLA 3.5 RESUMEN DE LAS TASAS DE INFECCION E INOCULACION

		Finca 1	Finca 2	Finca 3	Finca 4
B. bigemina	(h)	0.002	0.001	0.01	0.004
B. bovis	(h)	0.0001	0.0003	0.0005	0.005
A. marginale	(l)	0.13	0.3	0.11	0.86

l = Tasa Infección h = Tasa Inoculación

Las seroconversiones a **B. bovis** (Tabla 3.3) empezaron a observarse en un animal de 7 meses de edad y alcanzaron un total de 8, cuatro de los cuales ocurrieron en terneros de 7 a 9 meses de edad. De un total de 7 seroconversiones para **A. marginale**, sólo una se presentó en terneros, un animal de 4 meses, es decir, poco tiempo después de haber tenido acceso al pasto.

La prevalencia serológica y microscópica de **B. bovis** y **B. bigemina** también fue baja en las novillas. Lo mismo sucedió con **A. marginale**, aunque la prevalencia serológica de este organismo fue un poco más alta que en el caso de los terneros. Se observaron pocas seroconversiones (Tabla 3.3) (una de **B. bovis** y 2 de **A. marginale**).

En el grupo de vacas, el cuadro fue muy similar a aquel de las novillas; bajas tasas de parasitemia de **B. bovis**, **B. bigemina** y **A. marginale**, y una prevalencia serológica baja también para **B. bovis**. Sin embargo, la seroprevalencia para **A. marginale** fue considerablemente más alta. Se observaron dos seroconversiones para **B. bovis** y 4 para **A. marginale** (Tabla 3.3).

La tasa de inoculación para las babesias calculada en esta finca, fue de 0.01 para **B. bigemina** y 0.0005 para **B. bovis**; la tasa de infección para **A. marginale** fue de 0.11 (Tabla 3.5).

La morbilidad total posiblemente debida a las hemoparasitosis fue de 15.8% y la mortalidad de 1.7% en ésta finca. El porcentaje más alto de morbilidad se encontró en las novillas (22.2%), seguido por el de las vacas (16.3%). La mortalidad fue más elevada en los terneros (6.3%); en las novillas fué de 5.6% y 0 en las vacas (Tabla 3.4).

3.2.2.4 Finca 4 (Figuras 7 y 8)

En esta finca, todos los animales estuvieron permanentemente en el pasto, incluyendo los terneros, aunque éstos pueden no haber permanecido todo el tiempo con sus progenitoras.

Las tasas de infestación con garrapatas (Tabla 3.1) en los terneros fueron relativamente altas en septiembre y noviembre, 1988, al igual que en junio de 1989; en los meses restantes oscilaron entre 0 y bajas. En las novillas fueron bajas en octubre de 1988 y en enero, 1989 y muy altas en abril, 1989. En las vacas fueron altas en septiembre, 1988, moderadas en diciembre, 1988 y bajas durante el período restante. En general, la infestación fué similar a la de la finca 2. Se mantuvo utilizando una simple bomba de espalda y aplicando 13 tratamientos al hato durante el tiempo de la investigación.

En los terneros, parasitemias por **B. bovis** se encontraron en todos los muestreos - excepto uno - en proporciones de hasta el 20% del grupo, y animales seropositivos se presentaron en todos sin excepción. Lo mismo ocurrió con **A. marginale**, aunque el porcentaje de parasitemias y, en particular, de animales seropositivos fue considerablemente más alto. El cuadro relacionado con **B. bigemina** fue similar a aquel de **B. bovis**.

Las seroconversiones para **B. bovis** y **A. marginale** (Tabla 3.3) empezaron a observarse en los terneros a una edad muy temprana: en el caso de **A. marginale**, en 12 de ellos cuando tenían 4 meses y en el caso de **B. bovis**, en 7 cuando habían alcanzado los cinco meses; 19 de 26 seroconversiones para **A. marginale** y 11 de 15 para **B. bovis** se presentaron en terneros.

En el grupo de novillas reproductoras, el número de parasitemias de **B. bovis** y de **B. bigemina** fue muy bajo (sólo uno de cada especie al primer muestreo), la prevalencia serológica aumentó gradualmente hasta alcanzar finalmente el 100%. Ocurrieron tres seroconversiones cada una para **B. bovis** y **A. marginale**.

En el grupo de vacas, nuevamente se presentaron pocas parasitemias de los tres organismos, la evidencia serológica de la infección fue un poco más alta. Se observó una seroconversión para **B. bovis** y cuatro para **A. marginale** (Tabla 3.3).

Las tasas de inoculación para las babesias calculadas en ésta finca fueron de 0.004 para **B. bigemina** y 0.005 para **B. bovis**; la tasa de infección para **A. marginale** fue de 0.86 (Tabla 3.5).

La morbilidad total atribuida a las infecciones hemoparasitarias en esta finca fue de 2.7%, y la mortalidad de 1.4%. El porcentaje más alto de morbilidad se encontró en los terneros (4.5%), el más bajo en las novillas (0), mientras que en el grupo de las vacas fue de 3.3%. La mortalidad estuvo limitada al grupo de terneros (4.5%) (Tabla 3.4).

4. CONCLUSIONES

En tres de las cuatro fincas investigadas (Tabla 3.6), imperó una situación probablemente característica de muchas otras en el Valle del Cauca, principalmente:

- un desaffo de garrapatas irregular durante todo el año, fluctuando entre alto y 0, pero en general bajo,
- una prevalencia baja de **B. bovis** y **B. bigemina** y, por lo tanto, una probabilidad relativamente baja (en comparación con otras regiones de Colombia), de vacas que confieren anticuerpos calostrales a sus terneros,
- rutinas de manejo del ternero condicionadas por la producción intensiva y altos niveles de genes exóticos, suministrando la leche en baldes con mamadores y una exposición tardía de los terneros a las garrapatas,

Resultando todo ésto en:

- seroconversiones que se presentan no del todo o en muchos casos demasiado tarde, cuando la resistencia de la juventud y posiblemente la inmunidad pasiva habrán decaído (Tabla 3.7),
- porcentajes relativamente altos de morbilidad y mortalidad; y éstos ocurriendo en los grupos de edad "equivocados", cuando los animales ya tienen un valor monetario y productivo considerablemente más alto que los terneros.

Obviamente debe esperarse que éstas circunstancias imposibiliten la evolución de un estado de estabilidad endémica para **B. bovis** y aún para **B. bigemina** en las fincas, aunque éste último organismo se transmite con mayor facilidad que el primero. También garantizarían un alto nivel de susceptibilidad a las infecciones con **A. marginale** dentro de los hatos (Tabla 3.5).

La finca No. 4 está caracterizada por el uso de vacas mestizas (Holstein x Cebú), esperándose un grado más alto de resistencia a las garrapatas y por lo tanto, probablemente estaba preparada para asumir el riesgo de una exposición temprana de su cosecha anual de terneros a las garrapatas, cuyo desaffo sin embargo, fue tan irregular como en las otras fincas; el control se mantiene mediante aspersión con bomba de espalda. En esta finca, los terneros se infectan a una edad temprana (ver el alto porcentaje de seroconversiones para **B. bovis** y **A. marginale** entre los 3 y 8 meses de edad, Tabla 3.7). Este predio es el único de los cuatro investigados que posiblemente podría calificar al reconocimiento de tener una estabilidad endémica para **B. bovis**, de no ser por el hecho de haberse observado tres seroconversiones de este organismo en vacas mayores de 24 meses, a menos que se pudiera demostrar que obedecieron a un evento inusual tal como la introducción de los animales en cuestión desde una región libre de garrapatas. Esta finca tuvo los niveles más bajos de morbilidad y mortalidad -y también en el grupo de edad "correcto" -, mientras que la producción promedio de leche fue aceptable (2.700 lt/vaca/lactancia). Sería interesante investigar si las relaciones ingresos/egresos de ésta finca no la colocarían más cerca a la "producción óptima" de lo que sería el caso con las otras tres fincas que aparentemente se están esforzando por lograr el "máximo".

TABLA 3.6 ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LAS FINCAS POSIBLEMENTE RELACIONADAS CON LA MORBILIDAD Y LA MORTALIDAD DEBIDAS A LAS HEMOPARASITOSIS

Finca No.	No. Total bovinos*	Area finca ha	Nivel genes exóticos %	Producción leche/lactancia kg	Acceso terneros al pasto desde día	Equipo aspersión	Intervalo aspersión días
1	1,300	160	100	3,840	75	asper.mec.	41-58
2	2,000	228	90	3,000	180	asper.mec.	21-57
3	120	170	100	2,910	104	bomba balde	21-57
4	74	173	50	2,700	1	bomba espal.	14-39

* Sólo fracción lechera del hato

TABLA 3.7 NUMERO DE SEROCONVERSIONES RELACIONADO CON LOS GRUPOS POR EDAD

Edad (m)	Finca 1		Finca 2		Finca 3		Finca 4	
	B. bovis	A. marginale	B. bovis	A. marginale	B. bovis	A. marginale	B. bovis	A. marginale
3 to 8	-	2	1	-	2	1	10	19
9 to 24	-	12	21	26	3	-	2	-
25 to >60	3	8	-	9	3	6	3	7
Total n	3	22	22	35	8	7	15	26
	54-56		41-60		32-44		21-45	
Acceso al pasto el día	75		180		104		1	

Sin embargo, como parecería irreal esperar que los ganaderos con producciones intensivas estuviesen de acuerdo en retroceder en su desarrollo, la respuesta a la pregunta de cómo remediar la situación evidentemente es:

- garantizar un desafío bajo pero constante de garrapatas en los pastos (no superior pero tampoco inferior a 10 hembras ingurgitadas por animal), aplicando tratamientos al hato regulares más no excesivos,
- garantizar el acceso diario de los terneros a las praderas con un desafío de garrapatas adecuado, a una edad más temprana de la actual.

Si no es posible llevar ésto a cabo o no es compatible con el sistema de manejo, entonces no habría otra solución sino vacunar los terneros contra **B. bovis**, **B. bigemina** y **A. marginale**, posiblemente utilizando la vacuna triple Argentina de organismos vivos (Guglielmone, 1990), aunque ésto significaría la introducción a Colombia de cepas foráneas de babesia y de **A. centrale**. El riesgo de ésto es bajo. Australia introdujo del Africa **A. centrale** desde hace mucho tiempo y la usó desde entonces con éxito sin efectos adversos, al igual que Argentina, Uruguay y algunos otros países. La introducción de cepas atenuadas de **B. bovis** y **B. bigemina** constituirían sólo la adición de unas pocas cepas más a la gran variedad que ya existe en el país.

5. RESUMEN

Se investigaron cuatro fincas en los departamentos del Valle y del Quindío (Colombia occidental/central), entre septiembre de 1988 y julio de 1989, para infecciones hemoparasitarias (**B. bovis**, **B. bigemina**, **A. marginale** y **T. vivax**), al igual que para posibles relaciones de éstas con las prácticas de manejo del hato.

Se demostró la ocurrencia de **B. bovis**, **B. bigemina** y **A. marginale** en los cuatro hatos; **T. vivax** sólo en dos.

Las condiciones climáticas en el área bajo consideración son tales que el desafío de garrapatas e insectos picadores es prácticamente permanente durante todo el año. En las tres fincas situadas en el Valle del Cauca son posibles cinco generaciones de garrapatas, y tres en la localizada en las mesetas adyacentes a este departamento.

El control de garrapatas mediante tratamientos del hato con acaricidas no sigue patrones estratégicos premeditados sino que se realizan más o menos por impresión de necesidad, es decir, cargas altas de garrapatas en los animales. En las cuatro fincas se presentaron amplias variaciones en los recuentos de garrapatas, que alternaron entre períodos de números muy bajos o ninguno y otros con cargas severas. El equipo utilizado varió desde aspersoras mecánicas, vía bombas de balde hasta bombas de espalda, pero los niveles básicos de eficiencia de estos aparatos no parecieron ser cruciales para la efectividad de las operaciones de control. Los costos anuales por tratamiento del hato oscilaron entre 0.2% y 1.2% de la producción anual de leche del hato.

Los sistemas de manejo animal, y en particular el de los terneros, estaban condicionados por los niveles de intensidad de la producción y de los genes exóticos en los hatos. En tres de las fincas, a los terneros

no se les permitía el acceso a las praderas antes de los 75, 104 o inclusive 180 días de edad. Aún después, considerando el desafío no uniforme de garrapatas no se garantizaba la infección temprana con hemoparásitos. La situación de las vacas y de las novillas varió entre estabulación permanente (establos abiertos con corral) para las vacas en dos fincas (con períodos ocasionales de pastoreo) y pastaje permanente en la tercera. Las novillas se mantuvieron todo el tiempo en el establo (1 finca) o en la pradera (2 fincas). La finca No. 4 tenía en su hato lechero cruces de Holstein x Cebú y todos los animales estaban continuamente en el pasto.

El resultado de estas prácticas de manejo fue una inestabilidad endémica en las tres primeras fincas (las tasas de inoculación de *B. bovis* determinadas en terneros hasta de 8 meses de edad fluctuaron entre 0.0001 y 0.0005) y tasas de infección de *A. marginale* de 0.11 a 0.33, mientras que en la cuarta se presentó una tasa de inoculación para *B. bovis* de 0.005 y una tasa de infección de *A. marginale* de 0.86. Esta finca, podría con cierta reserva calificar para un estado de estabilidad endémica. En consecuencia, tuvo tasas de morbilidad y mortalidad, debidas a infecciones por hemoparásitos, mucho más bajas que las otras tres.

**VI. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS DE Babesia bigemina
Y Babesia bovis PROCEDENTES DE COLOMBIA**

Por

K.T. Friedhoff

I. Mueller

E. Otte

INDICE DE CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION	171
2. MATERIALES Y METODOS	171
2.1 Animales experimentales	171
2.2 Garrapatas	171
2.3 Babesia	171
3. RESULTADOS	172
3.1 Conservación en congelamiento	172
3.2 Cultivos <i>in vitro</i> de babesia	172
3.3 Modo de transmisión de la babesia	173
3.4 Comparación serológica	173
3.5 Caracterización clínica	173
3.5.1 Caracterización nacional	174
3.5.2 Caracterización internacional	182
4. DISCUSION	184
4.1 Aislamiento de babesia y modo de transmisión	184
4.2 Cultivo <i>in vitro</i> de babesia	184
4.3 Caracterización de <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i>	184
4.3.1 Comparación serológica	184
4.3.2 Comparación clínica	184
5. RESUMEN	185

INDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1	Reacciones clínicas: B. bigemina177
TABLA 2	Reacciones clínicas: B. bigemina178
TABLA 3	Reacciones clínicas: B. bovis179
TABLA 4	Reacciones clínicas: cepas de campo (infecciones mixtas de B. bovis/B.bigemina)180
TABLA 5	Reacciones clínicas: resumen de reacciones de los grupos infectados181
TABLA 6	Análisis estadístico en dos parámetros182
TABLA 7	Comparación de B. bigemina (Chinú, Colombia) con B. bigemina (Kericho, Kenya y Khon Khaen, Thailandia)182
TABLA 8	Comparación de B. bovis (Chinú, Colombia) con B. bovis (Lismore, Australia)183

1. INTRODUCCION

El proyecto Colombo/Alemán para la Intensificación del Control de las Enfermedades Animales (ICA-GTZ) había acordado realizar investigaciones en garrapatas y enfermedades transmitidas por las mismas, como una de las limitantes importantes de la producción bovina en las regiones tropicales y subtropicales de Colombia. Como no se tenía seguridad que las cepas de referencia disponibles de **B. bigemina** y **B. bovis** aisladas en el país a principios de los años 70 hubiesen conservado su pureza y éstas se requerían con carácter urgente para las investigaciones epidemiológicas, se intentó aislar y caracterizar algunas cepas provenientes de Córdoba, Colombia, en el Instituto de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria, Hannover.

Las babesias se debían aislar y someter a pasajes a través de garrapatas, mientras que los pasajes de bovino a bovino debían restringirse al mínimo posible debido a que las características de los aislamientos debían reflejar la situación del campo. Se ha comprobado que los pasajes frecuentes entre bovinos generan cambios significativos en las características de las babesias aisladas.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Animales experimentales

Se utilizó un total de 31 bovinos de 1 a 2 años de edad, Holstein-Friesian nacidos y criados en el norte de Alemania, así garantizando que los animales eran totalmente susceptibles ya que en ese país no existen garrapatas **Boophilus**, ni **B. bigemina** o **B. bovis**. Al iniciar los experimentos se examinaron para **Eperythrozoon spp.** y se encontraron negativos. Uno de los bovinos había sido esplenectomizado antes del experimento.

2.2 Garrapatas

En la granja Chinú, Departamento de Córdoba, se colectaron larvas de **B. microplus**, progenie de hembras ingurgitadas y se enviaron a Hannover en 1985. Se había demostrado la presencia de "kinetes" de una o ambas especies de babesia en sus hemolinfas (Dr. M.J. Otte).

Las babesias se sometieron a varios pasajes vía larvas, ninfas y garrapatas adultas.

Los estadios responsables de la transmisión a los bovinos en ambas especies se determinaron aplicando la técnica descrita por Friedhoff y Smith (1981).

2.3 Babesia

Se intentaron cultivos in vitro tanto de **B. bigemina** como de **B. bovis**, empleando la técnica descrita por Levy y Ristic (1983).

Mediante la prueba IFAT se comparó la cepa de **B. bovis** (Chinú) con la de **B. bovis** (Lismore, Australia) y, utilizando la prueba de ELISA, con la cepa Lismore y unos sueros provenientes de otra región de Colombia (Valle del Cauca).

Se estudió la reacción clínica a la infección artificial con **B. bovis** en cinco bovinos jóvenes; aquella con **B. bigemina** en ocho y la de un aislamiento mixto de campo (**B. bigemina/bovis**) en cuatro animales.

El aislamiento y la crioconservación de la babesia se realizaron según el procedimiento estándar.

3. RESULTADOS

3.1 Conservación en congelamiento

Un aislamiento de **B. bovis** y otro de **B. bigemina** se crioconservaron en su fase eritrocítica (sangre) y como esporozoitos (garrapatas).

3.2 Cultivos in vitro de babesia

A partir de la sangre de un animal positivo a babesia (**B. bigemina** y **B. bovis**) se realizó un cultivo microaerófilo de fase estacionaria, siguiendo el método estándar descrito por Levy y Ristic (1980).

Mientras que **B. bigemina** empezó a degenerarse rápidamente y al tercer día se comprobó que ya no era morfológicamente intacta, **B. bovis** se pudo mantener *in vitro* durante varios meses, después de un período transitorio de parasitemia reducida. Luego un problema técnico con la incubadora de CO₂ causó un colapso repentino al cultivo, pero en enero de 1986 se pudo establecer uno nuevo (método Palmer et al., 1982). Desde entonces se ha mantenido en forma continua (> 3 años). Sin embargo, por razones técnicas, se hizo necesario transferirlo a un nuevo medio de cultivo (RPMI 1640) sin problema alguno.

Entre tanto se ha utilizado repetidamente el cultivo nuevo para la producción de antígeno destinado a pruebas serológicas (Tropberger, 1987; Mueller y Cissoko, 1988; Doherr, 1990), aunque se comprobó que estaba contaminado con **T. theileri** cuyo origen probablemente fue un donador de sangre infectado en forma latente. Se intentó con éxito desprender el tripanosoma del cultivo. En la actualidad el número de pasajes permanece en más de 200. Se comprobó la infectividad del cultivo en el pasaje 100 en un bovino entero, con los siguientes resultados:

Inóculo:	10.000 eritrocitos infectados, i.v.
Aparición parasitemia:	día 31 post-infección
Parasitemia máxima:	0.05%
Duración parasitemia:	5 días
Temperatura corporal máxima:	41.9 C.
Terapia:	No se requirió

3.3 Modo de transmisión de la babesia

Se confirmó que la larva de *B. microplus* transmitía la *B. bovis*, mientras que la *B. bigemina* era transmitida por las garrapatas adultas. También se ratificó, aunque por medios indirectos, la transmisión de ésta última a través de las ninfas. No se pudo demostrar la transmisión de *B. bigemina* por las larvas.

3.4 Comparación serológica

Tropberger (1987) hizo un primer intento de caracterización serológica de cepas colombianas de *B. bovis*. Este autor utilizó la técnica IFAT cuando comparó el antígeno preparado a partir de una cepa de campo de *B. bovis* aislada de garrapatas colectadas en Chinú (Córdoba, Colombia) con un antígeno de la cepa Lismore Australiana, producido en el Instituto de Parasitología de Hannover. Cincuenta de 1.130 sueros provenientes de Córdoba se sometieron tres veces a la prueba IFAT con ambos antígenos; se calcularon los promedios geométricos de los títulos recíprocos. No se presentó ningún caso en donde los títulos obtenidos en el sistema heterólogo fuesen más altos que los del homólogo. Catorce de los sueros resultaron negativos a ambos antígenos; sólo tres positivos estaban en concordancia a las diluciones 81-160 ó 161-320; y en los casos restantes se observó una diferencia sustancial en los títulos a favor del antígeno homólogo Chinú.

Doherr (1990) logró un resultado similar al comparar sueros de campo obtenidos en Córdoba (del mismo envío utilizado por Tropberger), con otros sueros de una región diferente en Colombia (Valle del Cauca; Zintz, 1990) y unos sueros de Israel, frente al antígeno Chinú (Colombia), al igual que al Lismore. Encontró que las reacciones positivas y las negativas tenían una buena concordancia en los sistemas heterólogo y en el homólogo, en los cuales fue interesante observar que el antígeno Chinú provenía del cultivo *in vitro* de *B. bovis* que había sido sometido a pasajes durante varios años. Sin embargo, fue evidente que las reacciones del sistema homólogo eran más marcadas ($p < 0.01$), a juzgar por la densidad óptica promedio, que aquellas en los sistemas heterólogos que incluyeron también los sueros del Valle del Cauca.

3.5 Caracterización clínica

Se dispuso de un total de 17 bovinos experimentales, uno de los cuales había sido esplenectomizado previamente. Cinco de éstos se sometieron a infección con *B. bovis*, 8 con *B. bigemina* y 4 con la cepa original de campo que produjo una infección mixta de *B. bigemina/bovis*.

La comparación y la apreciación de la calidad y el grado de intensidad de las reacciones de la infección se dificultaron un poco debido a que las cantidades de inóculo y las formas de aplicación no fueron uniformes en todos los animales. En el caso de *B. bovis*, por ejemplo, a tres de los animales se les administró 4 ó 4.5 ml de estabilizado vía subcutánea e intravenosa; uno recibió 10^5 eritrocitos infectados, i.v. y otro se expuso a larvas infectadas.

El aislamiento de campo se inoculó, vía larvas infectadas, en tres animales y en el cuarto inyectando s.c./i.v. 4 ml de estabilizado de larvas.

Como criterio para juzgar las reacciones se consideró:

- a. la duración promedio del período prepatente,
- b. el nivel máximo de parasitemia alcanzado,
- c. la máxima elevación de temperatura corporal observada. No se había determinado con antelación la temperatura real normal para cada uno de los animales involucrados. Por esta razón, se asumió una temperatura estándar normal de 39.5 °C para estos bovinos jóvenes,
- d. Las cifras indicativas de los síntomas clínicos tales como aceleración de la respiración, anorexia, diarrea e incapacidad para levantarse, se clasificaron en una forma simple dentro de las siguientes categorías: ausente = -, presente pero leve y/o transitorio = 1 y severo y/o prolongado = 2 ("acelerado" en el caso de respiración). Estas cifras se fueron adicionando hasta llegar a un Índice de Reacción Clínica (IRC) para el individuo de interés,
- e. Como la intención era utilizar posteriormente en la investigación hemoparasitológica, los animales experimentales, de por sí bastante costosos, éstos no se podían dejar morir a causa de la infección sino someterlos a tratamiento cuando se requiriera. Esto sucedió en diversas ocasiones. Así, se tomaron los siguientes puntos como criterio para determinar el grado de severidad de la reacción: necesidad de tratamiento cuando ésta surgiera, número de días de aplicación del mismo, número de animales que necesitaba tratamiento en un grupo, y la cantidad de quimioterapéuticos necesaria para controlar la enfermedad aguda producida. Cuando se observaron indicios de peligro de la vida del animal, se administraba Berenil; los otros fármacos (Acaprín, Imizole, Carbesia) se aplicaron en casos de menor urgencia. El "Índice de Berenil" (cantidad total de Berenil utilizado en un grupo por el control de la enfermedad dividido por el número de animales), se volvió de este modo un indicador útil del grado de severidad de la infección causada.

Bajo estas circunstancias, obviamente tenía que excluirse como parámetro útil la "duración de la parasitemia".

En las Tablas 1 a 4 se presenta una visión general de la reacción de los 17 animales experimentales a los diferentes tipos y cantidades de inóculo puro de *B. bigemina* y *B. bovis* y al aislamiento original de campo.

3.5.1 Caracterización nacional

B. bigemina (Tablas 1 y 2)

Inóculo: Eritrocitos infectados, dosis variadas, s.c./i.v.

Como era de esperarse, los períodos de prepatencia en éste grupo fueron los más cortos entre todos los grupos; declinaron desde los animales inoculados con 10^5 y 10^6 (con 5 y 6 días respectivamente) hasta el animal que había recibido la dosis más alta (10^{11} , animal esplenectomizado) con un día; el bovino con una dosis de 10^8 tenía tres días de prepatencia.

No hubo un patrón claro en cuanto a la parasitemia máxima, aunque el animal que había recibido la dosis más alta de inóculo presentó el porcentaje más elevado (6.5, nuevamente el esplenectomizado). Lo mismo sucedió con la elevación de temperatura y los IRC. No obstante, la reacción clínica general, a pesar de ser marcadamente más fuerte que en el grupo de *B. bigemina*/larva, debe aún ser clasificada como relativamente modesta: tres animales de este grupo requirieron tratamiento, pero el Índice de Berenil permaneció bajo (1.4). El animal esplenectomizado se destacó de los restantes del grupo por su período de prepatencia corto y alta parasitemia; siguió bien dentro del promedio con relación a la elevación de temperatura corporal, IRC y tratamiento.

Inóculo: Esporozoitos a través de larvas

Se infectaron cuatro de los animales experimentales vía larvas/ninfas de garrapatas alimentadas en un animal el cual portaba solamente *B. bigemina* (Chinú). Los períodos de prepatencia, que se conoce están influenciados por la cantidad del inóculo, fluctuaron entre 9 y 17 días, el promedio fue de 14. Considerando la extensión absoluta del período de prepatencia y comparando con las categorías siguientes, debe recordarse que las larvas no transmiten *B. bigemina* y que el desarrollo de los estadios transmisores de las garrapatas toman algún tiempo.

Las tasas promedias de la parasitemia fueron más bien bajas (1.5% probablemente incluso aumentada en forma indebida por una tasa inusualmente alta de 5.6%), comparadas con las tasas de la otra categoría de *B. bigemina*; lo mismo sucedió con la elevación máxima de la temperatura corporal. Las cifras promedias del IRC también fueron bajas; sólo se trató un animal y esto más como precaución (parasitemia muy alta) que por verdadera necesidad. En este grupo el Índice de Berenil fue de 0.

B. bovis (Tabla 3)

Inóculo: Estabilizado en tres animales; eritrocitos infectados o larvas en un caso cada uno

Los períodos de prepatencia oscilaron entre 7 y 9 días (8 en promedio) y de éste modo estuvieron entre los promedios para los dos grupos de *B. bigemina*. Los animales infectados con larvas y sangre no difirieron en una forma marcada de los otros tres; éstos fueron los casos con los períodos de prepatencia más largos (9 días) y el animal infectado con *B. bovis*/sangre presentó la tasa de parasitemia más elevada (1.0). En general, las cifras de parasitemia máxima fueron mucho más bajas que en el caso de los dos grupos infectados con *B. bigemina* (promedio-0.31), pero la temperatura máxima fue más alta que la de aquellos con *B. bigemina* (1.90 versus 0.9/1.25).

Se observó una diferencia marcada en cuanto al grado de severidad de las reacciones clínicas. Cuatro de los cinco animales mostraron apatía general, anorexia y respiración acelerada; uno incluso presentó diarrea. En el quinto animal, que tenía una ligera elevación de temperatura (1.3), sólo se percibió apatía general a pesar de que su tasa de parasitemia fue la segunda más alta del grupo. Basado en este hecho, se consideró que requería tratamiento y se trató junto con el resto de los animales en los cuales la necesidad del mismo fue evidente. Tres de los animales tuvieron que tratarse durante varios días y a todos ellos se les aplicó Berenil. Los IRC se elevaron hasta 6 en un caso y a 5 en los otros dos (promedio 4.0); el de Berenil fue de 6.0.

Aislamiento de Campo (Tabla 4)

Inóculo: Esporozoitos a través de larvas (3 animales), estabilizado de larva i.v. (1 animal)

Se esperaba que todos estos cuatro animales, que representaban la situación real de campo en Córdoba, desarrollaran infecciones mixtas de **B. bigemina** y **B. bovis**. En realidad así fue, aunque con tasas muy bajas de parasitemias de **B. bigemina**, en particular en el caso del animal infectado con el estabilizado de larva.

El cuadro general de la reacción dentro de éste grupo se aproximó estrechamente a aquel de **B. bovis** y no al de los grupos de **B. bigemina**. Los períodos promedios de prepatencia de ambos componentes de la infección mixta estuvieron muy cercanos (10.25 para **B. bigemina** y 10.5 para **B. bovis**); lo mismo se observó con las tasas de parasitemia (0.05 para **B. bigemina** y 0.09 para **B. bovis**), baja para **B. bovis** pero extremadamente baja para **B. bigemina**.

El promedio de las elevaciones máximas de la temperatura corporal estuvo cerca a aquel de **B. bovis**, al igual que las cifras del IRC. El animal infectado con el estabilizado de larvas tuvo el segundo IRC más alto (6) observado en los 17 animales bajo experimentación, uno de los expuestos a las larvas en éste grupo presentó el más elevado (7). En consecuencia, fue necesario tratar los cuatro animales, dos de ellos por un tiempo superior a un día, y todos con Berenil (Índice de 3.75).

En la Tabla 5 se resumen las observaciones antes mencionadas, después de reagrupar los animales según el tipo de inóculo. Se dejó **B. bigemina** en dos grupos (infectados con larvas o sangre) mostrando un contraste neto en sus reacciones respectivas. Los animales infectados con el aislamiento de campo se consideraron un grupo homogéneo, aunque los parásitos se inocularon en tres casos mediante larvas y estadios posteriores de desarrollo de las garrapatas; en el cuarto por un estabilizado de larvas. En el grupo de **B. bovis** la situación fue a la inversa: se infectaron tres bovinos con un estabilizado y uno con larvas. Quedó un quinto animal infectado con sangre por vía intravenosa que posiblemente se pudo comparar con el grupo infectado con **B. bigemina** inoculada por sangre, un procedimiento de menor interés práctico.

El grupo infectado con **B. bigemina**/larvas presentó los períodos promedios de prepatencia más altos (14 días), los más cortos el grupo **B. bigemina**/sangre (3.75 días). Los siguientes períodos más largos (10.25 y 10.5 respectivamente) se observaron en el grupo infectado con **B. bigemina** y **B. bovis** obtenidas del aislamiento del campo, seguido por el de **B. bovis**/larvas con 7.8.

Las tasas de parasitemia más altas resultaron de **B. bigemina**/sangre (3.1) y **B. bigemina**/larvas (1.5%), descendiendo a 0.09% para **B. bovis** y 0.05% para **B. bigemina** en el caso de los aislamientos de campo. Sin embargo, cuando se llegó a la respuesta clínica de la infección, los grupos **B. bovis**/larvas y aislamiento de campo tomaron la delantera con 1.8 °C y 1.6 °C de elevación promedio de la temperatura corporal, versus 1.25 °C en el de **B. bigemina**/inyección y 0.9 °C en **B. bigemina**/larvas. Luego en las siguientes categorías, a partir de los IRC, las cifras tanto en la categoría de aislamiento de campo como en la de **B. bovis** fueron marcadamente más altas que en las dos de **B. bigemina**. Esto fu particularmente marcado en el caso de los Índices de Berenil donde las cifras se elevaron de 0 en el caso de **B. bigemina**/larvas a 6.9 para **B. bovis**/estabilizado/larvas.

El análisis estadístico, como era de esperarse, permaneció algo inconcluso, excepto por dos parámetros al comparar los grupos **B. bigemina**/larvas y **B. bovis**/estabilizado/larvas. En éste caso, se presentó una diferencia significativa entre las cifras de temperatura máxima ($p = 0.04$) y estuvo cerca a la significancia ($p = 0.08$) en la diferencia entre las cifras de los IRC (Tabla 6).

TABLA 1 REACCIONES CLINICAS: B. bigemina

Animal No.	146580	479691	25216	338364	
Inóculo	Eritrocitos infectados 5×10^5 i.v.	Eritrocitos infectados 10^5 i.v.	Eritrocitos infectados 10^8 i.v.	Eritrocitos infectados 10^{11} i.v.	Promedio
REACCION CLINICA					
Días prepatencia	5	6	3	1	3.75
Máxima parasitemia %	5.0	0.5	0.2	6.5	3.10
Incremento máxima temperatura °C	2.3	0.1	1.6	1.0	1.25
Respiración*	1	-	1	-	
Anorexia*	1	-	1	-	
Apatía*	1	-	1	1	
Diarrea*	-	-	-	-	
Incapacidad levantarse	-	-	-	-	
IRC**	3	-	3	1	1.75
TERAPIA					
Droga*** (mg/kg) y dosis aplicada el día dpi/ppp****	A, 0.5 y B, 5.5 el día 5/2	-	A, 0.2 y el día 3/1	A, 0.25 el día 2/2	
Indice Berenil					1.4
Observaciones	Recidiva 3 semanas ppp		Animal esplenectomizado		

* -- = ausente (normal para respiración)
 1 = ligera y /o transitoria (acelerada para respiración)
 2 = prolongada (acelerada para respiración)

** IRC = Indice de Reacción Clínica

*** B = Berenil A = Acaprin C = Carbesia I = Imizole

**** dpi/ppp = días post-infección/post-patencia de parasitemia

TABLA 2 REACCIONES CLINICAS: B. bigemina

Animal No.	25217	10484	29089	X15697	
Inóculo	Larvas	Larvas	Larvas	Larvas	Promedio
REACCION CLINICA					
Días prepatencia	14	9	16	17	14
Máxima parasitemia %	0.2	5.6	0.05	0.06	1.5
Incremento máxima temperatura °C	1.3	1.5	0.5	0.3	0.9
Respiración*	1	1	--	--	
Anorexia*	--	--	--	--	
Apatía*	1	1	1	--	
Diarrea*	--	--	--	--	
Incapacidad levantarse	--	--	--	--	
IRC**	2	2	1	0	1.25
TERAPIA					
Droga*** (mg/kg) y dosis aplicada el día dpi/ppp****	--	A, 0.2 el día 19/11	--	--	
Indice Berenil					--
Observaciones	Recidiva 1 mes ppp		Recidiva 3 semanas ppp		

* -- = ausente (normal para respiración)
 1 = ligera y/o transitoria (acelerada para respiración)
 2 = fuerte y/o prolongada (acelerada para respiración)

** IRC = Indice de Reacción Clínica

*** B = Berenil
 A = Acaprin
 C = Carbesia
 I = Imizole

**** dpi/ppp = días post-infección/post-patencia de parasitemia

TABLA 3 REACCIONES CLINICAS: B. bovis

Animal No.	057	59042	47	10877	10874	
Inóculo	Estabilizado 2 ml s.c. 2 ml i.v.	Estabilizado 2 ml s.c. 2 ml i.v.	Estabilizado 3.5 ml s.c. 1.0 ml i.v.	Larvas	Eritrocitos infectados i.v. 10 ⁵	Promedio
REACCION CLINICA						
Días prepatencia	7	7	8	9	9	8
Máxima parasitemia %	0.2	0.3	0.01	0.03	1.0	0.31
Incremento máxima temperatura °C	2.3	1.3	1.9	1.8	2.1	1.9
Respiración*	1	-	2	1	1	
Anorexia*	2	-	1	1	2	
Apatía*	1	1	2	1	2	
Diarrea*	2	--	--	--	--	
Incapacidad levantarse	--	--	--	--	--	
IRC**	6	1	5	3	5	4.0
TERAPIA						
Droga*** (mg/kg) y dosis aplicada el día	B, 4.0 el día 8/1	B, 7.0 el día 10/3	A, 0.3 el día 8/1	B, 5.5 el día 8/1	B, 5.5 el día 8/1;	
dpi/ppp****	C, 0.7 el día 9/2		B, 7.0 el día 9/2		I, 1.2 el día 9/2	
	C, 1.0 el día 11/4					
	B, 4.0 el día 11/4					
Indice Berenil						6.6

Observaciones

- * -- = ausente (normal para respiración)
- 1 = ligero y/o transitorio (acelerado para respiración)
- 2 = fuerte y/o prolongado (acelerado para respiración)

** IRC = Indice de Reacción Clínica

*** B = Berenil A = Acaprin C = Carbesia I = Imizole

**** dpi/ppp = días post-infección/post-patencia parasitemia

TABLA 4 REACCIONES CLINICAS: CEPAS DE CAMPO (INFECCIONES MIXTAS DE B. bovis/B. bigemina) (Bi = bigemina; Bo = bovis)

Animal No.	21199	21190	56931	13296	
Inóculo	Larvas	Larvas	Larvas	Estabilizado larvas 2 ml s.c. 2 ml i.v.	
REACCION CLINICA					
Días prepatencia	Bi 15 Bo 15	Bi 9 Bo 9	Bi 9 Bo 10	Bi 8 Bo 8	Bi10.25 Bo10.5
Máxima parasitemia %	Bi .1 Bo .1	Bi 0.3 Bo 0.5	Bi0.5 Bo0.1	Bi0.1 Bo0.1	Bi0.05 Bo0.09
Incremento máxima temperatura °C	2.1	2.3	1.1	1.5	1.6
Respiración*	--	1	1	2	
Anorexia*	--	2	1	2	
Apatía*	1	2	2	2	
Diarrea*	--	--	--	--	
Incapacidad levantarse	--	2	--	--	
IRC**	1	7	4	6	4.5
TERAPIA					
Droga*** (mg/kg) y dosis aplicada el día dpi/ppp****	B, 0.3 el día 11/2	A, 0.75 y B, 5.0 el día 10/4	A, 1.0 el día 17/3 B, 3.0 el día 32/16	A, 1.2 el día 9/2 B, 4.0 el día 11/4 C, 1.4 el día 12/5	
Indice Berenil					3.75
Observaciones	Bi-Recidiva 3 semanas ppp				Estado general muy malo.

- * - = ausente (normal para respiración)
 1 = ligera y/o transitoria (acelerada para respiración)
 2 = fuerte y/o prolongada (acelerada para respiración)
 ** IRC = Índice de Reacción Clínica
 *** B = Berenil A = Acaprin C = Carbesia I = Imizole
 **** dpi/ppp = días post-infección/post-patencia de parasitemia

TABLA 5

REACCIONES CLINICAS: RESUMEN DE REACCIONES DE LOS GRUPOS INFECTADOS

	B. BIGEMINA		AISLAMIENTO DE CAMPO		B. BOVIS	
	Inóculo		Inóculo		Inóculo Estabilizado	
	Larvas	Sangre, s.c./i.v.	Larvas(3), Estabilizado larval s.c./i.v.		(3) Larvas	Sangre s.c./i.v.
	N = 4	N = 4	(1)	(1)	(1)	N = 1
	N = 4	N = 4	N = 4	N = 4	N = 4	N = 1
Período promedio de prepatencia, días	14	3.75	Bi:10.25	Bo:10.5	7.8	9.0
Promedio parasitemias máximas, %	1.5	3.1	Bi:0.05	Bo:0.09	0.14	1.0
Promedio incremento máxima temperatura °C	0.9	1.25	1.6		1.8	2.1
Promedio Indices de Reacción Clínica	1.25	1.75	4.5		3.75	5.0
Número (%) animales que necesitaron tratamiento	1 (25)	3 (75)	4 (100)		4 (100)	1 (100)
Promedio número de días de tratamiento	0.25	0.75	1.75		3.75	2.0
Indice Berenil	--	1.40	3.75		6.9	5.5
Columna no.	1	2	3		4	5

3.5.2 Comparación Internacional

Se intentó caracterizar las dos cepas del Chinú de *B. bigemina* y de *B. bovis* frente a las cepas de babesia de otras partes del mundo, para lo cual el Instituto disponía de datos sobre reacciones clínicas generados por investigaciones previas. De este modo, se probó *B. bigemina* (Chinú) frente a *B. bigemina* (Kericho, Kenya) y *B. bigemina* (Khon Khaen, Tailandia) (Tabla 7). La última, cepa tailandesa, había sido utilizada entre el 13/6 y el 1/7/84 para infectar cuatro bovinos jóvenes, enteros de raza Holstein, con sangre vía s.c./i.v.; la cepa Kenya se empleó en la misma forma en cuatro bovinos enteros de edad y raza similar, en enero de 1985 (2) y en diciembre de 1989 (2) respectivamente.

TABLA 6 ANALISIS ESTADISTICO EN DOS PARAMETROS

	B. bigemina Larvas N = 4	B. bovis Estabilizado/Larvas N = 4	
Incremento máxima temperatura	0.9 (0.6)	1.8 (0.4)	p = 0.04
IRC	1.25 (.96)	3.75 (2.22)	p = 0.08

TABLA 7 COMPARACION DE B. bigemina (Chinú, COLOMBIA) CON B. bigemina (Kericho, Kenya y Khon Khaen, TAILANDIA)

	Chinú Inóculo: Sangre N = 4	Kericho Inóculo: Sangre N = 4	Khon Khaen Inóculo: Sangre N = 4
Promedios máxima parasitemia %	3.1	5.3	4.7
Promedio máximo incremento temperatura corporal, °C	1.25	1.4	1.5
Promedios Indices Reacción clínica	1.75	4.5	4.75
Número (%) animales requirieron tratamiento	3 (75)	4 (100)	3 (75)
Berenil aplicado en	1 (25)	4 (100)	3 (75)

También se comparó **B. bovis** (Chinú) con la cepa australiana Lismore de **B. bovis** que se había utilizado para infectar cinco bovinos jóvenes de raza Holstein, esplenectomizados en el período comprendido entre el 12/5/82 y el 5/1/84; y dos bovinos más, jóvenes y enteros de la misma raza, que habían sido infectados en junio de 1986. Todos estos animales habían recibido diferentes dosis de sangre infectada s.c./i.v (Tabla 8).

Desafortunadamente, el grupo de datos de las reacciones clínicas de estos 15 animales no era tan completo como el de los 17 bovinos que se usaron para la presente caracterización nacional, pero se contó con los datos sobre las características más importantes de las reacciones clínicas.

TABLA 8 COMPARACION DE B. bovis (Chinú, COLOMBIA) CON B. bovis (Lismore, AUSTRALIA)

	Cepa Chinú	Cepa Lismore	
	Animales enteros Inóculo: Estabilizado/sangre N = 5	Animales enteros Inóculo: Sangre N = 2	Animales esplenectomizados Inóculo: Sangre N = 5
Promedio períodos prepatencia días	7.8	4	2.8
Promedio parasitemia máxima, %	0.3	2.2	4.1
Promedio máximo incremento temperatura corporal, °C	1.8	1.0	1.9
Promedios Indices Reacción Clínica	4.6	2.0	5.8
Número (%) animales que requirieron tratamiento	5 (100)	2 (100)	5 (100)
Berenil aplicado en	5 (100)	2 (100)	4 (80)

A juzgar por las cifras de IRC y el porcentaje de animales que requirieron tratamiento con Berenil, el aislamiento de Chinú parece más que todo benigno comparado con las cepas de Kenya y Tailandia.

La comparación de **B. bovis** (Chinú) con la cepa Australiana Lismore no originó un patrón claro que permitiera una opinión definitiva (Tabla 8). La de los dos grupos de animales enteros (sólo 2 para la cepa Lismore) parece indicar que **B. bovis** (Chinú) puede causar una reacción clínica un poco más violenta que

la cepa Australiana (elevaciones de la temperatura corporal e IRC). Por otra parte, la comparación de las reacciones con los animales esplenectomizados del grupo Lismore, fuera del período de prepatencia más corto y tasas de parasitemia más altas -como era de esperarse en los animales esplenectomizados- no demostró una diferencia considerable en el grado de severidad de la enfermedad, excepto por el IRC que fue marcadamente más alto que en el grupo Chinú.

4. DISCUSION

4.1 Aislamiento de babesia y modo de transmisión

El aislamiento de **Babesia spp.** siguió la metodología clásica y no presentó problemas. El modo de transmisión natural en la cepa Chinú/bigemina, que algunos investigadores colombianos sospecharon era ligeramente diferente a la normal, siguió exactamente el patrón demostrado por Friedhoff y Smith (1981), es decir **B. bigemina** fue transmitida por las ninfas y los estadios adultos de la garrapata y **B. bovis** por las larvas.

Una cepa de **B. bigemina** y otra de **B. bovis** se mantuvieron en congelación y están disponibles para investigaciones futuras en Colombia y en otros países.

4.2 Cultivo in vitro de babesia

El cultivo in vitro de **B. bovis** se realizó con éxito después de superar algunas dificultades iniciales. El comportamiento de la cepa en el cultivo corresponde a aquel de otros aislamientos bajo condiciones similares. Hasta la fecha no se ha deteriorado ni su infectividad en bovinos (>200 pasajes), ni su antigenicidad en pruebas serológicas (IFAT, FC, ELISA). Los intentos por realizar cultivo in vitro de **B. bigemina** fracasaron.

4.3 Caracterización de **B. bovis** y **B. bigemina**

4.3.1 Comparación serológica

Las investigaciones realizadas por Tropberger (1987, IFAT) y Doherr (1990, ELISA) han demostrado que los sueros del área del Chinú reaccionan con títulos más altos para el antígeno de **B. bovis** de la misma área que para un antígeno producido a partir de una cepa Australiana Lismore. Esto lo confirmó Doherr quién demostró (ELISA) una situación similar con respecto a la cepa Chinú/bovis y sueros del Valle del Cauca y áreas adyacentes en Quindío. Esto indica que existe una variabilidad de cepas, al menos en lo que se refiere a serología en Colombia. Si ésto implica la posibilidad de variación también en los grados de patogenicidad en el país, tendrá que verificarse a través de una investigación sobre éste aspecto.

4.3.2 Comparación clínica

Al compararse **B. bigemina** (Chinú) y **B. bovis** (Chinú) en grupos de animales inoculados con una cepa pura se comprobó que eran muy diferentes en cuanto a los efectos clínicos que producían. **B. bigemina**

ocasionó reacciones relativamente leves; en particular cuando la inoculación se hizo por vía natural (larvas), los animales infectados escasamente mostraron síntomas clínicos y sólo uno de cuatro requirió tratamiento debido a una parasitemia inusualmente alta. Las reacciones clínicas de los infectados con sangre y vía s.c. o i.v. fueron más fuertes pero aún mucho menos que aquellas causadas por **B. bovis**. La infección por **B. bigemina** (Chinú) también pareció ser más suave que las dos cepas foráneas de este hemoparásito (Kericho, Kenya y Khon Khaen, Tailandia), que se habían utilizado previamente en el Instituto para infectar bovinos enteros de raza y edad similar.

Por otra parte, **B. bovis** (Chinú) fue aparentemente una cepa de virulencia considerable. En éste grupo, los cinco animales se enfermaron sin importar su fuente de infección (larvas, estabilizado o sangre), con reacciones que, con un alto grado de probabilidad, habrían sido fatales. Todos estos animales tuvieron que tratarse y únicamente en dos casos fue suficiente una sola dosis alta de Berenil para controlar la enfermedad. En dos animales se observaron síntomas serios cuando la parasitemia era ya tan baja como 0.01%.

Casi la misma situación prevaleció en el grupo de animales que habían sido inoculados con la cepa original de campo, a través de larvas (3 casos) o estabilizado de larvas vía s.c./i.v. Todos desarrollaron una infección mixta, aunque **B. bigemina** estuvo claramente dominada si no completamente eclipsada por **B. bovis** en lo que se refiere al cuadro clínico. También mostraron excepcionalmente bajas parasitemias de **B. bigemina**. Todos los animales se enfermaron severamente y requirieron tratamiento con Berenil.

Fue posible comparar las reacciones clínicas de **B. bovis** (Chinú) con aquellas de **B. bovis** (Lismore) en dos animales enteros y cinco esplenectomizados infectados previamente con sangre. En los primeros dos, la enfermedad producida por **B. bovis** (Lismore) fue marcadamente más leve que aquella ocasionada por **B. bovis** (Chinú); los animales esplenectomizados habían reaccionado en una forma más severa a la infección con **B. bovis** (Lismore), razón por la cual no se pueden sacar conclusiones de esta comparación.

La cepa **B. bigemina** (Chinú) parecía menos virulenta que la cepa Khericho de Kenya y la cepa Khon Khaen de Tailandia.

5. RESUMEN

Se recibieron larvas de **B. microplus** procedentes de Chinú, Córdoba, Colombia y a partir de éstas se aislaron, se separaron y se criopreservaron **B. bigemina** y **B. bovis** como cepas puras.

El cultivo de **B. bovis** se realizó con éxito; aún se conserva y está a disposición como material de referencia y para otros propósitos.

La comparación serológica de **B. bovis** (Chinú) con la cepa australiana Lismore mostró diferencias entre las dos al someterlas a la prueba IFAT (títulos más bajos en el sistema heterólogo). Se pudo demostrar lo mismo al utilizar la técnica ELISA con la cepa Chinú de **B. bovis** al compararla nuevamente con la cepa Lismore y con unos sueros del Valle del Cauca.

La caracterización clínica mostró que **B. bigemina** (Chinú) era más bien suave comparada con **B. bovis** (Chinú). Esta última ocasionó reacciones clínicas severas que pusieron en peligro la vida de los animales

experimentales requiriendo un tratamiento intensivo. El aislamiento de campo que produjo infecciones mixtas de **B. bigemina/bovis** tuvo un efecto tan severo como el anterior.

Se comparó **B. bigemina** (Chinú) con **B. bigemina** (Kericho, Kenya) y **B. bigemina** (Khon Khaen, Tailandia) y aparentemente fue menos virulenta que las otras dos cepas.

Cuando se comparó **B. bovis** (Chinú) con la cepa **B. bovis** (Lismore) se observó una virulencia aparentemente mayor que la de ésta última en dos animales enteros, pero con los esplenectomizados ocurrió lo contrario.

**VII. TECNICA DEL ENSAYO INMUNOENZIMATICO (ELISA) PARA
DEMOSTRAR INFECCIONES POR B. bovis BASADOS
EN UN ANTIGENO DE CULTIVO DE B. bovis**

Por

M.G.E. Doherr

Extractado de: Enzymserologisches Verfahren (ELISA) unter Verwendung von Kultur-Antigen zum Nachweis von B. bovis-Infektionen. Dissertation, Hannover, 1991.

INDICE CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION	195
2. REVISION DE LITERATURA	195
2.1 Cultivo de babesia	195
2.2 Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)	195
2.2.1 Aspectos generales	195
2.2.2 El uso de ELISA en protozoología	198
2.2.3 ELISA <i>B. bovis</i>	198
2.3 Términos caracterizantes para las pruebas serológicas	198
2.3.1 Sensibilidad y especificidad	199
2.3.2 Exactitud	199
2.3.3 Prevalencia	199
2.3.4 Valor predictivo	199
2.3.5 Repetibilidad y concordancia	199
2.3.6 Características de las pruebas serológicas y fórmulas para el cálculo	199
3. MATERIALES Y METODOS	201
3.1 Materiales	201
3.1.1 Antígenos	201
3.1.1.1 Antígeno de <i>B. bovis</i> australiano (Antígeno A)	201
3.1.1.2 Antígeno de <i>B. bovis</i> colombiano (Antígeno B)	201
3.1.1.3 Antígeno de eritrocitos no infectados (Antígeno C)	201
3.1.2 Sueros	201
3.1.2.1 Sueros negativos	201
3.1.2.2 Sueros de bovinos experimentales provenientes del Instituto	201
3.1.2.3 Sueros definidos provenientes de Queensland (Australia)	202
3.1.2.4 Sueros definidos procedentes de Israel	202
3.1.2.5 Sueros de campo procedentes de Córdoba, Colombia	202
3.1.2.6 Sueros de campo procedentes del Valle del Cauca (Valle), Colombia	202
3.1.3 Materiales empleados	202
3.2 Métodos	203
3.2.1 Preparación del antígeno	203
3.2.1.1 Antígeno australiano (Antígeno A)	203
3.2.1.2 Antígeno colombiano (Antígeno B)	203
3.2.1.3 Antígeno negativo conocido (Antígeno C)	204
3.2.2 Cobertura de las microplacas	204
3.2.3 Bloqueo de los receptores libres	204
3.2.4 Lavado	204
3.2.5 Aplicación del suero	204

	Página
3.2.6 Incubación del conjugado	204
3.2.7 Aplicación del sustrato	204
3.2.8 Lectura de los resultados	205
3.2.9 Procesamiento de los datos obtenidos	205
3.2.10 Estadística	205
4. RESULTADOS	205
4.1 Determinación de los niveles del punto de corte	205
4.1.1 Antígeno A (Australia)	205
4.1.2 Antígeno B (Colombia)	205
4.2 Sueros de animales infectados experimentalmente	206
4.2.1 Respuesta serológica a la infección con B. bovis	206
4.2.2 Examen para reacciones cruzadas	206
4.2.3 Comparación de los resultados de las pruebas de ELISA e IFAT en sueros de Israel	206
4.2.4 Características de la prueba ELISA para B. bovis	207
4.2.5 Resultados del examen de sueros de campo de origen colombiano	209
4.2.5.1 Sueros de campo de Córdoba (norte de Colombia)	209
4.2.5.2 Sueros de campo del Valle del Cauca (sur-occidente de Colombia)	213
5. DISCUSION	215
5.1 Técnica de ELISA	215
5.2 Comparación con las pruebas de ELISA- B. bovis descritas por otros autores	216
5.3 Comparación de las pruebas ELISA e IFAT	217
5.4 Comparación de los Antígenos A y B de ELISA	218
6. CONCLUSIONES	219
7. RESUMEN	220

INDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1	Publicaciones sobre Elisa con protozoarios y rickettsia desde 1980197
TABLA 2	Características de las pruebas serológicas200
TABLA 3	Examen para reacciones cruzadas en sueros bovinos con los antígenos A y B en la prueba ELISA206
TABLA 4	Comparación cualitativa de los resultados de las pruebas de IFAT y ELISA en 135 sueros de Israel207
TABLA 5	Sensibilidad, especificidad, exactitud y valor predictivo de B. bovis ELISA con los antígenos A (Australia) y B (Colombia), utilizando sueros definidos de bovinos experimentales210
TABLA 6	Comparación de los resultados de las pruebas IFAT y ELISA de 332 sueros bovinos de campo procedentes de Córdoba, Colombia con los antígenos A y B211
TABLA 7	Desviación entre los resultados de las pruebas IFAT y ELISA (Antígenos A y B) con 332 sueros bovinos de Córdoba en relación con los títulos IFAT211
TABLA 8	Comparación de los resultados de 309 sueros bovinos del Valle del Cauca, Colombia, analizados según las pruebas IFAT y ELISA con los antígenos A y B de B. bovis213
TABLA 9	Densidades ópticas (DO) y diferencias en densidades ópticas (DDO) de los antígenos A y B de B. bovis en la prueba de Elisa utilizando 28 sueros bovinos negativos216
TABLA 10	Comparación entre las reacciones de los antígenos A (Australia) y B (Colombia) con sueros de B. bovis homólogos y heterólogos219

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1	
Análisis de regresión lineal para la comparación de los antígenos A (Australia) y B (Colombia) utilizando sueros positivos conocidos procedentes de Israel	208
FIGURA 2	
Análisis de regresión lineal para comparar los antígenos (Australia) y B (Colombia) frente a sueros positivos de Córdoba (Colombia)	212
FIGURA 3	
Análisis de regresión lineal para la comparación de los antígenos A y B, empleando sueros positivos del Valle del Cauca	214

1. INTRODUCCION

Investigaciones anteriores realizadas en el Instituto de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria, Hannover, han estado encaminadas al mejoramiento y estandarización de la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT) (Zuerner, 1983; Mueller, 1984). El presente estudio describe el uso de la técnica del ensayo inmunoenzimático (ELISA), basada en un antígeno derivado de un cultivo de **B. bovis**, junto con una evaluación crítica de su aplicabilidad práctica mediante la comparación estadística con los resultados de las investigaciones previas.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Cultivo de babesia

Los primeros intentos exitosos para cultivar **B. bovis** han sido descritos por Erp et al. (1978, 1981). Cuning y Winger (1978), Kellermann et al. (1988) y Goff y Yunker (1988) mejoraron y extendieron a otras variedades de **Babesia** el método resultante. Timms y Stewart (1989) describieron un método mejorado de suspensión del cultivo de **B. bovis** el cual permite la extracción diaria de más de un litro de sangre del sistema del cultivo.

2.2 Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)

2.2.1 Aspectos generales

Los ensayos inmunoenzimáticos, categoría a la cual pertenece la prueba de ELISA, se fundamentan en dos fenómenos biológicos:

1. La capacidad discriminante extraordinaria de los anticuerpos específicos del sistema inmune.
2. La alta potencia catalítica y la especificidad de las enzimas, la mayoría de las cuales son relativamente fáciles de demostrar.

La técnica de diagnóstico originada, por lo tanto es una prueba de dos pasos compuesta de:

- a. una acción inmune (antígeno/anticuerpo), y
- b. su demostración óptica a través de enzimas unidas a uno de los componentes de ésta reacción.

Este método tiene muchas ventajas:

- Un grado relativamente alto de objetividad en la lectura de los resultados sin mucho gasto de equipo,

- la disponibilidad de reactivos estables y durables,
- la simplicidad de manejar aún grandes cantidades de muestras,
- la disponibilidad comercial de una gran variedad de conjugados y enzimas,
- bajos riesgos de salud para el personal que lo ejecuta,
- relativamente poco gasto en equipo y materiales.

Sin embargo, existen también algunas desventajas:

- Reacciones con proteínas no específicas,
- reacciones cruzadas y otras interacciones indeseables,
- posible ocurrencia de anticuerpos frente al reactivo de bloqueo,
- influencia de factores externos, tales como variación de temperatura, pH, etc.,
- la posibilidad de errores al pipetear, cuando se trabajan grandes cantidades de muestras.

El empleo de pruebas inmuno-enzimáticas altamente sensibles y específicas para la identificación y especificación de sustancias farmacológicamente importantes ha aumentado en una forma marcada en los últimos años (Kemeny y Chantler, 1988; Clark y Engvall, 1981). Según Duncan (1981) existen tres pruebas diferentes en uso:

1 Pruebas competitivas

Los anticuerpos de prueba y anticuerpos de enzimas compiten por epítopes en el antígeno inmobilizado.

2 Pruebas no competitivas

- a. el ANTICUERPO de la prueba está unido a un ANTIGENO inmobilizado y la reacción está demostrada por un ANTIGENO marcado con enzima o un ANTICUERPO captor específico del animal,
- b. el ANTICUERPO de la prueba está unido a un ANTICUERPO captor específico de la especie y la reacción está demostrada a través de un ANTIGENO marcado con enzima.

La forma más simple de la prueba utilizada es la así llamada "**Sandwich ELISA**", una prueba indirecta, no competitiva en la cual el antígeno, esparcido en una bandeja de microtitulación, se incuba primero con el anticuerpo de la prueba y luego con el anticuerpo marcado con la enzima (conjugado). Finalmente, los complejos enzimáticos unidos se hacen visibles a través de una reacción enzima/sustrato (Kemeny y Chantler, 1988; Clark y Engvall, 1981).

TABLA 1 PUBLICACIONES SOBRE ELISA CON protozoarios Y rickettsias DESDE 1980

Welland	1980	Babesia divergens
Welland et al.	1980a	Babesia divergens
Welland et al.	1980b	Babesia bovina
Rauch	1981	Babesia divergens
Barry et al.	1982	Babesia bovis
Ebert	1982	Babesia rhodaini
Goetz	1982	Babesia equi
Liddell et al.	1982	Babesia divergens
Hassane	1983	Babesia bovina y equina
Timms et al.	1983	Babesia bovis
Ullmann	1983	Babesia bovina
Aicher	1984	Babesia equi/caballi
Buschmann	1985	Babesia patógena humana
O'Donoghue et al.	1985	Babesia bigemina
Winger and Canning	1985	Babesia divergens
Barry et al.	1986	Anaplasma marginale
Jidaisho et al.	1986	Babesia ovata
Welland	1986	Babesia equina
Zweygarth et al.	1986	Trypanosoma brucei
Caille	1987	Trypanosoma, babesia
James et al.	1987	Pl. falciparum, B. bovis
Lang et al.	1987	Eperythrozoon ovis
Montealetgre et al.	1987	Babesia bovis
Reiter et al.	1987	Trypanosoma theileri
Steuber et al.	1987	Trypanosoma
Tenter	1987	Sarcocystis muris
Waltisbuhl et al.	1987	Babesia bovis
Beier et al.	1988	Plasmodia
Collins et al.	1988	Plasmodium malariae
Duzgun et al.	1988	Anaplasma marginale
Gottstein et al.	1988	Leishmania donovani
Jongejan et al.	1988a	Trypanosoma congolense
Jongejan et al.	1988b	Piroplasmosis bovina
Nakamura et al.	1988	Anaplasma marginale
Shimizu et al.	1988	Theileria sergenti
Tenter	1988	Sarcocystis muris
Kachani	1989	Theileria annulata
Srivastava et al.	1989	Plasmodia
Zwernemann	1989	Babesia bovis
Nierlich	1990	Babesia bovis
Boese et al.	1990	Babesia bovis

2.2.2 El empleo de ELISA en Protozoología

El uso de ELISA en Protozoología ha tenido un fuerte incremento en los últimos años. La Tabla 1 presenta una lista (incompleta) de publicaciones sobre este tema desde 1980.

2.2.3 ELISA *B. bovis*

Barry et al. (1982) fueron los primeros en describir el uso de la prueba ELISA en el diagnóstico serológico de las infecciones con *B. bovis*, basado en antígeno lisado. Ellos encontraron una concordancia de 95.2% en relación con los resultados del IFAT y un grado más alto de sensibilidad en ELISA. No se presentaron reacciones cruzadas con *B. bigemina*, *A. centrale* y *Theileria spp.* Timms et al. (1983) utilizaron con éxito la prueba de ELISA para el monitoreo serológico de reacciones de vacunación y desafío de infecciones.

Los resultados de investigaciones posteriores fueron publicados por Waltisbuhl et al. (1987). Se compararon varias fracciones de antígenos lisados, separados mediante filtración en geles, utilizando sueros que habían sido absorbidos con antígenos negativos elaborados a partir de proteínas de eritrocitos. Ocurrieron reacciones cruzadas sólo con sueros de *A. marginale*. Los anticuerpos se demostraron hasta cuatro años después de la infección en el 80% de los animales examinados.

Caille (1987) utilizó ELISA con antígeno de *B. rodhaini* para el diagnóstico de babesiosis bovina en Somalia.

Montealegre et al. (1987) emplearon ELISA (ensayo inmunoenzimático de doble sitio) para demostrar antígenos, con el fin de probar la reactividad de aislamientos de varias cepas suramericanas de *B. bovis*. Se observaron reacciones cruzadas de antígenos de *B. bigemina* con IgG específica para *B. bovis*.

James et al. (1987), emplearon una prueba similar para investigar la naturaleza de reacciones cruzadas entre *B. bovis* y *Plasmodium falciparum*, cuya ocurrencia habían observado y las cuales habían sido pronunciadas después de infecciones agudas.

Boese et al. (1987), publicaron los resultados de investigaciones las cuales se habían encaminado a ciertas mejoras de la prueba ELISA según lo descrito por Waltisbuhl et al. (1987) y en particular al uso de un antígeno recombinante y "una prueba de ELISA de cinética (KELA)" para procesamiento. Los resultados de ambas pruebas tuvieron una buena concordancia; no ocurrieron reacciones cruzadas con *B. bigemina*, *A. marginale* ni *Th. orientalis*.

2.3 Términos caracterizantes para las pruebas serológicas

La vaga aplicación de términos tales como "exactitud", "precisión", "sensibilidad", etc., de pruebas serológicas pueden prestarse a confusiones al describir los resultados de investigaciones basadas en éstas y según Tijssen (1985), es difícil si no imposible interpretar y comparar resultados sin definiciones exactas.

Idealmente, la exactitud de todas las pruebas serológicas debería establecerse comparando sus resultados con aquellos de pruebas estándar conocidas (preferiblemente de una naturaleza biológica diferente, a saber: serología vs. microscopía, etc.), con el objetivo primordial de evaluar los porcentajes de reacciones negativas o positivas verdaderas y falsas (Smith, 1990).

2.3.1 Sensibilidad y especificidad

La sensibilidad (tasa de positivos verdaderos) de una prueba determinada, se define como el grado de probabilidad de que un animal infectado reaccione positivamente cuando se efectúa la prueba; la especificidad (tasa de negativos verdaderos) es la expresión del grado de probabilidad de que un animal no infectado reaccione negativamente. De esto se desprende que, en una prueba con un bajo grado de sensibilidad, la probabilidad de reacciones falsas negativas es alta, mientras que una prueba con un bajo grado de especificidad produce porcentajes correspondientemente altos de reacciones falsas positivas. Los resultados negativos son más confiables en pruebas con alta sensibilidad; las pruebas altamente específicas aportan resultados positivos más confiables (Smith, 1990). Las fórmulas para el cálculo de niveles de sensibilidad y especificidad se presentan en la Tabla 2 (Martín, 1977; Tyler y Cullor, 1989; Romatowski, 1989).

2.3.2 Exactitud

Exactitud también denominada validez de una prueba, es el porcentaje de todos los resultados correctos (positivos y negativos) obtenidos por la prueba (Smith, 1990). Es la expresión del grado de probabilidad de que el resultado de una prueba sea correcto.

2.3.3 Prevalencia

El término prevalencia indica el porcentaje de animales infectados (positivos) dentro de una población investigada (Margolis, 1982).

2.3.4 Valor predictivo

El valor predictivo del resultado positivo o negativo de una prueba es el grado de probabilidad de que éstos resultados sean correctos (Smith, 1990).

2.3.5 Repetibilidad y concordancia

El término "repetibilidad" se refiere al grado de conformidad de los resultados en repetidas pruebas con los mismos componentes; concordancia, al grado de conformidad entre pruebas con diferentes componentes (Smith, 1990).

2.3.6 Características de las pruebas serológicas y fórmulas para el cálculo

Existen cuatro posibles combinaciones de resultados, dos de ellos correctos y dos falsos. Para el cálculo de sensibilidad, especificidad, exactitud, valor predictivo y prevalencia se utilizan las letras a, b, c y d (Smith, 1990), (Tabla 2).

TABLA 2 CARACTERISTICAS DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS

Resultado de la Prueba	Estado del animal	
	Infectado	No infectado
positivo	a positivo verdadero	b falso positivo
negativo	c falso negativo	d negativo verdadero
	a + c	b + d

Fórmula para calculo de:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a + c}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{b + d}$$

$$\text{Exactitud} = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

$$\text{Prevalencia} = \frac{a + c}{a + b + c + d}$$

$$\text{Valor predictivo, prueba positiva} = \frac{a}{a + b}$$

$$\text{Valor predictivo, prueba negativa} = \frac{d}{c + d}$$

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Antígenos

3.1.1.1 Antígeno B. bovis australiano (Antígeno A)

Este antígeno había sido puesto a disposición del Instituto por el Dr. Waltisbuhl en Mayo de 1989. Se había aislado de un bovino infectado en Queensland, Australia, el 12/12/1988 y se procesó según el método descrito por Goodger et al. (1983).

3.1.1.2 Antígeno B. bovis colombiano (Antígeno B)

Tropberger (1987) y Zips (1967) describieron el antígeno colombiano utilizado en la presente investigación. Había sido aislado en el Instituto de Parasitología, Hannover (llamado el Instituto en el siguiente), a partir de garrapatas recibidas del Chinú, Córdoba, Colombia en 1986 y se propagó en suspensión de cultivo de eritrocitos durante varios años. El cultivo había sido realizado según la técnica de microaerófila en fase estacionaria (MASP) (Levy y Ristic, 1980) en microplacas con 24 celdas cada una y con 5% de CO₂ en el aire, a 38 °C y una humedad relativa superior a 90%. El medio de cultivo fue RPMI 1640 (Flujo) con HEPES buffer más 40% de suero bovino, penicilina-estreptomina, carbonato de sodio, L-glutamina y HCl. El medio se cambió a diario. La producción del antígeno se describe en el numeral 3.2.1.2. El antígeno se empleó sin fraccionar.

3.1.1.3 Antígeno de eritrocitos no infectados (Antígeno C)

El antígeno C se produjo a partir de una combinación de eritrocitos de 24 bovinos de 6 a 9 meses de edad. Se empleó según lo descrito por Doerr y Geiger (1988) y por Duzgun et al. (1988).

3.1.2 Sueros

3.1.2.1 Sueros negativos

Se examinaron 57 sueros de 31 bovinos del Instituto por la prueba de ELISA, algunos de ellos ya habían servido como controles negativos en investigaciones anteriores. Los niveles de corte se establecieron con base en sus densidades ópticas (DO) más tres veces la desviación estándar. En cada una de las microplacas para ELISA se mantuvo uno de estos sueros como control negativo.

3.1.2.2 Sueros de bovinos experimentales provenientes del Instituto

Se contó con 17 sueros de 17 bovinos que habían sido infectados experimentalmente con **B. bovis** entre 1982 y 1988. En las microplacas se mantuvieron como controles positivos los sueros de dos de estos animales (2 celdas cada uno).

3.1.2.3 Sueros definidos procedentes de Queensland (Australia)

Los sueros se recibieron de Australia, procedentes de 19 animales que habían sido infectados con *Theileria orientalis*, de 11 animales infectados con *B. bigemina* y 10 infectados con *A. marginale*. Los sueros habían sido analizados en Australia mediante la prueba IFAT y también con dos fracciones diferentes de antígeno *B. bovis* - por la prueba ELISA (Nierlich, 1990).

3.2.1.4 Sueros definidos procedentes de Israel

También se recibieron 135 sueros de 23 animales que habían sido utilizados en Israel en 1988/89 durante un experimento de vacunación/desafío y que habían sido luego analizados en forma repetida (IFAT, parasitemia, clínica) (Zwernemann, 1989).

3.1.2.5 Sueros de campo procedentes de Córdoba, Colombia

De un total de 1191 sueros los cuales habían sido colectados durante una investigación de campo en el Departamento de Córdoba, se analizó una muestra de 332 mediante la prueba ELISA. Estos sueros habían sido examinados anteriormente por Zips, 1990 (IFAT) para infección de *B. bovis*. Un porcentaje moderado de estos sueros mostró signos de deterioro en varios grados (consistencia y color).

3.1.2.6 Sueros de campo procedentes del Valle del Cauca (Valle), Colombia

También se dispuso de 309 sueros de 60 animales procedentes de una finca localizada en el Valle del Cauca, en el sur-occidente de Colombia, los cuales habían sido recolectados en 1988/89 durante una investigación de campo realizada allí (Zintz, 1990) y se habían analizado mediante las pruebas IFAT para *B. bovis* y de aglutinación rápida para infección de *A. marginale*.

3.1.3 Materiales empleados

Conjugado:	IgG antibovina marcada con peroxidasa*
Sustrato:	ácido-5-amino hydroxybenzoico (5-As)**
Buffer de cobertura:	solución tampón carbonato, pH 9.6
Reactivo de bloqueo:	Buffer de cobertura más leche en polvo al 5% (p/v)***
Buffer de dilución:	PBS**** (sin potasio), pH 7.2, con suero equino al 1% (v/v)***
Buffer sustrato:	Fosfato de sodio/sodio-EDTA-buffer
Solución de lavado	PBS (sin Potasio), pH 7.2, con Tween 20 al 0.05% (v/v)
Microplacas:	Greiner ELISA-Platten Kd, alta capacidad de adhesión, No. 655061

* Jackson Immunoresearch Lab.

** Merck (Art. No. 820095), purificación según Ellens y Gielkens, 1980).

3.2 Métodos

3.2.1 Preparación del antígeno

3.2.1.1 Antígeno australiano (Antígeno A)

El antígeno australiano fue suministrado por Waltisbuhl en mayo de 1989; se había preparado siguiendo el procedimiento descrito por Goodger et al. (1983), éste es, la sangre infectada con *B. bovis* se concentró primero mediante lisis selectiva en solución hipotónica de NaCl, hasta contener finalmente 95% de eritrocitos parasitados. Este concentrado se lisó luego utilizando cinco veces su volumen de agua bidestilada helada. Después de centrifugar a 10.000 g y 4 °C durante 60 minutos, el sobrenadante se conservó en porciones de 20 microlitros a -70 °C, para ser utilizado posteriormente a una dilución de 1/600 (correspondiente a un contenido de proteína de 8 microgramos/ml) en la prueba de ELISA. Para establecer la dilución óptima, el antígeno y el conjugado se sometieron a una titulación cruzada usándose una dilución constante del suero de 1/200 y se determinó la combinación de las diluciones la cual produjera una DO de 1.0 a una longitud de onda de 490 nm.

3.2.1.2 Antígeno colombiano (Antígeno B)

Con el fin de obtener una cantidad suficiente de antígeno, el material disponible del cultivo de *B. bovis* (80 a 100 ml, hematocrito aproximadamente 10%, 5% a 8% eritrocitos parasitados), se centrifugó, (1.500 g, 4 °C, 10 minutos) en PBS estéril (pH 7.2), tres veces y el sobrenadante se descartó. Ese procedimiento se repitió a intervalos de una semana durante un período de tres meses. Los eritrocitos no infectados del último sedimento, se lisaron en forma selectiva, adicionando 9 veces el volumen de solución salina estéril helada (0.06 mol, correspondiente al 0.35%); el proceso de lisis se interrumpió después de 30 minutos mediante la adición del mismo volumen de PBS estéril (pH 7.2). Después de otra centrifugación (4.000 g, 4 °C, 30 minutos), el sobrenadante y la capa de eritrocitos lisados se descartaron y el botón oscuro de sedimento (eritrocitos parasitados y babesias libres) se suspendió nuevamente en 2 ml de PBS estéril y se mantuvo a -20 °C.

Para un procesamiento posterior, se descongeló el material colectado y los eritrocitos parasitados se lisaron adicionando 9 veces el volumen de agua helada bidestilada a la vez que se agitaba suavemente el material. La lisis se interrumpió después de un minuto, agregando 1/10 del volumen de PBS 10 veces concentrada, seguida por centrifugación (4.000 g, 4 °C, 30 minutos). El sobrenadante y la capa de los eritrocitos se removieron y el botón oscuro de sedimento de merozoitos libres se resuspendió en 4 ml de PBS estéril (pH 7.2). La suspensión se expuso luego a ondas ultrasónicas (MSE 150 vatios, desintegrador ultrasónico MK2), mientras se enfriaba en hielo, durante períodos de 10 segundos e intervalos de 10 segundos cada uno, a una amplitud máxima de 10 mamp. Enseguida se ultracentrifugó (35.000 g, 4 °C, 20 minutos). Luego, con una pipeta, se extrajo el sobrenadante, se dividió en porciones y se mantuvo a -70 °C. La dilución de trabajo en el buffer de cobertura se determinó según lo descrito para el Antígeno A y resultó ser 1/600 (correspondiente a un contenido de proteína de 4.2 micrograms/ml).

*** p/v = peso/volumen
v/v = volumen/volumen

**** Solución salina tampón (buffer) de fosfatos

3.2.1.3 Antígeno negativo conocido (Antígeno C)

El pool de eritrocitos no infectados se lisó en nueve veces el volumen de agua helada bidestilada y por ultrasonido y se ultracentrifugó según lo descrito para el antígeno B. El antígeno C se diluyó hasta obtener la misma densidad óptica con el suero de referencia negativo, como en el caso de los Antígenos A y B (1/1.000 en este caso, contenido de proteína 30 microgramos/ml).

3.2.2 Cobertura de las microplacas

En las columnas 1, 3, 5, 7, 9 y 11 de la microplaca se aplicó la cantidad de 100 microlitros de Antígenos A o B respectivamente; en las columnas 2, 4, 6, 8, 10 y 12 se colocó la misma porción de Antígeno C. Luego se cubrió la microplaca con una lámina de aluminio adhesiva y se incubó durante toda la noche a 4 °C.

3.2.3 Bloqueo de los receptores libres

Las microplacas se desocuparon y luego se llenaron las celdas, sin previo lavado, con 200 microlitros de reactivo de bloqueo (buffer de cobertura más leche en polvo al 5%), después se cubrieron nuevamente con la lámina de aluminio adhesivo y se incubaron durante 1 hora a 37 °C.

3.2.4 Lavado

Las microplacas se desocuparon y todas las celdas se llenaron con PBS-Tween (0.05%) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Este procedimiento se repitió dos veces. Después se secaron secudiéndolas sobre un material absorbente.

3.2.5 Aplicación del suero

Después del último lavado y secado de las microplacas, se aplicó el suero (dilución de 1/200 en PBS más suero equino al 1%), de tal manera que las celdas de un suero más el antígeno positivo y las celdas de un suero más el antígeno negativo quedaran a lado y lado en una fila. Las dos primeras columnas (A1/A2 hasta H1/H2) de cada microplaca se reservaron para los controles. En cada una de las celdas se aplicaron 100 microlitros de suero. Luego se cubrieron con la lámina de aluminio adhesivo y se incubaron durante dos horas a 37 °C. Después de esto, se lavaron según lo descrito anteriormente.

3.2.6 Incubación del conjugado

La dilución de trabajo del conjugado se determinó junto a aquella de los antígenos, por titulación cruzada de acuerdo con lo descrito en el numeral 3.2.1.1. Esta se estableció en 1/1.000. Después de diluir en concordancia el conjugado con el PBS más suero equino al 1%, se colocaron 100 microlitros en cada celda. Las microplacas se cubrieron con la lámina de aluminio adhesiva y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, se lavaron nuevamente las microplacas.

3.2.7 Aplicación del sustrato

El sustrato se disolvió a una proporción de 1 mg/ml en buffer sustrato y se calentó al baño María a 56 °C. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego se adicionó H₂O₂ al 0.1%. Este fluido se agitó brevemente

y se pipetearon 100 microlitros en cada celda. Después se incubó la microplaca durante 20 minutos a temperatura ambiente en un agitador.

3.2.8 Lectura de los resultados

Los resultados de la prueba se leyeron inmediatamente después de haber finalizado el período de incubación, utilizando un Inmunoreader NUNC (NJ-2.000) a una longitud de onda de 490 nm.

3.2.9 Procesamiento de los datos obtenidos

Los datos obtenidos en el lector de ELISA vía una termopresora se grabaron en un computador y para cada suero se calculó la diferencia de la DO entre el antígeno C (de eritrocitos negativos conocidos) y los antígenos A y B respectivamente. Estas diferencias de DO se utilizaron luego en las evaluaciones siguientes.

3.2.10 Estadística

La comparación de los resultados cualitativos obtenidos con los sueros bajo investigación en la prueba IFAT y entre los de ELISA de los antígenos A y B se realizó empleando el método Chi-cuadrado.

Los antígenos A y B también se compararon por análisis de regresión lineal y la determinación de correlaciones utilizando el coeficiente de correlación Bravais. Se aplicó la prueba t para evaluar las desviaciones entre los promedios de las dos muestras. Las fórmulas para estos procedimientos biométricos fueron publicadas por Rundfeld (1976).

4. RESULTADOS

4.1 Determinación de los niveles del punto de corte

4.1.1 Antígeno A (Australia)

Se encontró un promedio aritmético de 0.004 y una Desviación Estándar (DE) de 0.044 para las Diferencias de Densidad Óptica (DDO) al analizar el antígeno A frente al conjunto de sueros negativos conocidos. El promedio más tres veces la DE resultó en 0.128 para el nivel de corte entre negativo y positivo.

4.1.2 Antígeno B (Colombia)

Para el antígeno B, el promedio aritmético para las DDO fue de 0.31 y la DE de 0.043, resultando en un nivel de corte de 0.160.

4.2 Sueros de animales infectados experimentalmente

4.2.1 Respuesta serológica a la infección con *B. bovis*

Para el análisis mediante la prueba ELISA se dispuso de sueros de 10 bovinos del Instituto, tomados cuando se encontraban en la fase aguda de reacción a la infección experimental con *B. bovis*. En 9 de estos animales, las primeras reacciones positivas ocurrieron entre los días 9 y 21 **post Infección** (p.i.). Un animal, del cual se obtuvo el suero solamente hasta el día 20 p.i. mostró un aumento del promedio de las DDO, pero ésta no alcanzó por completo el nivel de corte establecido. Los sueros de dos animales se mantuvieron a disposición hasta el día 185 y 250 p.i. respectivamente. En ambos casos las DDO estuvieron aún claramente por encima de los niveles de corte en estos días.

4.2.2 Examen para reacciones cruzadas

Los sueros a ser examinados para reacciones cruzadas, se obtuvieron de 153 animales previamente infectados con *B. bigemina*, *B. divergens*, *A. marginale* y *Theileria spp.* Los resultados se presentan en la Tabla 3.

TABLA 3 EXAMEN PARA REACCIONES CRUZADAS EN SUEROS BOVINOS CON LOS ANTIGENOS A y B EN LA PRUEBA ELISA

Sueros	Origen	No. positivos con Antígeno		
		N	A	B
<i>B. bigemina</i>	Instituto Parasitología Hannover	24	0	0
<i>B. divergens</i>	Instituto Parasitología Hannover	55	0	1*
<i>A. marginale</i>	Instituto Parasitología Hannover	22	0	1**
<i>Th. annulata</i>	Instituto Parasitología Hannover	12	0	0
<i>B. bigemina</i>	Queensland, Australia	11	0	0
<i>A. marginale</i>	Queensland, Australia	10	1***	1***
<i>Th. orientalis</i>	Queensland, Australia	19	0	0

* DDO	Antígeno A: 0.017	Antígeno B: 0.193
** DDO	Antígeno A: -0.022	Antígeno B: 0.645
*** DDO	Antígeno A: 0.365	Antígeno B: 0.222

4.2.3 Comparación de los resultados de IFAT y ELISA en sueros de Israel

Se efectuó una comparación cualitativa de los resultados de IFAT y ELISA, utilizando los sueros definidos en Israel (135 de 23 animales, ver numeral 3.1.2.4). Los resultados se presentan en la Tabla 4. La prueba simple de Chi-cuadrado, para comparar frecuencias esperadas (resultados IFAT) con las frecuencias obtenidas en la prueba ELISA presentó un valor de 0.761 para el Antígeno A de ELISA y de 0.467 para el antígeno B, permaneciendo ambos bien por debajo del nivel de significancia (< 0.05) de 3.84, mostrando así que, cualitativamente no hubo desviaciones significativas entre los resultados de las dos pruebas.

TABLA 4

COMPARACION CUALITATIVA DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE IFAT Y ELISA EN 135 SUEROS DE ISRAEL

	Positivos IFAT	Coincidentemente positivos ELISA	
		Antígeno A	Antígeno B
Total N 135	61 (45.2%)	56 (41.5%)	57 (42.2%)

Todos los títulos de IFAT de aquellos sueros que fueron negativos en la prueba ELISA estaban en los grados (log 4) de 1/64 y 1/256; no se presentaron resultados desviados en los títulos por encima de este nivel hasta el máximo de 16.384 registrado. Todas, excepto una de las reacciones que fueron desviadamente negativas en la prueba de ELISA ocurrieron en sueros tomados antes del día 21 p.i.; el animal que hizo la excepción seroconvirtió sólo después de la infección de desafío.

Los resultados de aquellos sueros de Israel que habían reaccionado positivamente en la prueba ELISA se utilizaron para una comparación cuantitativa de los antígenos A y B mediante análisis de regresión (Figura 1). Su correlación fue muy buena ($r = 0.977$, $r^2 = 0.954$). La comparación del promedio de las DDO en la prueba t arrojaron un valor de 0.466, una cifra muy por debajo del límite para una desviación significativa ($p < 0.05$) entre los promedios para los sueros positivos con los antígenos A y B.

4.2.4 Características de la prueba ELISA para *B. bovis*

Para el cálculo de las cifras caracterizantes (según lo descrito en el numeral 2.3) para la prueba, se utilizaron todos los sueros de los bovinos del Instituto de Parasitología, previamente infectados en forma experimental (todos ellos procedentes de la parte norte de Alemania, donde no hay ocurrencia de *B. bovis*), habiéndose establecido su estado de infección sin lugar a dudas mediante la demostración de parasitemia y reacción clínica (usualmente más bien severa), mientras que el estado de no-infectados de los controles negativos había sido confirmado por la prueba IFAT. Además se incluyó un grupo de sueros de Israel, de animales que habían participado en un ensayo de vacunación y desafío de *B. bovis*, los cuales también habían sido examinados repetidamente (parasitemia, reacción clínica, IFAT). Los sueros restantes positivos y negativos conocidos provenían de Australia y se habían definido allí.

Por lo tanto se puede considerar que la metodología utilizada en la presente investigación para la caracterización de la prueba ELISA para *B. bovis* corresponde al requerimiento de basarse en procedimientos de pruebas biológicamente diferentes del método bajo escrutinio.

Los resultados de la caracterización de la prueba ELISA para *B. bovis* se obtuvieron de tres fracciones del total del grupo de sueros, principalmente (1) un total de 800 sueros incluidos, empezando con el día 1 p.i. y de este modo simulando una situación epidemiológica estándar; (2) sueros tomados después del día 20 p.i.; (3) sueros tomados después del día 29 p.i., así hasta llegar a una evaluación de los intervalos que se esperaban para que la prueba desarrollara su sensibilidad serológica completa y sobre las implicaciones de ésta para la epidemiología práctica.

Antigen A (Diferenz-OD)

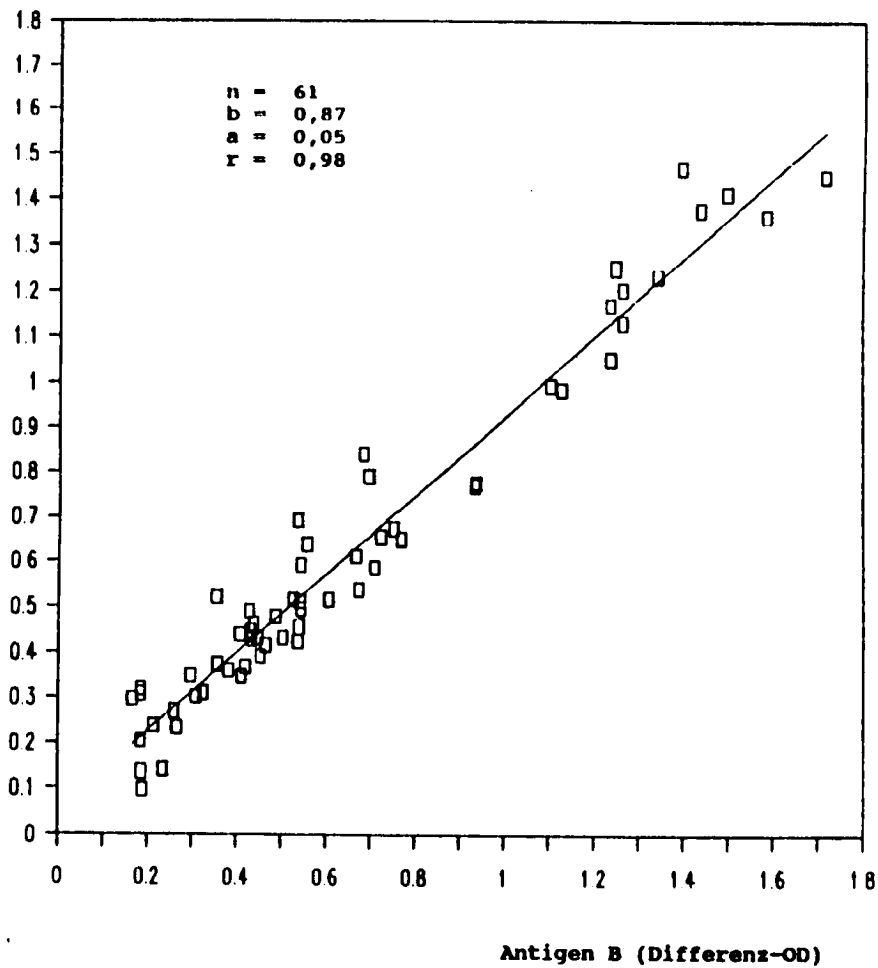


FIGURA 1 ANALISIS DE REGRESION LINEAL PARA LA COMPARACION DE LOS ANTIGENOS A (AUSTRALIA) Y B (COLOMBIA) UTILIZANDO SUEROS POSITIVOS CONOCIDOS PROCEDENTES DE ISRAEL (Diferenz-OD = DDO)

En la tabla 5 se presentan los resultados. Las características sobresalientes son:

- el hecho de existir una muy buena concordancia entre los dos antígenos A y B,
- el hecho de haber sido extremadamente baja la tasa de reacción de falsos positivos e igual en todos los tres grupos, indicando así un nivel de especificidad de la prueba muy alto (> 98%),
- un nivel de sensibilidad de 70% en el total de sueros que se incrementó a más del 90% cuando se excluyeron los sueros tomados durante las tres primeras semanas p.i.

4.2.5 Resultados del examen de sueros de campo de origen colombiano

4.2.5.1 Sueros de campo de Córdoba (norte de Colombia)

Un total de 332 sueros de campo de Córdoba/Colombia se sometió a exámenes comparativos por las pruebas IFAT y ELISA; el 54.8% había sido positivo a IFAT en investigaciones anteriores. En ELISA se encontró un 50.6% positivo al antígeno A y de 52.4% para el antígeno B (Tabla 6). Al comparar los resultados cualitativos en la prueba de Chi-cuadrado, el valor para IFAT/ELISA, Antígeno A fue de 2.38, aquel para IFAT/ELISA, Antígeno B fue 0.78. No se presentó desviación significativa de los resultados de IFAT de aquellos de ELISA, siendo el límite para ésta de 3.84 (< 0.05).

Al considerar las desviaciones entre los resultados de las pruebas IFAT y ELISA con los antígenos A y B en relación con los niveles de los títulos IFAT (Tabla 7), sobresalen dos hechos, a saber:

- que existe una concordancia absoluta entre los patrones de la desviación en la prueba de ELISA entre los dos antígenos, a excepción de la categoría IFAT 1/10 negativo y ELISA positivo con un efecto correspondiente en el subtotal,
- que el porcentaje más alto de las desviaciones (35.53%) se presenta en la categoría IFAT positivo/ELISA negativo al nivel más bajo del título de 1/20, descendiendo gradualmente a 0 al nivel de 1/640 para incrementarse luego a 12.5% al nivel de 1/1280.

TABLA 5

SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, EXACTITUD Y VALOR PREDICTIVO DE B. bovis ELISA CON LOS ANTIGENOS A (AUSTRALIA) y B (COLOMBIA), UTILIZANDO SUEROS DEFINIDOS DE BOVINOS

ANTIGENO A

	Sueros incluidos desde el día p.i.		
	1	21	30
Nr. (%) de sueros	800 (100)	688 (100)	653 (100)
Positivo verdadero	352 (29.0)	207 (30.1)	177 (27.1)
Falso positivo	5 (0.6)	5 (0.7)	5 (0.8)
Falso negativo	99 (12.4)	12 (1.7)	7 (1.1)
Negativo verdadero	464 (58.0)	464 (67.4)	464 (71.1)
Sensibilidad	70.1%	94.5%	96.2%
Especificidad	98.9%	98.9%	98.9%
Exactitud	87.0%	97.5%	98.2%
Valor predictivo resultado positivo	97.9%	97.6%	97.3%
Valor predictivo resultado negativo	82.4%	97.5%	98.5%

ANTIGENO B

Positivo verdadero	234 (29.5)	202 (29.4)	171 (26.6)
Falso positivo	7 (0.9)	7 (1.0)	7 (1.1)
Falso negativo	97 (12.1)	17 (2.5)	13 (2.0)
Negativo verdadero	462 (57.8)	462 (67.2)	462 (70.6)
Sensibilidad	70.7%	92.2%	92.9%
Especificidad	98.5%	98.5%	98.5%
Exactitud	87.0%	96.5%	96.9%
Valor predictivo resultado positivo	97.1%	96.7%	96.5%
Valor predictivo resultado negativo	82.2%	96.5%	97.3%
Columna No.	1	2	3

TABLA 6

COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS IFAT Y ELISA de 332 SUEROS BOVINOS DE CAMPO PROCEDENTES DE Córdoba, COLOMBIA CON LOS ANTIGENOS A y B

N	IFAT		ELISA		
	Positivos (%)	N	Antígeno A coincidentemente positivos (%)	N	Antígeno B coincidentemente positivos (%)
332	182 (54.8)	332	168 (50.6)	332	174 (52.4)
Desviación			4.2%	2.4%	

TABLA 7

DESVIACION ENTRE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS IFAT Y ELISA (ANTIGENOS A Y B) CON 332 SUEROS BOVINOS DE Córdoba EN RELACION CON LOS TITULOS IFAT

IFAT NEGATIVO

ELISA POSITIVO

	n	Antígeno A		Antígeno B	
		n	%	n	%
1/10 negativo	125	15	12.0	18	14.4
1/10 positivo	25	6	24.0	6	24.0
Total	150	21	14.0	24	16.0

IFAT POSITIVO

ELISA NEGATIVO

	n	n		%	
		n	%	n	%
1/20	17	6	35.3	6	35.3
1/40	35	16	29.1	16	29.1
1/80	30	6	20.0	6	20.0
1/160	24	3	12.5	3	12.5
1/320	28	3	10.7	3	10.7
1/640	20	0	--	0	--
1/1280	8	1	12.5	1	12.5
Total	182	35	19.2	35	19.2

El total de las desviaciones de los resultados de ELISA de los obtenidos en la prueba IFAT fue 19.2% en el caso de IFAT/positivo vs. ELISA/negativo y 14.0% y 16.0% respectivamente para IFAT/negativo vs. ELISA/positivo.

Los resultados obtenidos con los dos antígenos ELISA A y B, de los cuales el último se consideró era homólogo a los sueros examinados (ambos procedentes de la misma área de Colombia), se compararon luego utilizando la prueba de regresión lineal (Figura 2) y con la prueba t. Las desviaciones de los promedios de las DDO arrojaron un valor de la prueba t de 3.353 el cual es evidentemente significativo y aún se acerca al límite para una desviación altamente significativa (3.390; $p < 0.001$).

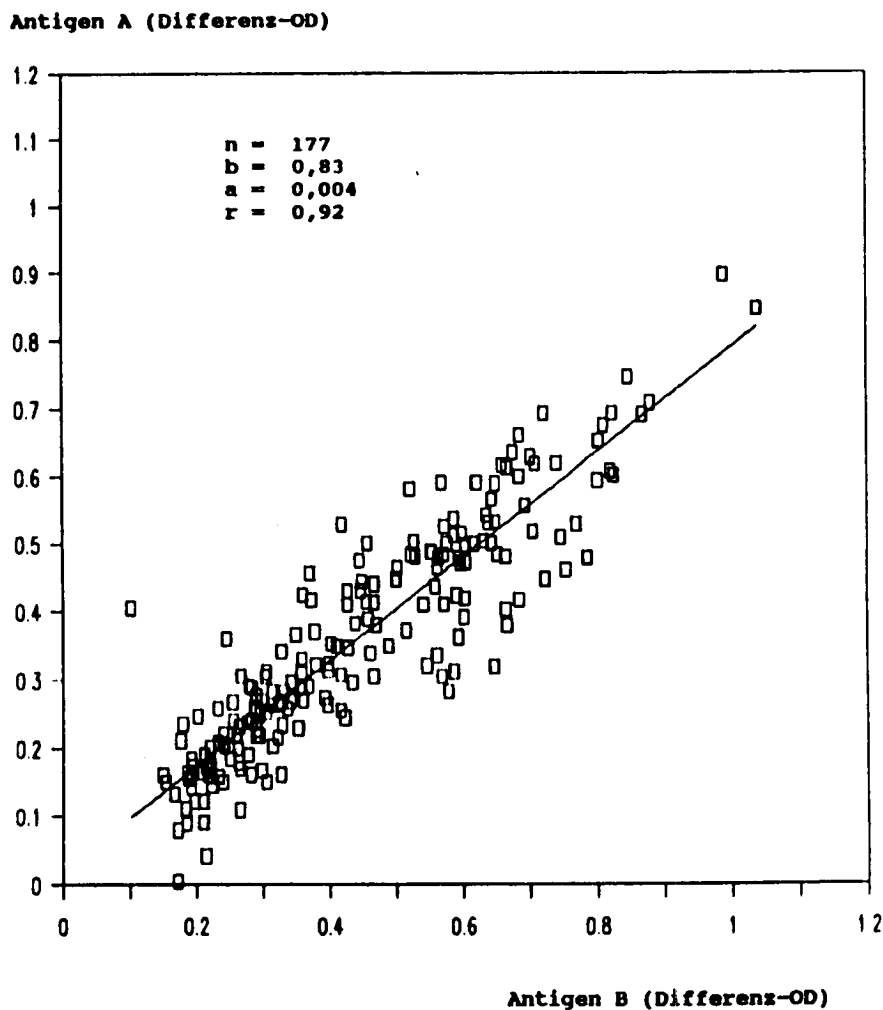


FIGURA 2 ANALISIS DE REGRESION LINEAL PARA COMPARAR LOS ANTIGENOS A (Australia) y B (Colombia) FRENTE A SUEROS POSITIVOS DE Córdoba (Colombia) (Differenz-OD = DDO)

4.2.5.2 Sueros de campo del Valle del Cauca (sur-occidente de Colombia)

Los resultados de las pruebas IFAT y ELISA con ambos antígenos A y B, empleando un grupo de 309 sueros de campo del Valle del Cauca se presentan en la Tabla 8.

TABLA 8 COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE 309 SUEROS BOVINOS DEL VALLE DEL CAUCA, COLOMBIA, ANALIZADOS SEGUN LAS PRUEBAS IFAT y ELISA CON LOS ANTIGENOS A Y B DE B. bovis

IFAT positivo (%)	ELISA	Antígeno A positivo (%)	Antígeno B positivo (%)
28/309 (9.1)		32/309* (10.4)	32/309** (10.4)
Después de repetir la prueba IFAT con los sueros anteriormente negativos (hecho en el campo):			
33/309 (10.7)		32/309*** (10.4)	32/309**** (10.4)

* 4 sueros (1.3%) desviadamente positivos

** 5 sueros (1.6%) desviadamente positivos; 1 suero (0.33%) desviadamente negativo

*** 1 suero (0.3%) desviadamente negativo

**** 2 sueros (0.6%) desviadamente negativos; 1 suero (0.3%) desviadamente positivo

La Figura 3 muestra el resultado de comparación de ELISA antígenos A y B basados en los sueros positivos a ELISA procedentes del Valle del Cauca, utilizando análisis de regresión lineal. El valor-t calculado a partir de los promedios de las DDO fue de 0.504, indicando que -contrario al caso de los sueros de Córdoba- no hubo diferencia significativa en las reacciones de los antígenos A y B. Esto permite la conclusión que el Antígeno B (de otra región dentro de Colombia) debe ser considerado como heterólogo para los sueros del Valle del Cauca, al igual que el antígeno A de Australia.

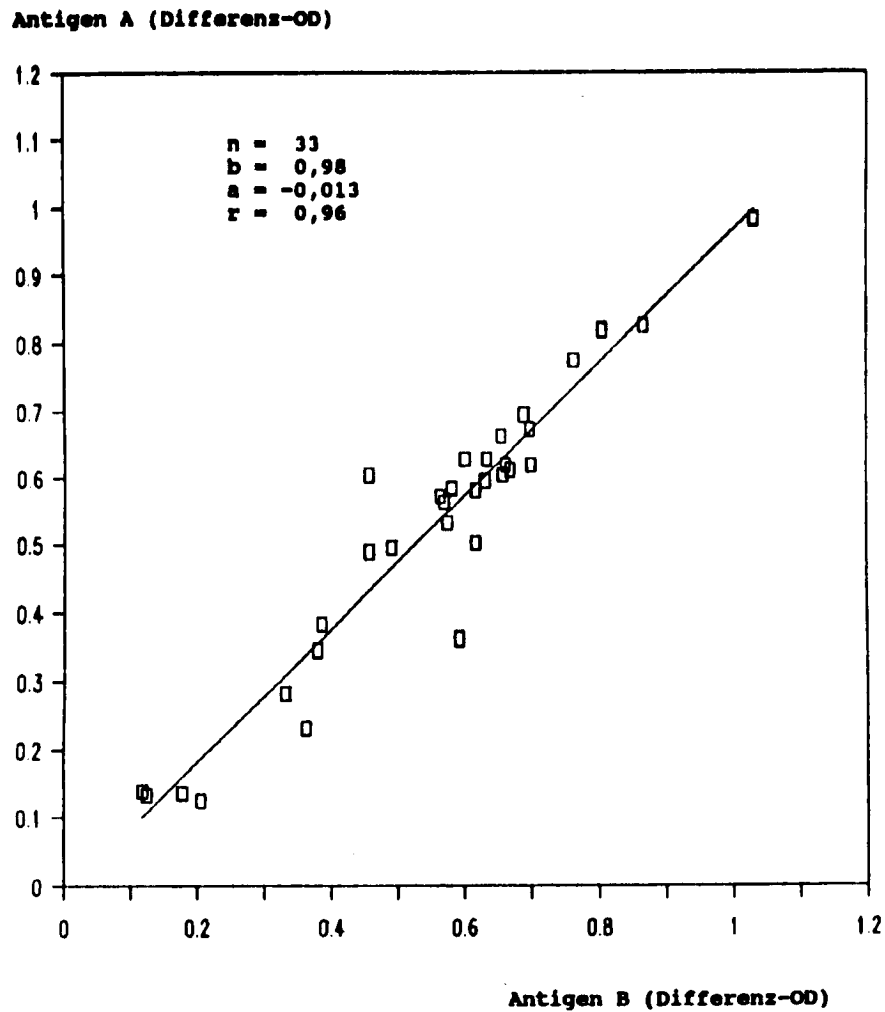


FIGURA 3

ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA COMPARACION DE LOS ANTIGENOS A Y B, EMPLEANDO SUEROS POSITIVOS DEL VALLE DEL CAUCA (Differenz-OD = DDO)

5. DISCUSION

5.1 Técnica ELISA

Las diluciones de los antígenos y conjugados se determinaron por titulación cruzada para cada lote. Se empleó leche en polvo como reactivo de bloqueo porque era más barata y fácil de manejar; Mohammad y Esen (1989) la han utilizado y preferido a otros agentes dondequiera que se ha considerado necesario el bloqueo.

Se desistió de la titulación de los sueros, según lo practicado en la prueba IFAT, ya que Barry et al. (1982, 1986) habían demostrado conformidad (estadísticamente significativa) entre los títulos y la "marcación de ELISA" (densidad óptica) en la dilución de trabajo y debido a que la titulación habría causado considerables gastos (microplacas, reactivos, mano de obra).

Se requirió que la preparación del antígeno fuera simple. Después del aislamiento de los merozoitos, de la lisis ultrasónica y la ultracentrifugación, se utilizó el sobrenadante como el antígeno-ELISA; no se estimó necesaria la separación de la hemoglobina.

Varios autores (Timms et al., 1983; Barry et al., 1986; Waltisbuhl et al., 1987; Duzgun et al., 1988) describieron problemas con fuertes reacciones no específicas en sueros negativos asumiendo que estas habían sido causadas por reacciones del anticuerpo con proteína del eritrocito en el antígeno; o por reacciones del conjugado no específico con inmunoglobulinas diferentes a IgG (Boese et al., 1990). Los anticuerpos contra proteínas del eritrocito aparecen después de repetidas inoculaciones con vacunas de sangre como aquellas utilizadas para el control de *A. marginale* y *B. bovis* (Osterhoff y De Vos, 1977; Timms et al., 1983; Barry et al., 1986). Los intentos para eliminar estas reacciones mediante el uso de varias técnicas de bloqueo o la incubación de los sueros antes de utilizarlos con proteínas de eritrocitos no infectados (Waltisbuhl et al., 1987) fracasaron. Boese et al. (1990) tuvieron más éxito al usar un antígeno recombinante y un conjugado de IgG anti-bovina monoclonal.

Hasta la fecha no se ha descrito como aplicada a *B. bovis* la técnica de emplear la diferencia de la densidad óptica calculada, es decir la diferencia entre las densidades ópticas de las reacciones con control sin antígeno y aquello del agente causal, como se hace en el diagnóstico viral y el de *A. marginale* (Doerr y Gelger, 1988; Duzgun et al., 1988). Los autores citados encontraron reacciones no específicas significativamente reducidas, total ausencia de resultados falsos negativos, 3% de falsos positivos y reacciones cruzadas en 2% de los sueros de *B. bovis* y 4% de los de *B. bigemina*.

A pesar de requerirse una mayor cantidad de microplacas de ELISA para este procedimiento, pareció ser una forma simple de demostrar reacciones que no eran causadas por el antígeno de babesia. La prueba demostró que, al utilizar sueros negativos y positivos, se presentaron reacciones con el antígeno C (de eritrocitos no infectados) con densidades ópticas superiores a 1.0 (nivel de corte > 0.160) en unos pocos casos. Con los sueros de animales infectados con *B. bovis*, las reacciones con los antígenos A y B de *B. bovis* fueron mucho más fuertes que con el antígeno C y se consideraron positivas sobre esta base. En la Tabla 9 se presenta un ejemplo de 28 sueros negativos, demostrando que la amplitud de variación al igual que las diferencias promedias de la DO de los antígenos A y B fueron más bajas que las densidades ópticas absolutas. La extensión de los resultados en el grupo de estos sueros fue mucho más reducida. Además, la evaluación óptica directa de las reacciones de sueros individuales con los antígenos de *B. bovis*

contra aquellos con el antígeno C -excepto en casos marginales- permitió valoraciones cualitativas tentativas ya antes de efectuar la medición fotométrica.

TABLA 9 DENSIDADES OPTICAS (DO) Y DIFERENCIAS EN DENSIDADES OPTICAS (DDO) DE LOS ANTIGENOS A Y B DE *B. bovis* EN LA PRUEBA DE ELISA UTILIZANDO 28 SUEROS BOVINOS NEGATIVOS

DO	Mínimo	Máximo	Amplitud*	Promedio
Antígeno A	0.035	0.419	0.384	0.227
Antígeno C	0.027	0.056	0.479	0.254
Diferencia DO**	-0.160	0.080	0.240	-0.028
Antígeno B	0.094	0.451	0.357	0.276
Antígeno C	0.022	0.540	0.518	0.268
Diferencia DO**	-0.129	0.075	0.204	0.008

* Diferencia mínimo/máximo

** Promedios de DDO del Antígeno A o B menos el promedio de las DDO del antígeno C

5.2 Comparación con las pruebas de ELISA para *B. bovis* descritas por otros autores

En las presentes investigaciones, las primeras reacciones positivas se observaron en 33 bovinos infectados experimentalmente con *B. bovis* después del día 9 p.i.; después del día 21 p.i. todos, excepto uno, resultaron positivos. Uno de los animales permaneció disponible para exámenes periódicos hasta el día 250 p.i. Durante éste período fue positivo sin haber sido reinoculado. Estos resultados son similares a aquellos obtenidos por Waltisbuhl et al. (1987) y Barry et al. (1982), aunque el último grupo de autores observó la primera aparición de anticuerpos unos pocos días más tarde. La persistencia de reacciones positivas fue comparable.

No se observaron reacciones cruzadas con *B. bigemina* ni *Theileria spp.*, pero entre 55 animales infectados con *B. divergens* se presentó un suero con un nivel bajo de reacción positiva (DO de 0.193) con el presente antígeno B, mientras que con el antígeno A (DO 0.017) resultó negativo. Además, uno de 31 sueros de *A. marginale* reaccionó marcadamente positivo con uno de los antígenos de *B. bovis* pero resultó negativo en un examen de control posterior. La causa probablemente fue un error al pipetear o en las microplacas. También, hubo una reacción claramente positiva en un suero Australiano de *A. marginale* con ambos antígenos A y B, que se cree se debió a la identificación errada del suero o a una infección adicional accidental con *B. bovis* del animal en cuestión; la DO observada en este caso fue demasiado alta para una reacción cruzada. Probablemente se puede asumir, por lo tanto, que no hubo reacciones cruzadas con *A. marginale* en la presente investigación.

La prueba de ELISA mostró una especificidad muy alta (98.9% con el antígeno A y 98.5% con el antígeno

B) y una sensibilidad del 70.1% para el antígeno A y de 70.7% para el B, con un nivel de precisión del 87%. Las cifras de sensibilidad y precisión, sin embargo, probablemente se están subestimando un poco debido al hecho que el porcentaje de animales recién infectados en el grupo experimental, que aún no habían presentado seroconversión, fue desproporcionalmente alto comparado con las condiciones de campo epidemiológicas normales. En cualquier caso, el nivel de sensibilidad de la prueba se incrementó a 94.5% (antígeno A) y a 92.2% (antígeno B) el día 21 p.i. y a 96.2% y 92.9% respectivamente el día 30 p.i. La sensibilidad de la prueba de ELISA fue influenciada marcadamente por el vacío temporal de detección (máximo alrededor de tres semanas después de la infección), por lo tanto, puede considerarse por lo menos dentro del rango normal, comparada con otras pruebas serológicas.

La implicación práctica de los hallazgos anteriormente descritos es que las cifras de prevalencia, calculadas con base en los resultados de las pruebas de ELISA con sueros de estudios seccionales cruzados (encuestas con sólo un muestreo de sangre; prevalencia de punto), seguramente subestimarán la prevalencia real, mientras que aquellos obtenidos a través de repetidos exámenes de sangre en estudios longitudinales (prevalencia acumulada), tienden a acercarse a la realidad cuando, como en el caso de la presente prueba de ELISA con *B. bovis*, la sensibilidad se aproxima eventualmente al 100%.

5.3 Comparación de las pruebas de ELISA e IFAT

Mueller (1984) había observado en varios experimentos que las seroconversiones en la prueba IFAT con *B. bovis* ocurrían dentro de los 6 a 10 ó 7 a 18 días p.i. y que los títulos positivos persistían más de 100 días p.i.. Además, observó que las reacciones cruzadas ocurriendo con otras *Babesia spp.* fueron débiles. La autora considera que IFAT es lo suficientemente precisa como para emplearla en estudios epidemiológicos, no obstante, reconoce tres desventajas serias de la prueba, a saber:

- la inestabilidad del conjugado FITC utilizado (posibilidad de separación de la fluoresceína),
- el alto estrés del examinador al evaluar los resultados de la prueba (límite de 58 muestras por día),
- un cierto grado de variabilidad en la evaluación de los resultados entre diferentes examinadores.

La existencia de estas desventajas ha sido observada también por otros autores (Tropberger, 1987; Zips, 1989).

Al comparar los resultados de las pruebas con sueros de animales vacunados y desafiados, procedentes de Israel, fue evidente que las desviaciones cualitativas entre IFAT (realizadas por Zwernemann, 1989, en Israel) y ELISA, ocurrieron únicamente en los niveles más bajos de los títulos de 1/16 y 1/256 (log. 4) y sólo hasta el día 21 p.i. La incidencia de este suceso fue baja en general (3.7% para el antígeno A y 3.0% para el antígeno B). Después de la infección de desafío, la concordancia alcanzó el 100%. Las desviaciones fueron ocasionadas por errores en la valoración de los resultados de IFAT (principalmente relacionados con ciertas personas), o por evaluación errónea de los resultados de ELISA en la zona de transposición entre reacciones altas/negativas y bajas/positivas. Esta fuente de error, más bien común, fue la causa de que el valor predictivo de resultados negativos y positivos en la prueba de ELISA fuera inferior al 100%.

En cuanto a los sueros de campo de Córdoba (Colombia), el grado de concordancia entre la prueba de

IFAT (realizado por Zips) y ELISA fue un poco más bajo. Las desviaciones fueron 4.2% (antígeno A) y 2.4% (antígeno B), es decir, en ELISA 14% de los sueros fueron desviadamente positivos y 19.2% desviadamente negativos en el caso del antígeno A; 16 y 17% respectivamente lo fueron en el caso del antígeno B. Las desviaciones fueron particularmente altas en ciertos niveles de títulos: de los sueros con IFAT 1/10 positivos, sólo el 24% resultaron positivos también en la prueba de ELISA; a un nivel de títulos (IFAT) positivos de 1/20, 35.3% reaccionaron negativamente a ELISA y a un nivel de 1/40 IFAT, 29% resultaron negativos a ELISA. La causa de este número bastante alto de desviaciones, además de las dificultades conocidas en el juzgamiento de las reacciones del título bajo en la prueba IFAT, ciertamente radicó también en la baja calidad de los sueros (7 años de almacenamiento, descongelándolos varias veces), lo cual debe haber influido tanto en los resultados de IFAT como en los de ELISA. Sin embargo, debe hacerse énfasis en que la comparación en general de los resultados del total de la muestra no mostró desviaciones significativas entre ambas pruebas y que en realidad, la de ELISA pudo haber reemplazado la IFAT en las investigaciones anteriores.

Se obtuvo un resultado similar con un grupo de 309 sueros de campo del Valle del Cauca. En el primer análisis de estos sueros, 1.3% reaccionó desviadamente positivo con el antígeno A en la prueba de ELISA; 1.6% fue desviadamente positivo y 0.3% desviadamente negativo al antígeno B. La prueba IFAT en este caso se había realizado en el campo, en Colombia, donde las condiciones generales no eran las ideales. Por lo tanto, todos los sueros que reaccionaron en forma desviada se analizaron nuevamente (IFAT y ELISA), en el laboratorio de Hannover. En esta ocasión, en 4 de los sueros que habían sido negativos a IFAT y positivos a ELISA, se encontraron títulos desde 1/40 hasta 1/80 (título máximo 1/160), así que la comparación final entre ambas pruebas resultó en 0.3% de sueros desviadamente negativos en la prueba ELISA, con el antígeno A y 0.6% y 0.3% desviadamente negativos y positivos respectivamente con el antígeno B. De esto se puede concluir que los resultados de ELISA tienen un grado más alto de repetibilidad que aquellos de la prueba IFAT. En *B. bovis*, la prueba ELISA es superior a la IFAT en lo referente a la valoración cualitativa de los sueros bovinos.

Una ventaja importante de la prueba ELISA comparada con la de IFAT, es la posibilidad de analizar grandes cantidades de sueros en un día, al igual que el alto grado de objetividad de la prueba ELISA, debido al hecho que la lectura se realiza en un fotómetro para dicha prueba, el cual puede conectarse a un computador con el programa correspondiente y así puede producir resultados estandarizados. Jacobsen et al. (1982), Barlough et al. (1983, 1986) y Boese et al. (1990) han descrito las pruebas correspondientes establecidas sobre la determinación y juzgamiento de las reacciones cinéticas las cuales -por referencias incluidas- eliminan posibles errores, tales como variaciones diarias a través de las fluctuaciones de la temperatura y el pH y de este modo facilitan la comparación de resultados durante períodos prolongados y entre diferentes laboratorios.

5.4 Comparación de los antígenos A y B de ELISA

Varios autores (Callow et al., 1975, 1981), han efectuado comparaciones de resultados serológicos del IFAT con cepas de *B. bovis* de diferentes regiones geográficas. En estos casos, como también lo describió Zuerner (1983), se registró un alto grado de concordancia serológica entre los aislamientos y una buena comparabilidad de los títulos de la prueba IFAT. Montealegre et al. (1987) compararon varias cepas suramericanas en una prueba de "ELISA de doble sitio" y encontraron que las reacciones más fuertes ocurrieron en los sistemas homólogos, es decir, entre un aislamiento dado (antígeno) y el (homólogo) anticuerpo que había sido inducido por él.

TABLA 10 COMPARACION ENTRE LAS REACCIONES DE LOS ANTIGENOS A (AUSTRALIA) Y B (COLOMBIA) CON SUEROS DE B. bovis HOMOLOGOS Y HETEROLOGOS

Suero	Antígeno A	Antígeno B	r+	**r++	t
Israel	heterólogo	heterólogo	0.98	0.96	0.47
Córdoba (Colombia)	heterólogo	homólogo	0.93	0.92	3.35**
Valle (Colombia)	heterólogo	heterólogo	0.9	0.92	0.50

** significativo <0.05

+ Coeficiente de correlación Bravais

++ Valor-t para comparación de promedios de la muestra

Límite para p <0.01 = 2.63, límite para p <0.001 = 3.39

Durante la presente investigación surgieron dos preguntas:

1. Los resultados obtenidos con el antígeno colombiano -después de cuatro años de pasajes continuos en cultivo de eritrocitos- son aún comparables con el antígeno que había sido obtenido de animales recién infectados?
2. Existen diferencias en las reacciones de los antígenos con anticuerpos homólogos y heterólogos?

Como se puede observar en la Tabla 10, la reacción de los antígenos con sueros homólogos y heterólogos tuvo básicamente (cualitativamente) muy buena concordancia, por lo que es importante anotar que el antígeno B se produjo a partir de cultivo de células. Así, se comprobó que un antígeno derivado de cultivo pudo ser utilizado en la prueba de ELISA sin esperar pérdida de reactividad. Esto se destaca también por el hecho que el antígeno derivado de cultivo de células reaccionó de una forma más fuerte en el sistema homólogo (antígeno y suero de la misma área en Córdoba) que en el sistema heterólogo (antígeno de Australia y sueros de Córdoba). De este modo, la estructura antigénica responsable de la reacción de ELISA había experimentado pocos cambios durante el período de cultivo. Más aún, se comprobó que la sensibilidad de la prueba ELISA es lo suficientemente alta como para demostrar diferencias en las reacciones entre los sistemas homólogo y heterólogo antígeno/anticuerpo.

6. CONCLUSIONES

El autor no está al tanto respecto a si la prueba IFAT para *B. bovis* ha sido formalmente evaluada en cuanto a su sensibilidad, pero se presume que la de ELISA, según lo practicado en la manera descrita no es inferior a la primera en lo que respecta a la sensibilidad. Esta es realmente superior a la IFAT en

estudios epidemiológicos debido a su más alto grado de objetividad en la valoración de los resultados, en particular cuando están involucradas grandes cantidades de muestras. Se deben utilizar computadores y programas adecuados si se dispone de estos medios. Lo ideal sería conectar el fotómetro de DO directamente al sistema de computador/programa como se mencionó en el numeral 5.3. La "precisión" de la prueba ELISA es suficiente para investigaciones epidemiológicas, aunque no está indicada para diagnóstico clínico en animales individuales.

El uso de antígenos de cultivo de células es posible. La ventaja es que garantiza suministros continuos a la vez que se economiza en animales experimentales (bovinos), los cuales implican un gran costo por su precio y su mantenimiento. Cuando se aplica la técnica de suspensión de cultivo, según lo descrito por Timms y Stewart (1989), se pueden preparar grandes cantidades de antígenos en períodos de tiempo relativamente cortos.

Si se exige a diferentes trabajadores la comparación de resultados cuantitativos de la prueba ELISA, es necesario un procedimiento uniforme para el análisis y la valoración de los resultados. Las comparaciones cualitativas son posibles -como se demostró en el presente estudio- aún entre diferentes pruebas (tres examinadores y las pruebas de IFAT y ELISA).

7. RESUMEN

Se describe el ensayo inmunoenzimático (ELISA) comparando dos antígenos de **Babesia bovis** (uno de Australia y una cepa colombiana derivada de cultivo). Como resultado de ELISA, se utilizó la diferencia entre las densidades ópticas (DO) de los antígenos de **B. bovis** y la DO de un antígeno producido a partir de eritrocitos no infectados.

Los anticuerpos contra **B. bovis** se detectaron no antes de 9 días p.i. Los resultados positivos de la prueba se obtuvieron aún en el día 250 p.i.

Se observaron reacciones cruzadas con uno de los antígenos en uno de los 55 sueros de **B. divergens**, más no con los sueros de bovinos infectados con **A. marginale**, **B. bigemina** o **Theileria spp.**

La concordancia de los resultados cualitativos de las pruebas IFAT y ELISA oscilaron entre 95.8% y 99.4%. Las diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$).

No se presentaron diferencias significativas en los resultados cualitativos de ELISA entre las cepas australiana y la colombiana derivada de cultivo. Sin embargo, las reacciones de los sueros colombianos con el antígeno homólogo colombiano fueron significativamente más altas (prueba de t: 3.35) que con el antígeno heterólogo australiano.

La prueba de ELISA es adecuada para estudios sero-epidemiológicos. Se recomienda la ayuda del computador y la lectura cinética para investigaciones a grande escala realizadas en diferentes laboratorios.

VIII. REFERENCIAS

1. Abeche (1984). Distribución y niveles de infestación por garrapatas en bovinos de Córdoba, noroeste de Sucre y noreste de Antioquia. No publicado, citado por Zips, 1989
2. Aguirre, D.H., A.C. Bermúdez, A.J. Mangold y A.A. Guglielmone (1988). Infección natural con *Anaplasma marginale* en bovinos de raza Hereford, criolla y Nelore en Tucuman, Argentina. Rev. Lat.-amer. Microbiol. 30, 37-42
3. Aicher, B.M. (1984). Möglichkeiten der serologischen Differenzierung der *Babesia equi*- und *Babesia caballi*-Infektion des Pferdes mit Hilfe von KBR, IFAT und ELISA. Universitaet Muenchen, Dissertation
4. Aikawa, M., J. Rabegge, S. Uni, M. Ristic y L.H. Miller (1985). Structural alteration of the membrane of erythrocytes infected with *Babesia bovis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34, 45-49
5. Amerault, T.E. y T.O. Roby (1968). A rapid card agglutination test for bovine anaplasmosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 153, 1828-1834
6. Anon. (1974a). Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation to microtest. USDA, Public Health Service, Center for Disease Control, Atlanta, Georgia 30333
7. Anon. (1974b). Programas ganaderos 1974-1975. Ministerio de Agricultura, Bogotá, Colombia
8. Anon. (1975). Informe anual del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Sistemas de producción de ganado de carne
9. Anon. (1978) FAO: Report of the second FAO expert consultation on research on tick-borne diseases and their vectors. Roma, Italia, December 12-16, 1977
10. Anon. (1984) HIMAT - Calendario Meteorológico 1984. Ministerio de Agricultura, Bogotá, Colombia
11. Anon. (1984a) FAO: Ticks and tick-borne disease control. A practical field manual. Vol I: Tick control
12. Anon., (1984b) FAO: Ticks and tick-borne disease control. A practical field manual. Vol II: Tick-borne disease control
13. Anon. (1986). Pschyrembel, Klinisches Woerterbuch, Edicion No. 255, Walter de Gruyter, Berlin, New York
14. Anon. (1989). Instituto Agropecuario Colombiano. Salud y Producción Animal. Monitoreo en Colombia. Parte IV. Salud Animal. Proyecto Colombo/Alemán ICA-GTZ "Intensificación del control de enfermedades animales" s.p. ICA, LIVET, Montería
15. Applewhaite, L.M., T.M. Craig y G.G. Wagner (1979). Serological prevalence of bovine babesiosis in Guyana. Trop. Anim. Health Prod. 13, 13-18
16. Ayala, S.C., A. De Alessandro, R. MacKenzie y D. Angel (1973). Hemoparasite infections in 830 wild animals from the eastern Llanos of Colombia. J. Parasitol. 59 (1), 52-59

17. Babes, V. (1888) Sur l'hémoglobinurie bactérienne du boef. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 107, 692-694. Citado por Levine (1971)
18. Beier, M.S., I.K. Schwartz, J.C. Beier, P.V. Perkins, F. Onyango, J.K. Koros, G.H. Campbell, P.M. Andrysiak y D.A. Brandling-Bennet (1988). Identification of malaria species by ELISA in sporozoite and oocyst infected Anopheles from Western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39, 323-327
19. Benavides, O.E. (1985). Consideraciones sobre la epizootiología de anaplasmosis y babesiosis en los bovinos. *Rev. Inst. Colomb. Agropec.* 20, 69-75
20. Benavides, O.E. (1988). Selección de animales resistentes a enfermedades. Alternativa genética para el futuro. *Rev. Nac. Zootec.* 5, 24-29
21. Barlough, J.E., R.H. Jacobsen y D.R. Downing. (1983). Evaluation of a computer-assisted, kinetics-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Coronavirus antibodies in cats. *J. Clin. Microbiol.* 17 (2), 202-217
22. Barlough, J.E., R.H. Jacobsen, P. Sorresso, T.J. Lynch, y F.W. Scott (1986). Coronavirus antibody detection in cats by computer-assisted kinetics-based enzyme-linked immunosorbent assay (KELA): field studies. *Cornell Vet.* 76, 227-235
23. Barry, D.N., B.J. Rodwell, P. Timms y W. McGregor (1982). A microplate immunoassay for detecting and measuring antibodies to *Babesia bovis* in cattle serum. *Aust. Vet. J.* 59, 136-140
24. Barry, D.N., R.J. Parker, A.J. De Vos, P. Dunster y B.J. Rodwell (1986). A microplate ELISA for measuring antibody to *Anaplasma marginale* in cattle serum. *Aust. Vet. J.* 63 (3), 76-79
25. Beier, M.S., I.K. Schwartz, J.C. Beier, P.V. Perkins, F. Onyango, J.K. Koros, G.H. Campbell, P.M. Andrysiak y D.A. Brandling-Bennett (1988). Identification of malaria species by ELISA in sporozoite and oocyst infected Anopheles from Western Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39, 323-327
26. Berry, S., G. Ibata y S. Edwards (1981). Antibody formation to *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in calves in Bolivia. *Trop. Anim. Health Prod.* 13, 240-241
27. Bessenger, R. y J.H. Schoeneman (1983). Serological response of cattle to infection with *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in Southern Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 50, 115-117
28. Betancourt, A. (1978). Studies on the epidemiology and economic importance of *Trypanosoma vivax* Ziemann, 1905 in Colombia. Thesis (PhD), Texas A&M University
29. Betancourt, A., O. García y L. Roqueme (1984a). Distribución y niveles de infestación por garrapatas en bovinos de Córdoba. ICA, Bogotá (mimeo.)
30. Betancourt, A., O. García, L. Roqueme y M. Navarrete (1984b). Prevalencia de hemoparásitos de bovinos en Córdoba, noroeste de Sucre y noreste de Antioquia. ICA, Bogotá (mimeo.)

31. Bishop, J.P. y L.G. Adams (1973). Combination of thin and thick blood films for the detection of babesia parasitaemia. *Am. J. Vet. Res.* 34, 1213-1214
32. Blakeslee, D. y M. Baines (1976). Immunofluorescence using Dichlorotriazinylaminofluorescein (DTAF). I. Preparation and fractionation of labeled IgG. *J. of Immunol. Methods*, 13, 305-320
33. Blewett, D.A. y K.M.G. Adam (1978a). A serological survey for Babesia in cattle in Scotland. I. Assessment of the method by the results from the outlying islands. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72, 405-415
34. Blewett, D.A. y K.M.G. Adam (1978b). A serological survey for Babesia in cattle in Scotland. II. The rates of acquisition and loss of antibody to Babesia and their effects on observed levels of antibody incidence. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72, 513-522
35. Boese, R., R.H. Jacobsen, K.R. Gale, D.J. Waltisbuhl y I.G. Wright (1990). An improved ELISA for the detection of antibodies against *Babesia bovis* utilising either a native or a recombinant *B. bovis* antigen. *Parasitol. Res.* 76, 648-652
36. Bourne, A.S., R.W. Sutherst, I.D. Sutherland, G.F. Maywald y D.A. Stegeman (1988). Ecology of the cattle tick (*Boophilus microplus*) in subtropical Australia. 3. Modelling populations on different breeds of cattle. *Aust. J. Agric. Res.* 39, 309-318
37. Buschmann, H. (1985). Untersuchungen zum Auftreten von Babesieninfektionen beim Menschen in Bayern. Dissertation, Muenchen
38. Cabrera, S.W. y E. Giraldo H. (1985). Análisis preliminar hidroclimático para el departamento de Quindío. Universidad del Tolima, Facultad de Ingeniería Forestal. Disertación (M. Sc.)
39. Caille, J.-Y. (1987). Serologische Untersuchung ueber Verbreitung und saisonales Vorkommen von Blutprotozoen bei verschiedenen Nutztieren in Somalia. Berlin, Freie Universitaet, Fachbereich Veterinaermed., Diss.
40. Callow, L.L. (1976). Tick-borne livestock diseases and their vectors. 3. Australian methods of vaccination against anaplasmosis and babesiosis. *World Anim. Review*, 9-15
41. Callow, L.L. (1979). Some aspects of the epidemiology and control of bovine babesiosis in Australia. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 50, 353-356
42. Callow, L.L. y L.T. Mellors (1966). A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomized calves. *Aust. Vet. J.* 42, 464-466
43. Callow, L.L., D.W. McGregor, R.J. Parker y R.J. Dalgliesh (1974). The immunity of cattle to *Babesia argentina* after drug sterilisation of infections of varying duration. *Aust. Vet. J.* 50, 6-10
44. Callow, L.L., Q.C. Quiroga y J.P. McCosker (1976). Serological comparison of Australian and South American strains of *Babesia argentina* and *Anaplasma marginale*. *Int. J. Parasitol.* 6, 307-310

45. Callow, L.L., G.K. Kanhai y A. Vandenberghe (1981). Serological comparison of strains of **Babesia bovis** in Australia and Mozambique. *Trop. Anim. Health Prod.*, 13, 79-82
46. Callow, L.L. y R.J. Dalglish (1982). Immunity and immunopathology in babesiosis. En: S. Cohen and K.S. Warren (Eds.): *Immunology of parasitic infections*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, 2nd Ed., 475-526
47. Canning, E. U. y C.M. Winger (1987). En: E.R. Taylor and J.R. Baker (Eds.): *In vitro methods of parasite cultivation*. Academic Press Ltd. Ch. 9, 199-229
48. Castaño, N.F., H. von Christen y R. Quiroga (1986). Zonificación climática preliminar del área jurisdiccional de la CVC con fines agrícolas y forestales. *Informes CVC No. 86-6*
49. Cissoko, A. (1989). *In-Vitro-Kultur erythrozytaerer Stadien von Babesia equi und caballi sowie Gewinnung von Antigenen fuer Serotests*. Dissertation, Hannover 1989
50. Clark, B.R. y E. Engvall (1981). Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA): Theoretical and practical aspects. En: E.T. Magglo (Ed.): *Enzyme-Immunoassay*, 2nd Ed.. CRC Press Inc. Florida, Ch. 8, 167-179
51. Collins, F.H., P.M. Procell, G.H. Campbell and W.E. Collins (1988). Monoclonal antibody-based enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) for detection of **Plasmodium malariae** sporozoites in mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38, 283-289
52. Corrier, D.E. (1977). The epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in the lowland tropics of Colombia. En: E. Wells (Ed.): *Taller sobre Hemoparasitos (Anaplasmosis y Babesiosis)*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia
53. Corrier, D.E. y S. Guzmán (1977). The effect of natural exposure to Anaplasma and Babesia infections on native calves in an endemic area of Colombia. *Trop. Anim. Health Prod.* 9, 47-51
54. Corrier, D.E., J.M. Cortes, K.C. Thompson, H. Riano, E. Becerra y R. Rodríguez (1978). A field survey of bovine anaplasmosis, babesiosis and tick vector prevalence in the eastern plains of Colombia. *Trop. Anim. Health and Prod.* 10, 91-92
55. Cox, F.E.G. (1986). Spurious Babesia antigens. *Nature*, 321, 384-385
56. Curnow, J.A. (1973) Studies on antigenic changes and strain differences in **Babesia argentina** infections. *Aust. Vet. J.* 49, 279-283
57. Dallwitz, M.J., A.S. Young, D.F. Mahoney y R.W. Sutherst (1987). Comparative epidemiology of tick-borne diseases of cattle with emphasis on modelling. *Int. J. Parasitol.* 17, 629-637
58. Daly, G.D. y W.T.K. Hall (1955) A note on the susceptibility of British and some zebu-type cattle to tick fever (babesiosis). *Aust. Vet. J.* 31, 152

59. Desowitz, R. y H. Fairbairn (1955). The influence of temperature on the length of the development cycle of **Trypanosoma vivax** in **Glossina palpalis**. Ann. Trop. Med. Parasitol. 49, 161-162
60. Dikmans, G. (1950). The transmission of anaplasmosis. Am. J. Vet. Res. 11, 5-16
61. Doerr, H.W. y S. Geiger (1988). Optimierung der quantitativen Antikörpermessung mit dem ELISA unter Berücksichtigung der klinischen Plausibilität. Lab. med. 12, 142-146
62. Doherr, M.G.E. (1990) Enzymserologisches Verfahren (ELISA) unter Verwendung von Kulturantigen zum Nachweis von **Babesia bovis**-Infektionen. Dissertation, Hannover 1990
63. Donnelly, J. (1984). Experimental diagnosis of babesiosis. A review of existing methods with illustrations of recent applications. En: J. Euzeby and J. Gevrey (Eds.): Agriculture Parasitological Symposium, Lyons, 24-26 Oct. 1983. Brussels/Luxembourg; Office for Official Publications of the European Communities, 1984, 49-55
64. Drolesky, R.E., P.J. Holman, T.M. Craig, G.G. Wagner y H.H. Mollenhauer (1984). Ultrastructure of **Babesia bovis** stages as observed in **Boophilus microplus** cell cultures (short communication). Res. Vet. Sci. 34, 249-251
65. Duehnen, W. (1987). Untersuchungen zum Befall landwirtschaftlicher Nutztiere mit Zecken (Ixodidea/Ixodidae) und zur Zeckenbekämpfung im Departamento Córdoba, Kolumbien. Dissertation, Hannover
66. Duncan, R.J.S. (1988). The use of ELISA for rapid viral diagnosis: antibody detection. En: D.N. Kemeny and S.J. Challacombe (Eds.): ELISA and other Solid Phase Immunoassays. John Wiley and Sons LTD. Ch.14, 303-317
67. Dunn, L.H. (1929). Notes on some insects and other arthropods affecting man and animal in Colombia. Am. J. Trop. Med. 9, 493-508
68. Duzgun, A., C.A. Schuntner, I.G. Wright, G. Leatch y D.J. Waltisbuhl (1988). A sensitive ELISA technique for the diagnosis of **Anaplasma marginale** infections. Vet. Parasitol. 229, 1-8
69. Ebert, U. (1982). Enzymserologische (ELISA) Untersuchungen zum Nachweis zirkulierender Babesienantigens. Universität München, Dissertation
70. Erp, E.E., S.M. Gravely, S.R. Smith, M. Ristic, B.M. Osorno y C. A. Carson (1978). Growth of **Babesia bovis** in bovine erythrocyte cultures. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27 (5), 1061-1064
71. Erp, E.E., R.D. Smith, M. Ristic y B.M. Osorno (1981). Continuous in vitro cultivation of **Babesia bovis**. Am. J. Vet. Res. 41 (7), 1141-1142
72. Evans, D.E. (1978). **Boophilus microplus** ecological studies and a tick fauna synopsis related to the developing cattle industry in the Latin American and Caribbean region. North East London Polytechnic, United Kingdom/CNNA, London. Dissertation (PhD)

73. Friedhoff, K.T. (1988). Transmission of *Babesia*. In: M. Ristic (Ed.): *Babesiosis of domestic animals and man*. CRC Press, New York, 23-52
74. Friedhoff, K.T. y R.D. Smith (1981). Transmission of *Babesia* by ticks. En: M. Ristic and J.P. Kreier (Eds.): *Babesiosis*. Academic Press, New York, 267-321
75. Ganse-Dumrath, D. (1986). Epidemiologie der *Babesia divergens*-Infektion bei Rindern in Norddeutschland. Dissertation, Hannover
76. Garnham, P.C.C. (1970). The role of the spleen in protozoal infections with special reference to splenectomy. *Acta Tropica* 27, 1-13
77. Goetz, F. (1982). Untersuchungen ueber die Brauchbarkeit von ELISA, IFAT, IHA und KBR zum Nachweis von *Babesia equi* Infektionen. Universitaet Muenchen, Dissertation
78. Goff, W.L. y C.E. Yunker (1988). Effects of pH, buffers and medium storage on the growth og *Babesia bovis* in vitro. *Int. J. Parasitol.* 18, 775-778
79. Goldmann, M y A.S. Rosenberg (1974). Immunofluorescence studies of the small *Babesia* species of cattle from different geographical areas. *Res. Vet. Sci.* 16, 351-354
80. Gomes, A., M.R. Honer, M.A.M. Schenk y J.B.E. Curvo (1989). Populations of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on purebred Nellore, Ibage and Nellore x European crossbreds in the Brazilian Savanna. *Trop. Anm. Health Prod.* 21, 20-24
81. González, E.F., D.E. Corrier, R.A. Todorovic y G. López (1978a). Epidemiología e impacto económico de la anaplasmosis en el Valle geográfico del río Cauca. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 1, 201-214
82. González, E.F., R.F. Long y R.A. Todorovic (1978b). Comparisons of the complement fixation, indirect fluorescent antibody, and card agglutination tests for the diagnosis of bovine anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.* 39, 1538- 1541
83. González, E.F., R.A. Todorovic, G. López y O.A. García (1979). Atenuación de una cepa de *Babesia argentina* (*Babesia bovis*) de origen colombiano. *Rev. ICA, Bogotá (Colombia)* 14 (1), 33-39
84. González, E.G. y R.A. Todorovic (1977). Evaluation of premunition for the control of anaplasmosis and babesiosis on commercial farms in the Cauca valley, Colombia. *Proceedings, Workshop on haemoparasites, March 17-22, 1975. CIAT, Cali, Colombia*, 147-151
85. Goodger, B.V., I.G. Wright y D.J. Waltisbuhl (1983). The lysate from bovine erythrocytes infected with *Babesia bovis*. *Z. Parasitenkd.* 69, 473-482
86. Goodger, B.V., I.G. Wright y D.J. Waltisbuhl (1985). *Babesia bovis*: the effect of acute inflammation and Isoantibody production in the detection of babesial antigens. *Experientia* 41, 1577-1579

87. Gothe, N. (1974). Anaplasmosen. Reprint from " Handlexikon der tieraerztlichen Praxis", I-V, 45q-45r
88. Gottstein, B., P. Deplazes, P. Arnoldt, D. Mehlitz, I. Reiter y J. Eckert (1988). Immundiagnose der Leishmaniose des Hundes mit ELISA und Mini-Western-Blot. Schweiz. Arch. Tierheilk. 130, 249-262
89. Griffiths, I.B., M.I. Gallego y L.C. Villamil (1982). Factores de Infertilidad y pérdidas económicas en ganado de leche en Colombia. ICA-ANALAC, Bogotá
90. Guglielmo, A. (1990) La inmunización contra anaplasmosis y babesiosis. Experiencias en la Argentina. Memorias, Seminario Internacional sobre: Diagnóstico, Epidemiología y Control de Enfermedades Hemoparasitarias. ICA/GTZ/IICA/Universidad de La Salle, Palmira, Noviembre 1989
91. Hadani, A., A.A. Guglielmo, L.G. De Rios, A. Bermúdez y A. Mangold (1982). Use of cerebellar brain smears in the diagnosis of babesiosis (*Babesia bovis*) in cattle. Trop. Anim. Health Prod. 14, 242-246
92. Hadani, A., L. De Haan, L.G. De Rios, A.A. Guglielmo y A. Mangold (1983). The detection of babesiosis in bovines by the indirect fluorescent antibody test compared to the prevalence of *B. bovis* in cerebral smears. Brit. Vet. J. 139, 209-211
93. Hall, W.T.K. (1960). The immunity of calves to *Babesia argentina* infections. Aust. Vet. J. 36, 361-366
94. Hall, W.T.K. (1963). The immunity of calves to tick-transmitted *Babesia argentina* infection. Aust. Vet. J. 39, 386-389
95. Hartung, J. y B. Elpelt (1986). Multivariate Statistik. R. Oldenbourg Verlag, Muenchen Wien
96. Hassane, M.H. (1983). Vergleichende Untersuchungen von Seren und Trockenblut (auf Filterpapier) experimentell mit Babesien infizierter Rinder und Ponies im ELISA und Stick-ELISA. Universitaet Muenchen, Dissertation
97. Hawkins, J.A., J.N. Love y R.J. Hidalgo (1982). Mechanical transmission of anaplasmosis by tabanids (Diptera: Tabanidae). Am. J. Vet. Res. 43, 732-734
98. Hugh-Jones, M.E., K. Scotland, K. Applegate y F.M. Alexander (1988). Seroprevalence of anaplasmosis and babesiosis in livestock on St. Lucia. Trop. Anim. Health Prod. 20, 137-139
99. Igarashi, I., M. Aikawa and y J.P. Kreier (1988). Host cell-parasite interactions in Babesiosis. En: M. Ristic (Ed.): Babesiosis of domestic animals and man. CRC Press, Inc., Florida; Chapter 3, 54-69

100. Jacobson, R.H., D.R. Downing y J.T. Lynch (1982). Computer-assisted immunoassays and simplified immunofluorescence assays: applications for the diagnostic laboratory and the veterinarian's office. *J. Am. Vet. Res. Assoc.* 181 (10), 1166-1168
101. James, M.A., S. Montenegro-James, C. Fajfar-Whetstone, F. Montealegre, J. Erickson y M. Ristic (1987). Antigenic relationship between *Plasmodium falciparum* and *Babesia bovis*: Reactivity with antibodies to culture-derived soluble exoantigens. *J. Protozool.* 34, 328-332
102. James, M.A. (1988). Immunology of Babesiosis. En: M. Ristic. *Babesiosis in domestic animals and man.* CRC Press, New York, 119-131
103. James, M.A., A. Coronado, W. López, R. Meléndez y M. Ristic (1985). Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. *Trop. Anim. Health Prod.* 17, 9-18
104. Jidaisho, M.A. et. al. (1986). Evaluation of ELISA for serodiagnosis of *Babesia ovata* infection. *J. Jap. Vet. Med. Assoc.* 39 (6), 385-389
105. Johnston, L.A.Y. (1967). Epidemiology of bovine babesiosis in Northern Queensland. *Aust. Vet. J.* 43, 427-432
106. Jongejan, F.C.J., P.G. Ooijen, D. Zivkovic y A.A.H.M. Ter Huurne (1988a). Quantitative correlation of parasitological and serological techniques for the diagnosis of *Trypanosoma congolense* infection in cattle. *Vet. Quarterly* 10, 42-67
107. Jongejan, F., B.D. Perry, P.D.S. Moorhouse, F.L. Musisi y G.R. Pegram (1988b). Epidemiology of bovine babesiosis and anaplasmosis in Zambia. *Trop. Anim. Health Prod.* 20, 234-242
108. Joyner, L.P. y J. Donnelly (1979). The epidemiology of *Babesia* infections (review). *Adv. Parasitol.* 17, 114-170
109. Kahl, L.P., R.F. Anders, L.L. Callow, B.J. Rodwell y G.F. Mitchell (1982). Development of a solid-phase radioimmunoassay for antibody to antigens of *Babesia bovis* infected bovine erythrocytes. *Int. J. Parasitol.* 12 (2,3), 103-109
110. Kellermann, G., K.R. Tsang y I. Kakoma (1988). Advances in the in vitro culture of *Babesia* species. En: M. Kreier (Ed.): *Babesiosis of Domestic Animals and Man.* CRC Press Inc. Florida Ch.4, 72-79
111. Kemeny, D.M. y S. Chantler (1988). An introduction to ELISA. En: D.M. Kemeny and S.J. Challacombe (Eds.): *ELISA and other Solid Phase Immunoassays.* John Wiley & Sons Ltd. Ch.1, 1-29
112. Kleinbaum, D.G., L.L. Kupper y L.E. Chambless (1982). Logistic regression analysis of epidemiologic data: theory and practice. *Commun. Statist.-Theor. Meth.* 11, 485-547
113. Kuttler, K.L. (1980). Pharmacotherapeutics of drugs used in treatments of anaplasmosis and babesiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176, 1103-1108

114. Kuttler, L.K. (1988a). Chemotherapy of babesiosis. En: M.Ristic (Ed.): Babesiosis of domestic animals and man. CRC Press, Inc.; Chapter 14, 228-243
115. Kuttler, L.K. (1988b). World wide impact of babesiosis. En: M.Ristic (Ed.): Babesiosis in domestic animals and man. CRC Press, Florida; Chapter 1, 2-22
116. Kuttler, K.L., L.G. Adams y H. Zaraza (1969). An epidemiologic and geographic survey of **Anaplasma marginale** and **Trypanosoma Theileri** in Colombia. J. Am. Vet. Med. Ass. 154, 1398-1399
117. Kuttler, K.L., L.G. Adams y H. Zaraza (1970). Estudio epizootológico de **Anaplasma marginale** y del **Trypanosoma theileri** en Colombia. Rev. ICA, Bogota, 5, 127-147
118. Kuttler, K.L., L.G. Adams y R.A. Todorovic (1977). Comparisons of the complement fixation and indirect fluorescent antibody reactions in the detection of bovine babesiosis. Am. J. Vet. Res. 38, 153-156
119. Lang, F.M., G.R. Ferrier y T.J. Nicholls (1987). Detection of antibodies to **Eperythrozoon ovis** by the use of enzyme-linked immunosorbent assay. Res. Vet. Sci. 43, 249-252
120. Levine, N.D. (1971). Taxonomy of the piroplasms. Trans. Amer. Micros. Soc. 90, 2-33
121. Levine, N.D. (1981). A newly revised classification of the protozoa. J. Protozool. 27, 37-58
122. Levy M.G. y M. Ristic (1980). **Babesia bovis**: continuous in vitro cultivation in microaerophilous stationary phase culture. Science 207, 1218-1220
123. Levy, M.G., G. Clabaugh y M. Ristic (1982). Age resistance in bovine babesiosis: role of blood factors in resistance to **Babesia bovis**. Infection and Immunity 37, 1127-1131
124. Levy, M.G. y M. Ristic (1983). Cultivation and in-vitro studies of Babesia. En: J.B. Jensen (Ed.): In-vitro cultivation of protozoan parasites. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 221-241
125. Liddell, K.G., A.W.L. Joss y H. Williams (1982). Serological response of the Mongolian Gerbil to **Babesia divergens** (human strain) infection. Ann. Trop. Med. Parasitol. 76 (5), 527-538
126. Lignieres, J. (1903). La piroplasmose bovine. Nouvelles recherches et observations sur la multiplicité des parasites, leur évolution, la transmission naturelle de la maladie et la vaccination. Arch. Parasitenk. 7, 398-407. Citado por Levine (1971)
127. López, S., F.J. Fajardo y G.J. Canto A. (1983). Prevalencia de anticuerpos contra anaplasmosis y babesiosis e incidencia de infección diaria de babesiosis en bovinos del municipio de Playa Vicente, Veracruz. Tec. Pec. Mex. 44, 82-85
128. Mahoney, D.F. (1962). The epidemiology of babesiosis in cattle. Aust. J. Sci. 310-313

129. Mahoney, D.F. (1972). Immune response to hemoprotozoa. II. **Babesia spp.** En: E.J.L. Soulsby (Ed.): Immunity to animal parasites. Academic Press, New York, London. 301-341
130. Mahoney, D.F. (1974). The application of epizootiological principles in the control of babesiosis in cattle. *Bull. Off. Int. Epiz.* 81, 123-138
131. Mahoney, D.F. (1977). **Babesia** of domestic animals. En: J.P. Kreier (Ed.): Parasitic protozoa. Academic Press, New York, London. Vol I, 1-52
132. Mahoney, D.F. y J.R. Saal (1961). Bovine babesiosis: Thick blood films for the detection of parasitaemia. *Aust. Vet. J.* 44-47
133. Mahoney, D.F. y D.R. Ross (1972). Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust. Vet. J.* 48, 292-298
134. Mahoney, D.F. y J.G. Wright (1976). Immunization of cattle with a killed antigen against infection with a heterologous strain. *Vet. Parasitol.* 2, 273-282
135. Mahoney, D.F., J.D. Kerr, B.V. Goodger y I.G. Wright (1979). The immune response of cattle (**Bos taurus**) to **Babesia bovis** (syn. **B. argentina**): Studies on the nature and specificity of protection. *Int. J. Parasitol.* 9, 297-306
136. Mahoney, D.F., I.G. Wright, B.V. Goodger, G.B. Mirre, R.W. Sutherst y K.B.W. Utech (1981). The transmission of **Babesia bovis** in herds of European and Zebu x European cattle infested with the tick **Boophilus microplus**. *Aust. Vet. J.* 57, 461-468
137. Margolis, L., G.W. Esch, J.C. Homes, A.M. Kuris y G.A. Schad (1982). The use of ecological terms in parasitology (report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists). *J. Parasitol.* 68 (1), 131-133
138. Martin, S.W. (1977). The evaluation of tests. *Can. J. Comp. Med.* 41, 19-25
139. McCosker, J.P. (1981). The global importance of babesiosis. En: M. Ristic and J.P. Kreier (Eds.): **Babesiosis**. Academic Press, New York, London. pp. 1-24
140. McLaughlin, G.L., T.D. Edlind y G.M. Ihler (1986). Detection of **Babesia bovis** using DNA hybridization. *J. Protozool.* 33, 125-128
141. M'Fadyean, J. y S. Stockman (1911). A new species of piroplasm found in the blood of British cattle. *J. comp. Path.* 24, 340-354
142. Mehlhorn, H., E. Schein y W.P. Voigt (1980). Light and electron microscopic study on development stages of **Babesia canis** within the gut of the tick **Dermacenter reticulatus**. *J. Parasitol.* 66, 220-227
143. Miller, D.K., O. Diall, T.M. Craig y G.G. Wagner (1984). Serological prevalence of bovine babesiosis in Mali. *Trop. Anim. Health Prod.* 16, 71-77

144. Mohammad K. y A. Esen (1989). A blocking agent and a blocking step are not needed in ELISA, immunostaining dot-blot and western blots. *Journal of Immunological Methods* 117, 141-145
145. Montealegre, F., S. Montenegro-James, I. Kakoma y M. Ristic (1987). Detection of culture-derived **Babesia bovis** exoantigen using a two-site enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 25, 1648-1652
146. Montenegro-James, S., M.A. James y M. Ristic (1983). Localization of culture-derived soluble **Babesia bovis** antigens. *Vet. Parasitology*, 13, 311-316
147. Montenegro-James, S. y M. Ristic (1985). Heterologous strain immunity in bovine babesiosis using a culture-derived soluble **Babesia bovis** immunogen. *Vet. Parasitology* 18, 323-371
148. Mueller, I. (1984). Seroepidemiologie der bovinen Babesien- und Anaplasmeninfektionen in Kolumbien: II. Verbesserung der Antigenherstellung fuer indirekte Immunofluoreszenz mit **Babesia bovis**. Dissertation, Hannover
149. Mueller, I. y A. Cissoko (1988). Serologische Untersuchungen mit Babesien-Antigenen aus in-vitro Kulturen. En: *Proced. de la 13a Session de la Deutsche Gesellschaft fuer Parasitologie e.V.*, Neuchatel, 1988. Ponencia Nr. 17 (Resumen)
150. Muraleedharan, K., K. Seyed Ziauddin, K. Gopaldaswamy, T. Muraleedhaar y D.J. Seshadri (1984). Some observations on clinical cases of **Babesia bovis** in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Indian Vet. J.* 61, 76-79
151. Nakamura, Y., S. Shimizu, T. Minami y S. Ito (1988). Enzyme-linked immunosorbent assay using solubilised antigen for detection of antibodies to *Anaplasma marginale*. *Trop. Anim. Health Prod.* 20, 259-266
152. Navarrete, M. (1990). Impacto en la producción y en la economía de las enfermedades hemoparasitarias. Experiencias de monitoreo en Colombia. *Memorias, Seminario Internacional sobre: Diagnóstico, Epidemiología y Control de Enfermedades Hemoparasitarias.* ICA/GTZ/IICA/Universidad de la Salle, Palmira, Noviembre 1989.
153. Nierlich, S. (1990). Ein ELISA zur Serodiagnose von **Babesia bovis**-Infektionen beim Schaf. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation
154. Norval, R.A.I., B.H. Fivaz, J.A. Lawrence y Thanai Dallecourt (1983). Epidemiology of tick-borne diseases in Zimbabwe. I. Babesiosis. *Trop. Anim. Health Prod.* 15, 87-94
155. Nowak, F. (1990). Epidemiologische Untersuchungen in Rinderbeständen im mittleren Sinutal (Córdoba, Kolumbien). Dissertation, Hannover
156. O'Donoghue, P.J., K.T. Friedhoff, O.G. Vizcaino y H. Weyreter (1985). The detection of IgM and IgG antibodies against **Babesia bigemina** in bovine sera using semi-defined antibodies in enzyme immunoassay. *Vet. Parasit.* 18, 1-12

157. O'Kelly, J.C. y W.G. Spiers (1976). Resistance to **Boophilus microplus** (Canestrini) in generally different types of calves in early live. *J. Parasitol.* 62, 312-317
158. Osterhoff, D.R. y A.D. De Vos (1977). Isoimmune blood group antibodies in cattle after the use of a blood vaccine. *J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.* 48, 137-139
159. Otte, E., M. Navarrete, A. Betancourt, E. Trheebilcock y J. Orjuela (1985). Resultados de una encuesta realizada sobre producción y salud animal en Córdoba, Montería, Colombia. 1982/1983/1984. Proyecto Colombo/Alemania para la Intensificación del Control de Enfermedades Animales, ICA/GTZ. (Vea también Informe Técnico No. 4)
160. Otte, M.J., C.A. González y J.Y. Abuabara (1985). The effect of hemoparasite infections on weight gain in calves. *Proceedings, 4th Intern. Sympos. Vet. Epidem. Econom., Singapur*
161. Otte, M.J., Y. Abuabara y F. Nowak (1988). Patrón epidemiológico y manifestaciones de las infecciones naturales con *A. marginale* en una zona endémica. 16th. Congr. Nac. Med. Vet. Zoot., Paipa, Colombia, 1988
162. Otte, M.J. (1986). Comunicación personal, citado por Nowak, 1990
163. Otte, M.J. (1989). Epidemiology of *T. vivax* and its effects on cattle productivity in the northern tropical zone of Colombia. University of Reading, Dissertation (PhD). (Ver también Informe Técnico No. 8, Bogotá, 1991)
164. Otte, M.J., Y. Abuabara P., C.A. Gonzales y J.D.P. Rangel (1987). La anaplasmosis bovina en el Departamento de Córdoba. Epidemiología, efectos de la infección en terneros y evaluación de las pérdidas económicas. Ponencia, Curso Internacional sobre Manejo de la Salud y Productividad en Ganadería de Doble Propósito del 21 de Septiembre al 3 de Octubre 1987, Montería
165. Ouhelly, H. y E. Schein (1988). Effect of temperature on transovarial transmission of **Babesia bigemina** (Smith and Kilborne, 1893) in **Boophilus annulatus** (Say, 1821). *Vet. Parasitol.* 26, 229-235
166. Page, W.A. (1972). Feeding behaviour and trypanosomatid infections of some tabanids and Culicidae in Colombia. *J. Entomol., Series A*, 47, 1-13
167. Palmer, D.A., G.M. Buening y C.A. Carson (1982). Cryopreservation of **Babesia bovis** for in-vitro cultivation. *Parasitology* 84, 567-572
168. Patarroyo, J.H., O. Villa y H. Diazgranados (1978). Epidemiology of cattle anaplasmosis in Colombia. I. Prevalence and distribution of agglutinating antibodies. *Trop. Anim. Health Prod.* 10, 171-174
169. Payne, R.C. y J.M. Scott (1982). Anaplasmosis and babesiosis in El Salvador. *Trop. Anim. Health Prod.* 14, 75-80

170. Peña, N.E., L.C. Villamil, D. Parra y C. Lobo (1980). Las enfermedades de los animales en Colombia. Situación por regiones naturales. Instituto Colombiano Agropecuario. Documento de Trabajo No. 20. Bogotá, Colombia. 270 pp
171. Pipano, E., A. Marcovics y Y. Kriegel (1985). Oxytetracycline induced resistance to *Babesia bovis* infection in splenectomized calves. *Trop. Anim. Health Prod.* 17, 153-154
172. Pipano, E., A. Marcovics, Y. Kriegel, M. Frank y L. Fish (1987). Use of long-acting oxytetracycline in the immunization of cattle against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Res. Vet. Sci.* 43, 64-66 n
173. Pipano, E., M. Samish, Y. Kriegel, A. Marcovics y V. Shkap (1988). Oxytetracycline as an antibabesial drug in splenectomized calves. *Isr. J. Vet. Med.* 44, 124-127
174. Rauch, J. (1981). Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern und von zirkulierenden Antigenen an experimentell mit *Babesia divergens* infizierten und an babesioseverdächtigen Rindern mit dem ELISA. Universität München, Dissertation
175. Reiter, I., A. Buettner y A. Seitz (1987). *Trypanosoma theileri* Laveran, 1902, in naturally and experimentally infected cattle: parasite isolation, serological and cellular reactions and Berenil sensitivity. *J. Vet. Med. B.* 34, 380-390
176. Reiter, I. y G. Welland (1989). Recently developed methods for the detection of babesial infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83, 21-23
77. Ristic, M. (1960). Anaplasmosis. *Adv. Vet. Sci.* 6, 11-192
178. Ristic, M. (1968). Anaplasmosis. En: D. Weinmann and M. Ristic (Eds.): *Infectious blood diseases of man and animals. Diseases caused by protista. Vol.2. The pathogens, the infection and the consequences.* Academic Press, New York, London, 504-506
179. Ristic, M. (1981). 35. Babesiosis. En: M. Ristic and I. McIntyre (Eds.): *Diseases of cattle in the tropics.* Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, 443-468
180. Ristic, M. y C.A. Carson (1977). Methods of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on the use of the attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. *Proced., Taller sobre Haemoparasitos, 1975, CIAT, Cali,* 105-132
181. Ristic, M. y M.G. Levy (1981). A new area of Research toward solution of bovine babesiosis. En: M. Ristic and J.P. Kreier (Eds.): *Babesiosis.* Academic Press, New York, London, 509-544
182. Ristic, M. y S. Montenegro-James (1988). Immunization against *Babesia*. En: M. Ristic (Ed.): *Babesiosis of domestic animals and man.* CRC Press Inc., Florida Ch. 10, 164-189
183. Rivas, A., O.N. Rodríguez y L. Espaine (1977). Evaluación epizootiológica de los métodos serodiagnósticos de la babesiosis y anaplasmosis bovinas. 1. El diagnóstico serológico de la babesiosis. *Rev. Cub. Cienc. Vet.* 8, 1-11

184. Rogers, R.J. (1971a). Observations on the pathology of **Babesia argentina** infections in cattle. *Aust. Vet. J.* 47, 242-247
185. Rogers, R.J. (1971b). An evaluation of tick fever outbreaks in Northern Queensland in recent years. *Aust. Vet. J.* 47, 415-417
186. Rogers, R.J y I.A. Shiels (1979). Epidemiology and control of anaplasmosis in Australia. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 50, 363-366
187. Romatowski, J. (1989). Interpreting feline leukemia test results. *J.A.V.M.A.* 195 (7), 928-930
188. Rose, J.E., T.E. Amerault y T.O. Roby (1974). Roles of conglutinin, complement, and antibody size in the Card Agglutination Test for bovine anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.* 35, 1147-1151
189. Ross, J.P.J. y K.-F. Loehr (1968). Serologic diagnosis of **Babesia bigemina** infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. *Res. Vet. Sci.* 9, 557-562
190. Ross, J.P.J. y K.-F. Loehr (1970). Uebertragung und Verwelldauer von kolostral erworbenen **Babesia bigemina** - und **Anaplasma marginale**-Antikoerpern. *Z. Tropenmed. Parasitol.* 21, 401-411
191. Ross, D.R. y D.F. Mahoney (1974). Bovine babesiasis: Computer simulation of **Babesia argentina** parasite rates in **Bos taurus** cattle. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 68, 385-392
192. Rudzinska, M.A., A. Spielman, R.F. Riek, S.J. Lewengrub y J. Plesman (1979). Intraerythrocytic "gametocytes" of **Babesia microti** and their maturation in ticks. *Can. J. Zool.* 57, 424-434
193. Rundfeldt, H. (1976). *Biometrie. Einfuehrungskurs an der Tieraerztlichen Hochschule, Hannover.* Skript, Institut fuer Statistik und Biometrie
194. Salcedo, P., J. Hernan, J.L. Dos Santos, M.F. Barbosa y J.E. De Faria (1987). Epidemiology of cattle babesiosis in the State of Minas Gerais, Brazil: I. Prevalence of fluorescent antibodies in the "Zona da Mata". *Arq. Braz. Med. Vet. Zoot.* 39, 423-430
195. Schnitzer, B., T. Sodeman, M.L. Mead y P.G. Contagos (1972). Pitting functions of the spleen in malaria: Ultrastructural observations. *Science* 177, 175-177
196. Sergent, E.A., A. Donatien, L. Parrot, F. Lestoquard y H. Rougebief (1924). Etudes expérimentales sur les piroplasmoses bovines d'Algérie. *Ann. Inst. Pasteur* 38, 273-343. Quoted by Levine (1971)
197. Sergent, E.A., A. Donatien, L. Parrot, F. Lestoquard y F. Plantureux (1926). Les piroplasmoses bovines dues aux Babesiella. Etude d'ensemble avec description d'une espece nouvelle: *B. major*, originaire de France. *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie* 4, 318-339. Citado por Levine (1971)
198. Sergent, E.A., A. Donatien, L. Parrot y F. Lestoquard (1945). Etudes sur les piroplasmoses bovines. *Inst. Pasteur d'Algérie, Alger.* Citado de D. Zwart y D.W. Brocklesby (1979): Babesiosis: Non-specific resistance, immunological factors and pathogenesis. *Adv. Parasitol.* 17, 50-113

199. Shimuzu, S., K. Suzuki, K. Nakamura, K. Kadota, K. Fujisaki, S. Ito y T. Minami (1988). Isolation of *Theileria sergenti* piroplasms from infected erythrocytes and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of *T. sergenti*-infections. *Res. Vet. Sci.* 45, 206-212
200. Smith, R.D. (1990). Diagnostic Test. Comunicación personal, sin publicar
201. Smith, R.D. (1983). *Babesia bovis*: Computer simulation of the relationship between the tick vector, parasite, bovine host. *Exp. Parasitol.* 56, 27-40
202. Smith, R.D. (1984). Epidemiology of Babesiosis. En: M. Ristic, P. Ambroise-Thomas and J.P. Kreier (Eds.): *Malaria and Babesiosis*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht/Boston/Lancaster, 209-218; 226
203. Smith, T. y F.L. Kilburn (1893). Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or southern cattle fever. U.S. Department Agric., Bur. Anim. Indu. Bull. No. 1, 301. Quoted from Levine (1971)
204. Spaeth, E.J.A. (1986). Un estudio epidemiológico de babesiosis y anaplasmosis bovina en el valle de Lerma, Provincia de Salta. *Rev. Med. Vet. (Bs.As.)* 67, 274-281
205. Spaeth, E., A.J. Mangold y A.A. Guglielmo (1988). Estimation of the potential demand of a vaccine for bovine babesiosis and anaplasmosis in Argentina. *FAO, Animal Health Service, Inf. circ.* 1988
206. Srivastava, I.K., B. Takacs, P. Caspers, U. Certa, I.A. McGregor, J. Scaife y L.H. Perrin (1989). Recombinant polypeptides for serology of malaria. *Transact. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83, 317-321
207. Starcovici, C. (1893). Bemerkungen ueber den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krankheiten, die seuchenhafte Hamoglobinurie des Rindes (Babes), das Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). *Zentralbl. Bakt. I. Orig.* 14, 1-8. Citado por Levine (1971)
208. Steuber, S., J.Y. Caille y F. Hoerchner (1987). Serodiagnosis of African trypanosomiasis using a chemoluminescent enzyme immunoassay. *Acta Tropica* 44, 459-460
209. Sutherst, R.W. (1986). Australian-African collaboration on tick ecology and epidemiology of tick-borne diseases. En: R.W. Sutherst (Ed.): *Ticks and tick-borne diseases. Proceedings of an international workshop on the ecology of ticks and epidemiology of tick-borne diseases.* 12-15
210. Sutherst, R.W. y G.F. Maywald (1985). A computerized system for matching climates in ecology. *Agric. Ecosystems Environ.* 13, 281-299
211. Teclaw, R.F., S. Romo, Z. García, M. Castañeda y G.G. Wagner (1985a). A seroepidemiologic study of bovine babesiosis in the Mexican states of Nuevo Leon, Tamaulipas and Coahuila. *Prev. Vet. Med.* 3, 403-415

212. Teclaw, R.F., Z. Garcia, S. Romo y G.G. Wagner (1985b). Incidence of babesiosis and anaplasmosis infections in cattle sampled monthly in the Mexican states of Nuevo Leon and San Luis Potosi. *Prev. Vet. Med.* 3, 427-435
213. Tenter, A. M. (1987). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test for the detection of IgG antibodies to *Sarcocystis muris*. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 267, 259-271
214. Tenter, A.M. (1988). Comparison of Dot-ELISA, ELISA and IFAT for the detection of IgG antibodies to *Sarcocystis muris* in experimentally infected and immunized mice. *Vet. Parasitol.* 229, 89-104
215. Tijssen, P. (1985). *Practice and theory of enzyme immunoassays*. Elsevier Science Publishers B.V.
216. Timms, P. (1989). Development of babesial vaccines. *Transact. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83, 73-79
217. Timms, P., R. Dalglish, J.D.N. Barry, C.K. Dimmock y B.J. Rodwell (1983). *Babesia bovis*: Comparison of culture-derived parasites, non-living antigen and conventional vaccine in the protection of cattle against heterologous challenge. *Aust. Vet. J.* 60, 75-77
218. Timms, P. y D.N. Barry (1988). Failure of recombinant *Babesia bovis* antigen to protect cattle against heterologous strain challenge. *Res. Vet. Sci.* 45, 267-269
219. Timms, P. y N.P. Stewart (1989). Growth of *Babesia bovis* parasites in stationary and suspension culture and their use in experimental vaccination of cattle. *Res. Vet. Sci.* 47, 309-314
220. Todorovic, R.A. (1976). Bovine babesiosis in Colombia. *Vet. Parasitology*, 2, 97-109
221. Todorovic, R.A., E.F. Gonzalez y L.G. Adams (1973). Bovine babesiosis: sterile immunity to *Babesia bigemina* and *Babesia argentina* infections. *Trop. Anim. Health Prod.* 5, 234-240
222. Todorovic, R.A. y E.F. González (1975). Inmunización contra babesiosis bovina con vacunas a base de parásitos vivos. *Rev. ICA-Bogotá (Colombia)* X (1), 243-254
223. Todorovic, R.A. y C.H. Tellez (1975). The premunition of adult cattle against babesiosis and anaplasmosis in Colombia, S.A.. *Trop. Anim. Health Prod.* 7, 125-131
224. Todorovic, R.A. y R.F. Long (1976). Comparison of indirect fluorescent antibody (IFA) with complement fixation (CF) tests for diagnosis of *Babesia spp.* infections in Colombian cattle. *Tropenmed. Parasitol.* 27, 169-181
225. Todorovic, R.A., E.F. González y O. García (1979). Immunization against Anaplasmosis and Babesiosis. Part III. Evaluation of immunization under field conditions in the Cauca river valley. *Tropenmed. Parasit.* 27, 169-181

226. Todorovic, R.A. y C.A. Carson (1981). Methods for measuring the immunological response to *Babesia*. En: M. Ristic and J.P. Kreier (Eds.): Babesiosis. Academic Press, New York, London. 381-410
227. Trees, A.J. (1974). The application of acridin orange staining to quantitate low levels of *Babesia divergens* parasitaemias. Transact. Roy.Soc. Trop. Med. Hyg. 68, 277
228. Tropberger, G. (1987). Seroepidemiologie der Babesien- und Anaplasmeninfektionen in Kolumbien: III. Verlaufsuntersuchungen an Jungtieren einliger selektierter Bestaende. Dissertation, Hannover.
229. Trueman, K.F. y G.W. Blight (1978). The effect of age on resistance of cattle to *Babesia bovis*. Aust. Vet. J. 54, 301-305
230. Tyler, J.W. y J.S. Cullor (1989). Titers, tests and truisms: Rational interpretation of diagnostic serologic testing. J.A.V.M.A. 194 (11), 1550-1558
231. Ullmann, B. (1983). Untersuchungen zum Vorkommen und zur serologischen Differenzierung von Babesien beim Rind im westlichen Allgaeu. Dissertation, Muenchen
232. Utech, K.B.W., y R.H. Wharton (1982). Breeding for resistance to *Boophilus microplus* in Australian Illawara Shorthorn and Brahman x Australian Illawara Shorthorn cattle. Aust. Vet. J. 58, 41-46
233. Vizcaíno, O. (1979). Estudio de prevalencia de hemoparásitos bovinos en tres regiones naturales de Colombia. No publicado; citado por Zuerner, 1983
234. Vizcaíno Gerds, O. y A. Betancourt (1983). *Anaplasma marginale*: Evaluación de la dosis mínima infectiva. Rev. ICA-Bogotá (Colombia) XVIII (4), 329-334
235. Waltisbuhl, D.J., B.V. Goodger, I.G. Wright, M.A. Commins y F.D. Mahoney (1987). An enzyme linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. Parasitol. Res. 73, 126-131
236. Weber, G. y K.T. Friedhoff (1977). Preliminary observations on the ultrastructure of supposed sexual stages of *Babesia bigemina* (Piroplasma). Z. Parasitenk. 53, 83-92
237. Weiland, G. (1980). Serologischer Nachweis (IHA, IFAT, ELISA) von Antikörpern und exoantigenen in experimentell mit *Babesia divergens* infizierten Tieren. Prakt. Tierarzt, 61, 112-116
238. Weiland, G. (1986). Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of CFT, IIF and ELISA. Vet. Parasitol. 20, 43-48
239. Weiland, G., L. Relf, M. Schmidt y J. Boch (1980a). Serologische Untersuchungen zum Nachweis der *Babesia divergens*-Infection des Rindes. Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr. 93 (14), 261-264

240. Welland, G., L. Relf y J. Rauch (1980b). Babesiose der Rinder im Voralpengebiet. En: *Memorias del Symposium "Parasitosen der Wiederkaeuer"*, 14 y 15/11 1980, Rothenburg ob der Tauber, ponencias No. 89-94
241. Welland, G. y I. Reiter (1988). Methods for the measurement of the serological response to *Babesia*. En: M. Ristic (Ed.): *Babesiosis of domestic animals and man*. CRC Press, New York, 143-162
242. Wells, E.A. (1969). *Bovine Trypanosomiasis with a special reference to T. Theileri*. Edinburgh, Faculty of Vet. Med., PhD Dissertation
243. Wharton, R.H., y W.J. Roulston (1975). Acaricide resistance in *Boophilus microplus* in Australia. Addendum: Acaricide resistance en Latin America. En: *Memorias del Taller sobre la Serología y el Control de Parásitos Externos de Bovinos en América Latina*, Cali, 1975
244. Wiesenhuetter, E. (1975). Research into the relative importance of *Tabanidae* (Diptera) in mechanical disease transmission. 3. The epidemiology of anaplasmosis in a Dar-es-Salaam dairy farm.. *Trop. Anim. Health Prod.* 7, 15-22
245. Wilson, B.H. y R.B. Meyer (1966). Transmission studies of bovine anaplasmosis with the horse flies *Tabanus fuscicostatus* and *Tabanus nigrovittatus*. *Am. J. Vet. Res.* 27 (16), 367-369
246. Winger, C. y E.U. Canning (1985). Monoclonal antibodies to merozoites of *Babesia divergens*. *Memorias, VII Int. Congress of Protozoology, Nairobi, Kenya, 22 a 29/6/1985*. Ponencia No. 173
247. Winter, H. (1967). Diagnosis of Babesiosis by fluorescence microscopy. *Res. Vet. Sci.* 170, 169-174
248. Woo, P.T. (1971). Evaluation of the haematocrit centrifuge and other techniques for the field diagnosis of trypanosomiasis and filariasis. *Acta Tropica* 28, 298-303
249. Wright, I.G. (1975). The probable role of *Babesia argentina* in the in vitro activation of plasma kallikrein. *Vet. Parasitol.* 1, 91-96
250. Wright, I.G. y D.F. Mahoney (1974). The activation of kallikrein in acute *Babesia argentina* infections. *Z. Parasitenk.* 43, 271-278
251. Wright, I.G. y B.V. Goodger (1988). Pathogenesis of babesiosis. En: M. Ristic (Ed.): *Babesiosis in domestic animals and man*. CRC Press, Inc., Florida Ch.6, 100-118
252. Young, A.S. (1988). Epidemiology of babesiosis. En: Ristic (Ed.): *Babesiosis in domestic animals and man*. CRC Press, New York, 81-99
253. Zaraza, O.H. y G.D. Parra (1977). Estudios de la patogenicidad de dos cepas de *Anaplasma marginale* de Colombia. *Rev. ICA-Bogotá (Colombia)* 12 (4), 457-471

254. Zintz, R. (1990). Untersuchungen zur Epidemiologie der Haemoparasitosen in Milchproduzierenden Betrieben in Valle und Quindío (Kolumbien). Dissertation, Hannover
255. Zips, S.G. (1989). Epidemiologische Untersuchung der *Babesia bovis*-Infektion in Córdoba (Kolumbien). Dissertation, Hannover
256. Zuerner, U. (1983). Seroepidemiologie der bovinen Babesien- und Anaplasmeninfektionen in Kolumbien. I. Einleitende Untersuchungen mit dem indirekten Immunofluoreszenz-Test. Dissertation, Hannover
257. Zwernemann, B. (1989). Impfung von Rindern gegen *Babesia bovis* mit verschiedenen Impfstoffen in Israel. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation
258. Zweggarth, E., C. Sabwa y D. Roettcher (1986). An Elisa for the detection of antibodies to *Trypanosoma (T.) brucei evansi* in camels (*Camelus dromedarius*) using peroxidase-conjugated protein A. Trop. Med. Parasit. 37, 105-106

**Este documento fue
revisado y corregido por:**

- Dr. Antonio Carlos López P.
- Dr. César Augusto Lobo A.

Proyecto Colombo-Alemán ICA-GTZ

Impresión:  **PRODUMEDIOS**
Convencio: ICA - CORVEICA