

VOL II

Estudos em Ciências Agrárias e Ambientais

Eduardo Spers
(Organizador)



EDITORA
ARTEMIS

2024

VOL II

Estudos em Ciências Agrárias e Ambientais

Eduardo Spers
(Organizador)



EDITORA
ARTEMIS

2024



O conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons Atribuição-Não-Comercial NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0). Direitos para esta edição cedidos à Editora Artemis pelos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento, desde que sejam atribuídos créditos aos autores, e sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

A responsabilidade pelo conteúdo dos artigos e seus dados, em sua forma, correção e confiabilidade é exclusiva dos autores. A Editora Artemis, em seu compromisso de manter e aperfeiçoar a qualidade e confiabilidade dos trabalhos que publica, conduz a avaliação cega pelos pares de todos manuscritos publicados, com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

Editora Chefe	Prof. ^a Dr. ^a Antonella Carvalho de Oliveira
Editora Executiva	M. ^a Viviane Carvalho Mocellin
Direção de Arte	M. ^a Bruna Bejarano
Diagramação	Elisangela Abreu
Organizador	Prof. Dr. Eduardo Eugênio Spers
Imagem da Capa	Bruna Bejarano, Arquivo Pessoal
Bibliotecário	Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

Conselho Editorial

Prof.^a Dr.^a Ada Esther Portero Ricol, *Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”*, Cuba
Prof. Dr. Adalberto de Paula Paranhos, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil
Prof. Dr. Agustín Olmos Cruz, *Universidad Autónoma del Estado de México*, México
Prof.^a Dr.^a Amanda Ramalho de Freitas Brito, Universidade Federal da Paraíba, Brasil
Prof.^a Dr.^a Ana Clara Monteverde, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina
Prof.^a Dr.^a Ana Júlia Viamonte, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal
Prof. Dr. Ángel Mujica Sánchez, *Universidad Nacional del Altiplano*, Peru
Prof.^a Dr.^a Angela Ester Mallmann Centenaro, Universidade do Estado de Mato Grosso, Brasil
Prof.^a Dr.^a Begoña Blandón González, *Universidad de Sevilla*, Espanha
Prof.^a Dr.^a Carmen Pimentel, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil
Prof.^a Dr.^a Catarina Castro, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
Prof.^a Dr.^a Cirila Cervera Delgado, *Universidad de Guanajuato*, México
Prof.^a Dr.^a Cláudia Neves, Universidade Aberta de Portugal
Prof.^a Dr.^a Cláudia Padovesi Fonseca, Universidade de Brasília-DF, Brasil
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos, Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil
Prof. Dr. David García-Martul, *Universidad Rey Juan Carlos de Madrid*, Espanha
Prof.^a Dr.^a Deuzimar Costa Serra, Universidade Estadual do Maranhão, Brasil
Prof.^a Dr.^a Dina Maria Martins Ferreira, Universidade Estadual do Ceará, Brasil
Prof.^a Dr.^a Edith Luévano-Hipólito, *Universidad Autónoma de Nuevo León*, México
Prof.^a Dr.^a Eduarda Maria Rocha Teles de Castro Coelho, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal
Prof. Dr. Eduardo Eugênio Spers, Universidade de São Paulo (USP), Brasil
Prof. Dr. Eloi Martins Senhoras, Universidade Federal de Roraima, Brasil
Prof.^a Dr.^a Elvira Laura Hernández Carballido, *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, México



Prof.ª Dr.ª Emilas Darlene Carmen Lebus, *Universidad Nacional del Nordeste/ Universidad Tecnológica Nacional, Argentina*
Prof.ª Dr.ª Erla Mariela Morales Morgado, *Universidad de Salamanca, Espanha*
Prof. Dr. Ernesto Cristina, *Universidad de la República, Uruguay*
Prof. Dr. Ernesto Ramírez-Briones, *Universidad de Guadalajara, México*
Prof. Dr. Fernando Hitt, *Université du Québec à Montréal, Canadá*
Prof. Dr. Gabriel Díaz Cobos, *Universitat de Barcelona, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Gabriela Gonçalves, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal
Prof. Dr. Geoffroy Roger Pointer Malpass, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brasil
Prof.ª Dr.ª Gladys Esther Leoz, *Universidad Nacional de San Luis, Argentina*
Prof.ª Dr.ª Glória Beatriz Álvarez, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*
Prof. Dr. Gonçalo Poeta Fernandes, Instituto Politécnico da Guarda, Portugal
Prof. Dr. Gustavo Adolfo Juarez, *Universidad Nacional de Catamarca, Argentina*
Prof. Dr. Guillermo Julián González-Pérez, *Universidad de Guadalajara, México*
Prof. Dr. Håkan Karlsson, *University of Gothenburg, Suécia*
Prof.ª Dr.ª Iara Lúcia Tescarollo Dias, Universidade São Francisco, Brasil
Prof.ª Dr.ª Isabel del Rosario Chiyon Carrasco, *Universidad de Piura, Peru*
Prof.ª Dr.ª Isabel Yohena, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*
Prof. Dr. Ivan Amaro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil
Prof. Dr. Iván Ramon Sánchez Soto, *Universidad del Bío-Bío, Chile*
Prof.ª Dr.ª Ivânia Maria Carneiro Vieira, Universidade Federal do Amazonas, Brasil
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz, *University of Miami and Miami Dade College, Estados Unidos*
Prof. Dr. Jesús Montero Martínez, *Universidad de Castilla - La Mancha, Espanha*
Prof. Dr. João Manuel Pereira Ramalho Serrano, Universidade de Évora, Portugal
Prof. Dr. Joaquim Júlio Almeida Júnior, UniFIMES - Centro Universitário de Mineiros, Brasil
Prof. Dr. Jorge Ernesto Bartolucci, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*
Prof. Dr. José Cortez Godinez, Universidad Autónoma de Baja California, México
Prof. Dr. Juan Carlos Cancino Diaz, Instituto Politécnico Nacional, México
Prof. Dr. Juan Carlos Mosquera Feijoo, *Universidad Politécnica de Madrid, Espanha*
Prof. Dr. Juan Diego Parra Valencia, *Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín, Colômbia*
Prof. Dr. Juan Manuel Sánchez-Yañez, *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México*
Prof. Dr. Juan Porras Pulido, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil
Prof. Dr. Leinig Antonio Perazolli, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil
Prof.ª Dr.ª Livia do Carmo, Universidade Federal de Goiás, Brasil
Prof.ª Dr.ª Luciane Spanhol Bordignon, Universidade de Passo Fundo, Brasil
Prof. Dr. Luis Fernando González Beltrán, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*
Prof. Dr. Luis Vicente Amador Muñoz, *Universidad Pablo de Olavide, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Macarena Esteban Ibáñez, *Universidad Pablo de Olavide, Espanha*
Prof. Dr. Manuel Ramiro Rodriguez, *Universidad Santiago de Compostela, Espanha*
Prof. Dr. Manuel Simões, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal
Prof.ª Dr.ª Márcia de Souza Luz Freitas, Universidade Federal de Itajubá, Brasil
Prof. Dr. Marcos Augusto de Lima Nobre, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil
Prof. Dr. Marcos Vinicius Meiado, Universidade Federal de Sergipe, Brasil
Prof.ª Dr.ª Mar Garrido Román, *Universidad de Granada, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Margarida Márcia Fernandes Lima, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil
Prof.ª Dr.ª María Alejandra Arecco, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*
Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida José de Oliveira, Universidade Federal da Bahia, Brasil
Prof.ª Dr.ª Maria Carmen Pastor, *Universitat Jaume I, Espanha*

Prof.ª Dr.ª Maria da Luz Vale Dias – Universidade de Coimbra, Portugal
Prof.ª Dr.ª Maria do Céu Caetano, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
Prof.ª Dr.ª Maria do Socorro Saraiva Pinheiro, Universidade Federal do Maranhão, Brasil
Prof.ª Dr.ª MªGraça Pereira, Universidade do Minho, Portugal
Prof.ª Dr.ª Maria Gracinda Carvalho Teixeira, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil
Prof.ª Dr.ª María Guadalupe Vega-López, *Universidad de Guadalajara, México*
Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Pato, Instituto Politécnico de Viseu, Portugal
Prof.ª Dr.ª Maritza González Moreno, *Universidad Tecnológica de La Habana, Cuba*
Prof.ª Dr.ª Mauriceia Silva de Paula Vieira, Universidade Federal de Lavras, Brasil
Prof. Dr. Melchor Gómez Pérez, *Universidad del Pais Vasco, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Ninfa María Rosas-García, Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional, México
Prof.ª Dr.ª Odara Horta Boscolo, Universidade Federal Fluminense, Brasil
Prof. Dr. Osbaldo Turpo-Gebera, *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Peru*
Prof.ª Dr.ª Patrícia Vasconcelos Almeida, Universidade Federal de Lavras, Brasil
Prof.ª Dr.ª Paula Arcoverde Cavalcanti, Universidade do Estado da Bahia, Brasil
Prof. Dr. Rodrigo Marques de Almeida Guerra, Universidade Federal do Pará, Brasil
Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares, Universidade Federal do Piauí, Brasil
Prof. Dr. Sérgio Bitencourt Araújo Barros, Universidade Federal do Piauí, Brasil
Prof. Dr. Sérgio Luiz do Amaral Moretti, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil
Prof.ª Dr.ª Silvia Inés del Valle Navarro, *Universidad Nacional de Catamarca, Argentina*
Prof.ª Dr.ª Solange Kazumi Sakata, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)- USP, Brasil
Prof.ª Dr.ª Stanislava Kashtanova, *Saint Petersburg State University, Russia*
Prof.ª Dr.ª Susana Álvarez Otero – *Universidad de Oviedo, Espanha*
Prof.ª Dr.ª Teresa Cardoso, Universidade Aberta de Portugal
Prof.ª Dr.ª Teresa Monteiro Seixas, Universidade do Porto, Portugal
Prof. Dr. Valter Machado da Fonseca, Universidade Federal de Viçosa, Brasil
Prof.ª Dr.ª Vanessa Bordin Viera, Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
Prof.ª Dr.ª Vera Lúcia Vasilévski dos Santos Araújo, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil
Prof. Dr. Wilson Noé Garcés Aguilar, *Corporación Universitaria Autónoma del Cauca, Colômbia*
Prof. Dr. Xosé Somoza Medina, *Universidad de León, Espanha*

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

E82 Estudos em Ciências Agrárias e Ambientais II [livro eletrônico] /
Organizador Eduardo Eugênio Spers. – Curitiba, PR: Artemis,
2024.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

Edição bilíngue

ISBN 978-65-81701-27-7

DOI 10.37572/EdArt_301024277

1. Ciências agrárias – Pesquisa – Brasil. 2. Meio ambiente.
3. Sustentabilidade. I. Spers, Eduardo Eugênio.

CDD 630

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422



APRESENTAÇÃO

O campo das Ciências Agrárias e Ambientais desempenha um papel fundamental na compreensão e solução dos desafios contemporâneos relacionados à produção de alimentos, à conservação ambiental e ao bem-estar animal. Em um mundo em constante transformação, questões como a sustentabilidade dos agroecossistemas, o manejo eficiente dos recursos naturais e a saúde pública se tornam cada vez mais relevantes. É com este espírito que apresentamos o volume II da coletânea "Estudos em Ciências Agrárias e Ambientais", que reúne pesquisas de autores de diversas partes do mundo, cada um contribuindo com sua perspectiva e expertise únicos.

Os quinze artigos que compõem este volume abordam uma variedade de tópicos, refletindo a riqueza e a diversidade das Ciências Agrárias. Desde práticas conservacionistas que buscam melhorar e manter agroecossistemas, até investigações sobre o uso de fitohormonas e fertilização na produção vegetal, o uso de tecnologias de processamento de madeira e a promoção do bagre armado - cada estudo traz à tona questões cruciais que impactam tanto a produção agrícola quanto a saúde ambiental.

Neste volume, também exploramos a crescente relevância dos produtos agrícolas locais, especialmente em tempos desafiadores como os que vivemos, marcados pela pandemia da COVID-19. A importância de circuitos curtos de proximidade se torna evidente, promovendo não apenas a segurança alimentar, mas também a resiliência das comunidades.

Além disso, as contribuições da veterinária destacam a importância do cuidado animal e da saúde pública, ilustrando a interconexão entre os seres humanos, os animais e o meio ambiente.

Esperamos que esta coletânea não apenas informe, mas também inspire debates e colaborações futuras entre pesquisadores, profissionais e estudantes da área. Juntos, podemos avançar em direção a um futuro mais sustentável e equilibrado, em que conhecimento e pesquisa sejam os pilares para soluções efetivas.

Agradecemos a todos os autores e colaboradores que tornaram este trabalho possível. É nossa esperança que os estudos aqui apresentados contribuam para um entendimento mais profundo das questões agrárias e ambientais, e que possam servir de base para novas investigações e práticas inovadoras.

Eduardo Eugênio Spers

SUMÁRIO

SUSTENTABILIDADE E PRÁTICAS CONSERVACIONISTAS

CAPÍTULO 1.....1

PRÁTICAS CONSERVACIONISTAS PARA MELHORIA E MANUTENÇÃO DOS AGROECOSSISTEMAS

Eliana Batista

Glêvia Kamila Lima

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3010242771

CAPÍTULO 2.....17

PROS AND CONS OF USING FORESTRY AS A COMPENSATION MECHANISM FOR GREENHOUSE GASES EMISSIONS ON NEW ZEALAND PASTORAL FARMS

Phil Journeaux

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3010242772

CAPÍTULO 3.....32

STRUCTURAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF WOOD GREENERY ORIGINATING FROM BOSNIA AND HERZEGOVINA

Srđan Ljubojević

Ladislav Vasilišin

Goran Vučić

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3010242773

CAPÍTULO 4.....47

THE CHOICE OF OPTIMAL TECHNOLOGY FOR EXTRACTING WOOD GREENERY FROM FOREST DENDROMASS

Srđan Ljubojević

Ladislav Vasilišin

Goran Vučić

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3010242774

CAPÍTULO 5..... 61

PLAN DE ACCIÓN PARA LA PROMOCIÓN DEL BAGRE ARMADO (HYPOSTOMUS PLECOSTOMUS) EN VILLAHERMOSA TABASCO

María Patricia Torres Magaña

María Rivera Rodríguez

Ana Laura Fernández Mena

Araceli Pérez Reyes

María del Carmen Hernández Martínez

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3010242775

PRODUÇÃO VEGETAL E IMPACTOS AMBIENTAIS

CAPÍTULO 6.....70

FITOHORMONAS Y FERTILIZACIÓN QUIMICA EN LA RENTABILIDAD DE LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA DE PASTO BUFFEL ZARAGOZA 115 EN DOS ESTACIONES DEL AÑO BAJO RIEGO EN EL NORTE DE COAHUILA, MEXICO

Pedro Hernández Rojas

Mauricio Velázquez Martínez

Carlos Ríos Quiroz

Víctor Hugo González Torres

Dagoberto Flores Marín

Macotulio Soto Hernández

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3010242776

CAPÍTULO 7 86

A IMPORTÂNCIA CRESCENTE DOS PRODUTOS AGRÍCOLAS E AGROALIMENTARES LOCAIS: OS EFEITOS DA PANDEMIA COVID-19 NOS CIRCUITOS CURTOS DE PROXIMIDADE

Maria Lúcia Pato

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3010242777

CAPÍTULO 8..... 96

PARÂMETROS FITOTÉCNICOS DE CANA-PLANTA E DE PRIMEIRA SOCA EM SOLO ARGILOSO

Lia Mara Moterle

Renato Frederico dos Santos

Hugo Zeni Neto

Luiz Gustavo da Mata Borsuk

Bruna Sisti Michelin de Polli

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3010242778

CAPÍTULO 9..... 100

SEVERITY OF 'WOOD POCKET' PHYSIOPATHY IN SELECTED PERSIAN LIME PLANTS OF DIFFERENT GENERATIONS

Juan Carlos Álvarez Hernández

José Concepción García Preciado

José Joaquín Velázquez Monreal

 https://doi.org/10.37572/EdArt_3010242779

CAPÍTULO 10..... 108

THE DILEMMA OF THE DEVELOPMENT OF OIL PALM PLANTATIONS AGAINST FOREST CONSERVATION IN CAMEROON

Mesmin Tchindjang

Guy Donald Abasombe

Rose Ngo Makak

Philippe Mbevo Fendoung

 https://doi.org/10.37572/EdArt_30102427710

SAÚDE ANIMAL E MEIO-AMBIENTE

CAPÍTULO 11..... 146

COMPARACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DIRECTAS PARA LA DETECCIÓN DE *Babesia bigemina* EN BOVINOS

Azul Gisela Comas González

Julio Vicente Figueroa Millán

José Juan Lira Amaya

Rebeca Montserrat Santamaría Espinosa

Grecia Martínez García

Carmen Rojas Martínez

Jesús Antonio Álvarez Martínez

 https://doi.org/10.37572/EdArt_30102427711

CAPÍTULO 12 168

OZONOTHERAPY AS AN ASSISTANT IN THE TREATMENT OF MASTITIS, IN LACTATING COWS

Gabriel Gerardo Aguirre Espíndola

Mari Carmen Larios Garcia

José Alfredo Galicia Domínguez

Sandra Ortiz González

 https://doi.org/10.37572/EdArt_30102427712

CAPÍTULO 13 178

DIAGNOSTICS IN A PUG DOG WITH ALLERGY REACTION ON RABIES VACCINE, CLINICAL PICTURE AND ATOPIC DERMATITIS- CASE REPORT

Danijela Videnovic

 https://doi.org/10.37572/EdArt_30102427713

CAPÍTULO 14 187

PARASITIC CONTAMINATION OF PUBLIC PLACES IN BELGRADE AND ITS CONTROL RESULTS OF A THIRTY-YEAR STUDY (1993-2023)

Ivan Pavlovic

Aleksandra Tasic

Vesna Kovačević Jovanović

Dara Jovanovic

Zoran Tambur

 https://doi.org/10.37572/EdArt_30102427714

CAPÍTULO 15 216

DISEÑO CONCEPTUAL DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS BALANCEADOS PARA GANADO PORCINO

Oralio Hernández Alvarado

Adolfo López Zavala

César Chávez Olivares

Efraín Zúñiga Morales

 https://doi.org/10.37572/EdArt_30102427715

SOBRE O ORGANIZADOR 228

ÍNDICE REMISSIVO 229

CAPÍTULO 11

COMPARACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DIRECTAS PARA LA DETECCIÓN DE *Babesia bigemina* EN BOVINOS¹

Data de submissão: 15/09/2024

Data de aceite: 02/10/2024

Azul Gisela Comas González

Clínica Animal's, Calle 5 Norte #87
Cuautla, Morelos, México

Julio Vicente Figueroa Millán²

Centro Nacional de Investigación
Disciplinaria en Salud Animal e
Inocuidad, INIFAP
Jiutepec, Morelos, México
<https://orcid.org/0000-0003-4731-3592>

José Juan Lira Amaya

Centro Nacional de Investigación
Disciplinaria en Salud Animal e
Inocuidad, INIFAP
Jiutepec, Morelos, México
<https://orcid.org/0000-0003-4909-8769>

Rebeca Montserrat Santamaría Espinosa

Centro Nacional de Investigación
Disciplinaria en Salud Animal e
Inocuidad, INIFAP
Jiutepec, Morelos, México
<https://orcid.org/0000-0002-1153-6455>

Grecia Martínez García

Centro Nacional de Investigación
Disciplinaria en Salud Animal e
Inocuidad, INIFAP
Jiutepec, Morelos, México
<https://orcid.org/0000-0002-5795-5567>

Carmen Rojas Martínez

Centro Nacional de Investigación
Disciplinaria en Salud Animal e
Inocuidad, INIFAP
Jiutepec, Morelos, México
<https://orcid.org/0000-0001-9177-5634>

Jesús Antonio Álvarez Martínez

Centro Nacional de Investigación
Disciplinaria en Salud Animal e
Inocuidad, INIFAP
Jiutepec, Morelos, México

RESUMEN: El diagnóstico específico de la babesiosis, que es causada por el piroplasma *Babesia bovis* y *B. bigemina*, se realiza por la identificación del parásito en frotis sanguíneos teñidos con Giemsa. Aunque el diagnóstico oportuno puede ser realizado por medio de frotis sanguíneos, no siempre puede ser visualizado el parásito en la etapa temprana de la infección. La amplificación de ADN mediante la prueba de PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) es una rápida técnica que permite incrementar la sensibilidad para la detección de *Babesia* spp. En este trabajo se

¹ Financiado por Proyecto INIFAP No. 11481036208

² Autor de correspondencia: Julio V. Figueroa Millán. CENID-Salud Animal e Inocuidad, INIFAP. Carr. Fed. Cuernavaca-Cuautla, No. 8534. Jiutepec, Morelos, 62550.

determina el nivel de sensibilidad y especificidad de ambas pruebas, frotis sanguíneo y PCR, para detectar *B. bigemina* durante la fase temprana de la infección. Se utilizaron muestras de sangre congelada de bovinos provenientes de una zona libre de garrapatas y que fueron posteriormente infectados experimentalmente mediante la inoculación de un estabilizado de eritrocitos infectados con *B. bigemina*, el cual había sido mantenido en criopreservación a -196°C en nitrógeno líquido. Se encontró que la prueba de PCR tuvo un 100% de sensibilidad y un 94.44% de especificidad y en el caso del frotis sanguíneo se obtuvo un 100% tanto de sensibilidad como de especificidad. La prueba de PCR para el diagnóstico de *B. bigemina* es lo suficientemente sensible y específica para la detección oportuna de la babesiosis durante su fase temprana.

PALABRAS CLAVE: *Babesia bigemina*. Diagnóstico. Frotis. PCR.

COMPARAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS DIRETOS PARA DETECÇÃO DE *Babesia bigemina* EM BOVINOS

RESUMO: O diagnóstico específico da babesiose, causada pelos piroplasmas *Babesia bovis* e *B. bigemina*, é feito pela identificação do parasita em esfregaços de sangue corados com Giemsa. Embora o diagnóstico oportuno possa ser feito através de esfregaços de sangue, o parasita nem sempre pode ser visualizado na fase inicial da infecção. A amplificação do DNA através do teste PCR (Polymerase Chain Reaction) é uma técnica rápida que permite aumentar a sensibilidade para detecção de *Babesia* spp. Neste trabalho é determinado o nível de sensibilidade e especificidade de ambos os testes, esfregaço de sangue e PCR, para detectar *B. bigemina* durante a fase inicial da infecção. Foram utilizadas amostras de sangue congelado de bovinos de uma zona livre de carrapatos que foram posteriormente infectados experimentalmente por inoculação de um estabilizado de eritrócitos infectados com *B. bigemina*, que foi mantido em criopreservação a -196°C em nitrogênio líquido. Verificou-se que o teste PCR apresentou 100% de sensibilidade e 94,44% de especificidade e no caso do esfregaço de sangue foram obtidos 100% tanto de sensibilidade quanto de especificidade. O teste PCR para o diagnóstico de *B. bigemina* é suficientemente sensível e específico para a detecção oportuna da babesiose na sua fase inicial.

PALAVRAS-CHAVE: *Babesia bigemina*. Diagnóstico. Frotis. PCR.

1 INTRODUCCIÓN

La babesiosis bovina conocida también como fiebre de Texas o fiebre de la garrapata o aguas rojas, es causada por protozoarios intraeritrocíticos del género *Babesia* que son transmitidos por garrapatas (McCosker, 1981). El 70% del total de cabezas de ganado bovino que existe en México, se encuentra en zonas tropicales y subtropicales que son endémicas de la garrapata vector y consecuentemente de la babesiosis (Avila T, 2009).

Existen más de 70 especies de protozoarios del género *Babesia*, distribuidas alrededor del mundo; de las cuales solo 18 causan enfermedad en diferentes mamíferos

domésticos (Levine, 1980). De estas, tres especies destacan por su importancia económica al afectar al ganado bovino (OIE, 2021). Estas especies son: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, y *Babesia divergens* (Bock et al, 2004; OIE, 2021). En México existen las dos especies de mayor importancia económica *B. bovis* y *B. bigemina* (Toussaint et al, 1905; Alvarez et al, 2019).

Los Médicos Veterinarios buscan el control de enfermedades para mejorar el ganado, sin embargo, la babesiosis es una enfermedad donde el médico encuentra una de sus principales limitantes al no contar con una vacuna comercial (Alvarez, et al, 2020; Bock et al., 2004). Los métodos de control y protocolos de prevención, pretenden hacer más eficientes las condiciones epidemiológicas, sin embargo, las pruebas diagnósticas se han convertido en una herramienta excepcional para el control de las enfermedades parasitarias. La utilización del laboratorio permite conocer los agentes causales, no obstante, muchas de estas pruebas presentan una mayor o menor sensibilidad diagnóstica (OIE, 2023). Debido a esto en este trabajo se pretende determinar el nivel de sensibilidad y especificidad que hay entre dos pruebas directas, el frotis sanguíneo que es una de las técnicas más utilizadas y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) que es una de las técnicas de elección ya que se pueden utilizar volúmenes muy reducidos de muestra para detectar la presencia del parásito (OIE, 2021; 2023).

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La babesiosis bovina es la enfermedad protozoaria transmitida por garrapatas que tiene mayor importancia económica en la ganadería de regiones tropicales. Al menos 1.3 billones de animales domésticos están en riesgo de ser infectados, y la mayoría de la población mundial bovina estimada (1.2×10^9) está potencialmente expuesta a uno o más especies de *Babesia* sp. (Solorio, 1997).

La amplia distribución geográfica de la babesiosis bovina representa un serio problema para la ganadería, especialmente en los países en desarrollo. Se considera que es un obstáculo especialmente para la introducción de ganado procedente de zonas libre de garrapatas y que es genéticamente especializado en la producción de carne o leche. La presencia de estos parásitos en el ganado es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad (McCosker, 1981). La población de ganado bovino en México asciende a cerca de 25 millones de cabezas (Avila T., 2009), de las cuales el 70% del inventario nacional de ganado bovino se ubica principalmente en el trópico bajo (Solis, 1991). Esta problemática hace necesaria la implementación de métodos de prevención y de control que deben estar basadas en un sistema de diagnóstico efectivo. Sistema que,

además de indicar la infección individual, permita conocer la situación epidemiológica de la babesiosis en un hato y en una región determinada (Alvarez et al, 2019). Existen distintos tipos de métodos de diagnóstico, una de las formas directas del diagnóstico es la observación del parásito mediante la elaboración y examen microscópico de extendidos sanguíneos teñidos con Giemsa (Solorio et al., 1997). Este es el método más sencillo y económico, con alta especificidad, pero regular sensibilidad, y a pesar de ser útil solo en la fase aguda de la enfermedad el método ha sido, y continúa siendo utilizado como la primera herramienta de trabajo para la identificación y confirmación de los organismos protozoarios (Figuroa et al., 2003).

Las técnicas de tipo indirecto permiten la detección de anticuerpos específicos circulantes (Álvarez et al., 2019). La prueba de inmunofluorescencia indirecta es el método serológico más usado para el diagnóstico de la babesiosis bovina (Solorio et al., 1997; Rojas-Martínez et al, 2018) sin embargo, presenta ciertas desventajas ya que los anticuerpos anti-parásito pueden estar presentes en el suero hasta algún tiempo después de iniciada la infección, o pueden persistir por mucho tiempo posterior a la resolución de la infección, además en los países donde se producen y comercializan vacunas anti-*Babesia*, los animales inmunizados pueden tener anticuerpos que confundirían el diagnóstico, todo esto pudiera ser un problema en términos epidemiológicos (Figuroa et al., 2003).

A diferencia de otros métodos, la prueba de PCR detecta información genética en vez de proteínas, esta técnica es rápida e incluso más sensible que otros métodos, ya que se puede cuantificar la carga viral, bacteriana o parasitaria, y si el producto amplificado es secuenciado, permite investigar la fuente de la infección (Radford, 2009). Sin embargo, su aplicación puede presentar algunos inconvenientes como son los problemas asociados a la contaminación de amplicones (productos ADN de previas amplificaciones), el elevado costo de los materiales y reactivos necesarios, así como los intensos y laboriosos métodos de detección posteriores a la técnica de PCR (análisis de productos amplificados) (Figuroa et al., 2003).

La utilización de la prueba de PCR para diagnóstico, propicia avances significativos no solo en el diagnóstico de la enfermedad, permitiendo diseñar métodos de diagnóstico altamente eficientes, sino también en estudios epidemiológicos (Figuroa et al., 1993, 1998).

1.2 HIPÓTESIS

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basada en el gen VESA-1 como diana, es más efectiva para detectar la infección por *Babesia bigemina* en sangre de

bovinos y tiene mayor sensibilidad analítica y epidemiológica que el examen microscópico de frotis teñidos. La prueba de PCR basada en la amplificación del gen SBP4 provee una alternativa para el diagnóstico de *B. bigemina* demostrando la misma sensibilidad que la prueba de PCR con el gen VESA-1.

1.3 OBJETIVOS

Comparar dos métodos de diagnóstico directo de *B. bigemina* para determinar cuál es más confiable de acuerdo con el nivel de sensibilidad analítica y epidemiológica que ofrece cada uno.

Comparar dos pruebas de PCR con distintos genes blanco de *B. bigemina*, con la finalidad de determinar la sensibilidad analítica en el diagnóstico de *B. bigemina* en animales experimentalmente infectados.

1.4 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

La Babesiosis bovina es una enfermedad febril transmitida por garrapatas y es causada por parásitos del género *Babesia* que generalmente se caracteriza por una lisis eritrocítica extensiva que conduce a anemia, ictericia, hemoglobinuria y muerte (Bock et al, 2004). Aunque se han reportado más especies de babesia alrededor del mundo, en Latinoamérica sólo existen dos de ellas: *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. Ambas especies de *Babesia* comparten la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) spp.* como vector para su transmisión biológica al ganado. (Alvarez et al, 2020). En condiciones de campo se presentan regularmente infecciones mixtas con ambas especies de *Babesia* e incluso, asociadas a otras enfermedades como la anaplasmosis. *B. bovis* y *B. bigemina* afectan al ganado de manera distinta y por lo tanto el curso de la enfermedad varía dependiendo de la especie involucrada (Figuroa et al 1993). La importancia de la babesiosis en el trópico mexicano radica en que la infección por este parásito intraeritrocítico provoca grandes pérdidas económicas para los ganaderos, suele ser un obstáculo para mejorar la producción de carne y leche, lo cual exige encontrar un método de diagnóstico efectivo y métodos de control que ayuden a revertir el déficit que México tiene con respecto a importación de leche y carne de origen bovino. Las pérdidas se relacionan directamente con la pérdida de peso en animales enfermos, abortos, gastos por uso de fármacos y atención especializada, además de las pérdidas directas por la muerte de los animales (Alvarez et al., 2019). Además, los animales afectados al recuperarse de la presentación aguda de la enfermedad generalmente se mantienen como portadores asintomáticos por años, pudiendo ser vectores de infección hacia los animales sanos y

difícilmente alcanzan los niveles de producción perdidos (Mahoney, 1994). Actualmente se considera que la babesiosis bovina es una enfermedad que limita la movilización de ganado productor de leche y/o carne, procedente de zonas libres de garrapatas y de *Babesia spp.*, que es trasladado a regiones tropicales y subtropicales. Este tipo de ganado es altamente susceptible a la enfermedad, debido a que nunca ha sido expuesto al vector, ni a *Babesia spp.* (Ross y Mahoney, 1972). Por esta razón es importante la determinación de la estabilidad enzoótica en un rancho o región endémica en particular. Para el diagnóstico de esta enfermedad, se requiere de técnicas que permitan diseñar los procedimientos de prevención y/o controles más adecuados (OIE, 2021; 2023). Rutinariamente se recurre a la observación de las manifestaciones clínicas propias de la babesiosis, además de la identificación de alteraciones patológicas, cambios bioquímicos y evidencias pasadas o presentes de la exposición al agente (Bose et al, 1995). El método más utilizado desde hace años ha sido la identificación de los parásitos babesiales en la sangre periférica en frotis teñidos ya que es un método confiable y rápido, aunque requiere una meticulosa revisión y un microscopista experimentado (Bose et al, 1995; OIE, 2021). Entre las técnicas directas también se encuentran las improntas de órganos, la prueba de hemolinfa y la prueba de PCR. Esta última es una de las técnicas que ofrece importantes ventajas sobre los métodos convencionales de diagnóstico por su alta sensibilidad y especificidad (Figuroa et al., 2003). Los métodos inmunológicos son útiles en estudios epidemiológicos, sin embargo, en situaciones en las cuales se precise de la determinación a nivel especie, y la detección directa del material genético parasitario, es mejor el uso de sondas de ácidos nucleicos o técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, tal como la prueba de PCR (Figuroa et al., 2003). Para el diagnóstico de la babesiosis bovina, la implementación de métodos de control y estrategias de prevención, deben estar basadas en un sistema de diagnóstico efectivo, que además de indicar la infección individual establezca las condiciones epidemiológicas de la babesiosis en un hato y en una región determinada. El diagnóstico puede efectuarse de manera directa o indirecta. Una de las formas directas del diagnóstico es la observación del parásito mediante frotis teñidos. Sin embargo, su desventaja radica en que su uso está limitado a la fase aguda de la enfermedad, debido que aun en casos fatales la parasitemia muy pocas veces rebasan el 1% de eritrocitos parasitados. Pese a esto el frotis es una de las técnicas confiables, aunque se requiere un microscopista con un ojo experimentado y una revisión meticulosa; se ha considerado su utilidad en el reconocimiento de ganado portador de *Babesia spp.* (Alvarez M, 2019). Además, gracias a los avances en tecnología molecular se ha hecho posible el uso y análisis de ácidos nucleicos para la detección del

parásito en sangre circulante de bovinos infectados, los métodos más utilizados en el pasado reciente son la hibridación de sondas y la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Figueroa, et al, 1993, 2003). Se han diseñado y utilizado un gran número de oligonucleótidos para utilizarse como cebadores en la prueba de PCR para detección de *Babesia* spp (Bock et al, 2004; OIE, 2021). De relevancia y particularmente para el diagnóstico molecular de *B. bigemina* por medio de la prueba de PCR se ha utilizado como diana el gen VESA-1 de *Babesia bigemina*. Brevemente, un fragmento de ADN cortado con enzimas de restricción conteniendo un inserto de 6, 300 pares de bases (pb) de ADN de *B. bigemina* fue subclonado y el extremo carboxilo fue secuenciado por el método de terminación de cadenas mediado por didesoxinucleótidos. A partir de la secuencia obtenida se diseñaron y sintetizaron dos pares de oligonucleótidos (oligos) para ser utilizados en la prueba de PCR. Un primer par de oligos fue utilizado para amplificar un fragmento de 278 pb a partir de ADN genómico del parásito (Figueroa et al., 1992; 2003). Un análisis de homología de secuencia realizado (Ramírez et al, 2011; Pérez et al, 2012) permitió determinar que la secuencia del fragmento de 278 pb es similar a un gene denominado *ves-1* que codifica por un Antígeno Variable de Superficie del Eritrocito (VESA-1 por sus siglas en inglés) identificado originalmente en *Babesia bovis* (O'Connor et al, 1997). VESA-1 es una proteína heterodimérica de alto peso molecular (300 kD) compuesta de VESA1a y VESA1b la cual se sintetiza y posteriormente es transportada a la superficie del eritrocito infectado con *B. bovis*. Los genes que codifican estas proteínas (*ves1*) comprenden la familia más grande de genes (>150 genes) en el genoma de *B. bovis* (Brayton et al, 2007), y genes VESA ortólogos se han identificado en *B. bigemina* (Pérez et al, 2012, Sachman et al, 2021; Santamaria et al, 2024).

2 METODOLOGIA

La investigación estuvo dirigida a la comparación de dos pruebas diagnósticas para *Babesia bigemina* (Frotis teñido con colorante de Giemsa y Reacción de la cadena de polimerasa (PCR) para su evaluación como método diagnóstico con mayor sensibilidad y especificidad. También se pretendía establecer que técnica es la más adecuada para detectar la infección durante el periodo de incubación de *Babesia* spp., que tiene una duración de entre 7 y 10 días (Cantó et al., 1999). Además, se comparan la sensibilidad y especificidad de dos pares de oligonucleótidos específicos para 2 genes de *B. bigemina* diferentes: uno donde la molécula diana es un gen ortólogo de VESA-1 (Antígeno Variable de la Superficie del Eritrocito, por sus siglas en inglés) de *B. bovis* y el otro es un gen ortólogo del gen que codifica la proteína SBP-4 de *B. bovis*.

En este caso el primer par, que generalmente es usado para el diagnóstico de *B. bigemina*, ha demostrado ser efectivo en la detección de animales infectados y positivos utilizando la prueba de PCR (Figueroa et al, 1992, 1993). Sin embargo, con respecto al par de oligonucleótidos para amplificar el gen *sbp4*, a la fecha no se ha reportado éste como gen diana para una prueba de PCR, por lo que se pretende sea una alternativa al gen *vesa-1*, donde se espera deberá tener, al menos, la misma sensibilidad analítica de detección que el primero.

2.1 GEN *sbp-4* DE *BABESIA BIGEMINA*

Teniendo como base la secuencia del gen que codifica la proteína SBP-4 de *B. bovis* descrita previamente (Terkawi, et al, 2011), se realizó una búsqueda por homología del gen ortólogo de *B. bigemina*, mediante un análisis bioinformático usando la herramienta Blast, en el genoma secuenciado de un aislado Australiano (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/b_bigemina). El alineamiento de la secuencia *sbp-4* de *B. bovis* con el genoma de *B. bigemina* arrojó dos segmentos de similitud en la secuencia correspondiente a los “contigs” 4098 y 4087. La secuencia codificante de SBP-4 del contig 4098 de *B. bigemina* (834 pb) se utilizó para diseñar 2 pares de oligonucleótidos o iniciadores utilizando la aplicación Primer3 plus disponible en línea (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Los iniciadores así obtenidos amplificarían un producto esperado de aproximadamente 830 y 740 pb, respectivamente, una vez realizada la prueba de PCR con ADN de *B. bigemina* como molde. Recientemente, se reportó la caracterización del gen *sbp4* presente en *B. bigemina* (Mosqueda et al, 2023) el cual consiste en 834 nucleótidos sin intrones. Este gen se transcribe y se expresa en la etapa eritrocítica del parásito, y se ha demostrado que anticuerpos específicos dirigidos a SBP-4 de *B. bigemina* reaccionan de forma cruzada con *B. ovata*, una especie originalmente aislada de bovinos en Japón, y se propone que estos hallazgos respaldan la inclusión de péptidos específicos de SBP4 en una vacuna contra *B. bigemina* y *B. ovata* (Mosqueda et al, 2023).

2.2 BOVINOS

Para esta investigación se utilizaron muestras de sangre congeladas de bovinos provenientes de una zona libre de garrapatas y negativos a anticuerpos contra *Babesia* spp. (por medio de la prueba de inmunofluorescencia indirecta). Los bovinos (n=18) fueron posteriormente infectados experimentalmente mediante la inoculación de un estabilizado

de eritrocitos infectados con *B. bigemina*, mantenido criopreservado a -196°C en nitrógeno líquido (Rojas-Martínez et al, 2018; Santamaria et al, 2020).

2.3 DIAGNÓSTICO DIRECTO POR TINCIÓN DE FROTIS DELGADOS

Se realizaron frotis delgados debido a su utilidad en el diagnóstico de babesiosis ya que al extender las células de la sangre en una capa fina se distinguen con mayor facilidad el tamaño de los eritrocitos, las inclusiones y las formas extracelulares (Bose et al, 1995).

2.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR: PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE CONGELADA

Se realizó la purificación de ADN a partir de las muestras de sangre congelada de bovinos experimentalmente infectados (Santamaria et al, 2018), utilizando el kit de Promega (Wizard Genomic DNA purification kit). Se utilizaron muestras de 9 distintas fechas dando un total de 162 muestras congeladas de sangre. Se descongelaron gradualmente las muestras de sangre contenidas en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml, posteriormente se colocó la sangre de cada muestra en tubos de 15 ml donde se les agregó solución de lisis (0.015% saponina, 35 mM NaCl y 1mM EDTA) realizando tres lavados por centrifugación con la misma, para eliminar la mayor cantidad de hemoglobina de las muestras, ya que se obtuvo una pastilla de color rosado al fondo del tubo. Se utilizaron 300 µl de cada muestra de acuerdo a las instrucciones del kit Promega (Madison WI, USA) y se colocó en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml de nuevo. Posteriormente se continuó con el procedimiento indicado en el kit Promega.

2.5 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES ORTÓLOGOS *VESA-1* Y *SBP-4* DE *B. BIGEMINA* MEDIANTE PCR

Las muestras de ADN fueron amplificadas por PCR utilizando únicamente el par de primers (BiF/BiR) para amplificar el gen *vesa-1* (Figueroa et al, 1992; 1993). Para efectos de comparación entre ambos genes, se escogió la fecha pos-infección conteniendo el mayor número de animales con la mayor parasitemia para amplificar por PCR y con los oligonucleótidos para el gen *sbp-4*. Partiendo de ADN purificado se llevó a cabo la amplificación de los genes *vesa-1* y *sbp-4* para la detección de *B. bigemina* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un volumen final de 25 µl, donde se incluye 12.5 µl de mezcla maestra (Promega, Co.) conteniendo Taq polimerasa, dNTPS, Cloruro de Magnesio, 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos para el gen *vesa-1* (BiF,

5´-TCTCTCCATACCCCTCCAAC-3´ y BiR, 5´GCTTCAACTCTGAGTCCAAA-3´) o *sbp-4* (F, 5´-AATGTCATCGAGGTGACCTTCC-3´, y R, 5´CTGGTGCTCCTCAACCTCCTT-3´); 2.5 µl de agua destilada y 8 µl de ADN purificado. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Biorad bajo el siguiente programa de ciclado de alineamiento a: desnaturalización inicial 95°C por 5 min., desnaturalización a 95°C por 1 min., alineamiento a 57°C por 1 min., extensión a 73°C por 1.5 min durante 35 ciclos y extensión final por 72°C por 15 min., y para SBP-4: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min., desnaturalización a 94°C por 30 seg., alineamiento a 61°C por 90 seg., extensión a 72°C por 2 min durante 45 ciclos, finalizando con un ciclo de 72°C por 15 min.

2.6 VISUALIZACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

El producto de PCR se analizó mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X, teñido con 2 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). Se utilizaron como marcadores de talla las escaleras de 100 y 50 pb y, en algunas ocasiones, de 1 Kb.

2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para identificar relaciones de dependencia entre variables cuantitativas se utilizó la prueba de χ^2 (Statistix 9), teniendo significancia los valores $p < 0.05$.

2.8 CRITERIOS DE FIABILIDAD

Para determinar los criterios de fiabilidad, se realizaron tablas de doble entrada, donde se compararon los resultados obtenidos por microscopía de frotis sanguíneo vs los obtenidos mediante la prueba de PCR. La detección directa por microscopía fue considerada como la técnica "gold standard", dado que es la tradicionalmente utilizada en el diagnóstico de una infección por *Babesia* spp (Figuroa et al 2003; Calder et al, 1996). Se evaluó el desempeño de las pruebas en términos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN). Para estimar la concordancia entre la prueba de PCR y Frotis sanguíneos se determinó el valor del coeficiente de kappa con intervalo de confianza del 95 % (IC).

3 RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 COMPARACIÓN ENTRE MICROSCOPIA ÓPTICA Y PRUEBA DE PCR

Se corroboró la presencia de parásitos intraeritrocíticos en los bovinos a partir del 5º día pos-inoculación (DPI) mediante la observación al microscopio de frotis sanguíneos.

En el cuadro 1 se muestra el porcentaje de parasitemia que se obtuvo individualmente en cada día pos-inoculación y el promedio por día, donde se puede apreciar que las mayores parasitemias se obtuvieron en los días 7, 8 y 9 PI.

Cuadro 1. Porcentaje de parasitemia y promedio por día Pos-Inoculación (DPI).

ID \ DPI	5	6	7	8	9	10	16
6	0.005	0.02	0.255	0.15	0.22	0.1	0
7	0.005	0.015	0.105	0.125	0.23	0.1	0
9	0.01	0.035	0.035	0.045	0.009	0.06	0
10	0.02	0.035	0.05	0.04	0.28	0.0318	0
12	0.01	0.075	0.095	0.125	0.04	0.05	0
13	0.005	0.02	0.075	0.075	0.025	0.11	0.01
15	0.005	0.01	0.155	0.175	0.02	0.01	0
19	0	0.005	0.01	0.01	0.039	0.005	0.01
20	0	0.015	0.015	0.1	0.02	0.005	0.015
21	0.005	0.08	0.225	0.06	0.079	0.045	0.015
22	0.01	0.04	0.08	0.075	0.075	0.01	0.005
23	0.05	0.15	0.15	0.5	0.25	0.25	0.005
25	0.005	0.005	0.14	0.015	0.25	0.05	0
28	0	0.02	0.02	0.15	0.45	0.12	0
41	0.005	0.01	0.015	0.05	0.4	0.08	0
45	0	0.005	0.05	0.15	0.054	0.008	0
46	0	0.01	0.038	0.105	0.17	0.145	0
112	0	0.01	0.115	0.02	0.05	0.005	0.01
Promedio	0.009	0.031	0.109	0.109	0.147	0.066	0.004

Se procesaron 126 muestras utilizando la prueba de PCR-vesa-1. Los resultados globales se expresan en el cuadro 2, donde se muestra el número de animales positivos por la prueba de PCR a partir del 5° día pos-inoculación (DPI).

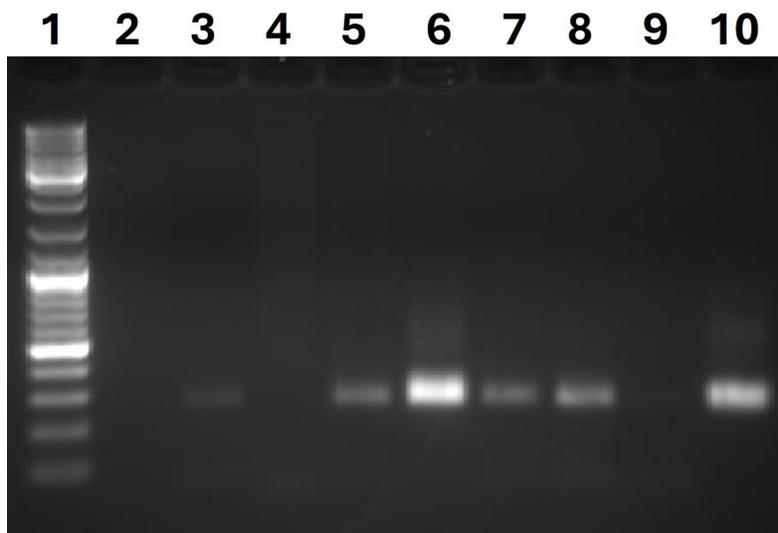
Cuadro 2. Resultados de la prueba de PCR-vesa-1.

ID \ DPI	5	6	7	8	9	10	16
6	-	-	+	+	+	+	+
7	-	-	+	+	+	-	+
9	-	-	+	+	+	+	+
10	-	+	+	+	+	+	+

12	-	+	+	+	+	-	+
13	-	-	+	+	+	+	+
15	-	-	+	+	+	-	-
19	-	-	+	+	+	+	+
20	-	-	+	+	+	+	+
21	-	+	+	+		+	-
22	-	+	+	+	+	+	-
23	-	-	+	+	-	-	+
25	-	-	-	+	+	-	-
28	-	-	+	+	+	+	-
41	-	+	+	+	-	-	-
45	-	+	+	+	+	-	-
46	+	-	+	+	+	+	+
112	-	-	+	+	+	+	+
No. de bovinos +	1	6	17	18	16	11	11

En todos los casos que hubo amplificación, se observó una banda única de aproximadamente 270 pares de bases, de manera similar a lo obtenido por Figueroa *et al.* (1992; 1993). En la Figura 1 presentan los resultados representativos del seguimiento realizado en 1 bovino.

Figura 1.- Análisis de la amplificación por PCR-*vesa-1* de muestras del Bovino número 46. Gel de agarosa al 2% teñido con 0.2% de bromuro de etidio, visualizado con luz UV. Identificación de carriles: 1) Marcador de 100 pb; 2) Día Pos-Inoculación (DPI) 0; 3) DPI 5; 4) DPI 6; 5) DPI 7; 6) DPI 8; 7) DPI 9; 8) DPI 10; 9) Control PCR negativo; 10) Control PCR positivo.



3.2 COMPARACIÓN DE LAS 2 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO: MICROSCOPIA DE FROTIS SANGUÍNEO Y PRUEBA DE PCR

Al comparar los resultados obtenidos mediante la prueba de PCR con los de microscopía de frotis sanguíneo, se obtuvo que, de 126 muestras analizadas, 73 fueron diagnosticadas como positivas a *B. bigemina* por ambas técnicas. Los animales que fueron positivos por microscopía de frotis sanguíneos se encontraban, al parecer, en un pico de la parasitemia, que hace que los niveles del parásito aumenten y puedan ser visualizados al microscopio, teniendo en cuenta la relativamente baja sensibilidad de la técnica (Bose et al, 1995; Calder et al, 1996). Las 53 muestras restantes difieren en su diagnóstico, pues 7 de las muestras resultaron positivas por PCR y negativas a la microscopía de frotis sanguíneo, y las 36 muestras restantes fueron negativas por PCR y positivas por microscopía de frotis sanguíneo.

En el primer caso, podría deberse a que estos bovinos presentaron porcentajes muy bajos de glóbulos rojos infectados para poder ser detectados mediante el examen por microscopía de frotis sanguíneo durante al menos 5 min. En el segundo caso, en el que las muestras negativas por PCR fueron positivas a microscopía de frotis sanguíneo, pudiera deberse a que el porcentaje de parasitemia que se reportó pudiera tener falsos positivos ya que en climas húmedos es común que el tiempo de secado del frotis sea

más prolongado y esto ocasiona que se formen burbujas que pueden aparentar formas inmaduras de *Babesia*. Alternativamente, y dado que los frotis fueron evaluados por microscopistas expertos, es probable que el nivel de sensibilidad analítica de la prueba de PCR sencilla no sea lo suficientemente elevado como para detectar parasitemias bajas. Si bien todos los animales inoculados fueron detectados positivos al examen microscópico, las parasitemias determinadas fueron muy bajas comparadas con los resultados obtenidos en otros experimentos (Figuroa et al, 1998; 2003; 2006). Esto, muy probablemente deriva del hecho que, en este experimento en particular, los animales fueron inoculados con un estabilizado criopreservado en nitrógeno líquido, pudiendo verse afectado el título de parásitos viables e infectantes una vez descongelado el material previo a su inoculación. Sin embargo, en general, el número de veces que la microscopía óptica de frotis detectó positivos fue siempre mayor que las muestras determinadas por PCR durante los primeros 10 días pos-inoculación. Se realizó una comparación entre las dos técnicas de diagnóstico, por día, y a partir del 5º DPI. Utilizando el método estadístico χ^2 se verificó si había diferencia significativa entre el número de positivos obtenidos con cada una de las técnicas, en el cuadro 3 se observa el porcentaje de positivos y su comparación.

Cuadro 3. Comparación del número (y porcentaje) de muestras positivas con la prueba de PCR y observación microscópica de frotis sanguíneo.

Prueba	DPI 5	6	7	8	9	10	16
PCR	1 (5.5%) a	6 (33.3%) a	17(94.4%) a	18(100%) a	16(94.1%) a	11(61.1%) a	11(61.1%) a
Frotis	12(66%) b	18(100%) b	18(100%) a	18(100%) a	18(100%) a	18(100%) a	7 (38.8%) a

Literales distintas en cada columna representan diferencia significativa ($P < 0.05$)

Se pudo establecer que a los cinco días pos-inoculación el frotis sanguíneo presentó un 66.6% de positivos (en comparación con PCR que mostró 5.5%, $p = 0.0005$), a los seis días pos-inoculación la microscopía detectó el 100% de positivos, mientras que la prueba de PCR solamente detectó un 33.3% de positividad ($p = <0.001$) lo que indica que hubo una diferencia significativa entre el diagnóstico por frotis sanguíneos y PCR para estos dos días en particular. Se demuestra así, que el número de animales detectados como positivos es dependiente de la técnica diagnóstica utilizada. Sin embargo, esto difiere de los resultados encontrados por Krause et al. (1996) donde se realizó la comparación entre las mismas técnicas en *B. microti* y en cuyo caso se

encontró que la prueba de PCR obtuvo un mayor número de resultados positivos en comparación al examen microscópico de los frotis. No obstante, este resultado puede deberse también, a que el estudio fue realizado durante la fase aguda de la enfermedad, período en el cual las parasitemias fluctúan constantemente, independientemente de la variabilidad a infección, innata o adquirida, observada en los animales experimentalmente infectados (Allred, 2007).

Se realizó adicionalmente la comparación de los resultados un día posterior al tiempo de incubación, escogido al azar (día 16 PI), en donde se observó que la prueba de PCR detectó un mayor número de positivos y aunque no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) el resultado coincide con los resultados obtenidos por Figueroa (1992), en donde a pesar de las bajas parasitemias ($<0.01\%$) se detectaba un mayor número de positivos a PCR que a microscopía óptica. Se puede especular entonces que, en el tiempo posterior a la incubación, una vez transcurrida la parte inicial de la fase aguda de la enfermedad, la prueba de PCR puede detectar un mayor número de animales positivos a *B. bigemina*.

Por lo tanto, y de acuerdo con los resultados anteriores, el examen microscópico de los frotis sanguíneos tiene mayor sensibilidad analítica para detectar la infección en la fase temprana de la enfermedad, por lo menos a nivel experimental. Esto coincide con otros estudios, en donde se detectan animales positivos por primera vez hasta el décimo día PI y con parasitemias de 0.014 y 0.038%. En cambio, en el caso de los días posteriores, la técnica de PCR detectó mayor número de animales positivos en comparación con el examen microscópico de los frotis, cuando se determinaron parasitemias de $\leq 0.01\%$, consideradas como bajas (Figueroa et al., 1992).

En estudios anteriores se ha determinado que la prueba de PCR asociada a la detección del producto amplificado con una sonda colorimétrica específica puede detectar hasta una parasitemia de 0.00001% (Figueroa y Álvarez, 2003; Figueroa et al., 1993). Sin embargo, en el presente estudio, en el que solo se analiza el resultado de PCR sin hibridación con sonda específica se pudo observar que cuando se determina una parasitemia promedio de 0.00861%, sólo el 5.5% de los animales probados es detectado por la prueba de PCR sencilla. En contraste, cuando las parasitemias son del orden de 0.031% la prueba de PCR detecta un 33.3% de animales positivos, mientras que con parasitemias relativamente más elevadas (de 0.065%) se detecta hasta el 61.1% de animales positivos en la prueba de PCR sencilla. A diferencia de lo anterior, cuando se analiza el período comprendido entre el 7º y 9º día pos-inoculación, se pudo determinar que la técnica de PCR tiene un 100% de capacidad para detectar los animales infectados verdaderos positivos (con parasitemias estimadas entre 0.109 y 0.147%); y a los 16 días

PI con una parasitemia promedio de 0.0038% se detectó un mayor número de positivos, aunque no hubo diferencia significativa ($p = 0.182$).

3.3 DETERMINACIÓN DE CRITERIOS DE FIABILIDAD

Se determinaron las características de las pruebas mediante un cuadro de contingencia de 2x2. Como muestras negativas, se utilizaron las muestras obtenidas en la fecha previa a la inoculación experimental en donde los animales muestreados eran negativos a la infección.

Cuadro 4. Comparación de la prueba de PCR con frotis delgados teñidos con Giemsa para 18 muestras positivas y 18 negativas a infección por *B. bigemina*.

Prueba diagnóstica	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor predictivo positivo (%)	Valor predictivo negativo (%)
PCR	100	94.44	94.7	100
Microscopía de Frotis	100	100	100	100

En cuanto a los criterios de fiabilidad (Cuadro 4), la técnica de microscopía de frotis sanguíneo presentó sensibilidad y especificidad de 100%, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de 100%, es decir, utilizando esta técnica se clasificaron correctamente como enfermos al 100% de los que padecieron babesiosis y como sanos al 100% de los que no se encontraban enfermos de babesiosis. En cuanto a los valores predictivos, ellos significan que en un 100% de los bovinos con babesiosis finalmente se confirmó la presencia de *B. bigemina*, mientras que en los animales negativos (muestreados previamente a la inoculación) en los que no se detectó la presencia de la enfermedad un 100% estaba efectivamente sanos. Estos resultados no difieren mucho con los resultados reportados por Figueroa *et al.* (1996), donde reporta valores de sensibilidad y especificidad de 93,8 y 100%, respectivamente y valores predictivos positivo y negativo de 100% y 97%, respectivamente.

La microscopía de frotis sanguíneo con tinción de Giemsa es el método más común para identificar *Babesia spp.* en animales con infección clínica. Esta técnica permite diagnosticar principalmente a los animales en fase aguda (Bose *et al.* 1995; Figueroa & Buening, 1995). La prueba de PCR es una técnica molecular de comprobada elevada sensibilidad y especificidad (Calder *et al.*, 1996). En el cuadro 4 se muestra que se obtuvo un 100% de sensibilidad y un 94.44% de especificidad, el valor predictivo positivo fue de 94.7% y el valor predictivo negativo de 100%, es decir, utilizando esta técnica se clasificaron correctamente como enfermos al 94.4% de los que padecieron babesiosis y

como sanos al 100% de los que no se encontraban enfermos de babesiosis. En cuanto a los valores predictivos, ellos significan que en un 94.7% de los bovinos con babesiosis finalmente se confirmó la presencia de *B. bigemina*, mientras que los animales en los que no se detectó la presencia de la enfermedad, un 100% estaba efectivamente sanos. Estos resultados difieren ligeramente con los resultados reportados por Krause *et al* (1996), donde reporta valores de sensibilidad y especificidad de 95% y 100%, respectivamente, y valores predictivos positivo y negativo de 100% y 83%, respectivamente, para el diagnóstico de *B. microti*. Estos resultados permiten establecer que la prueba de PCR, con los oligonucleótidos específicos de gene y especie, es una técnica aceptable para el diagnóstico de *Babesia spp.*, y no solo de *B. bigemina*. Con los resultados de ambas técnicas diagnósticas se determinó un coeficiente de concordancia de 0.97 que lo ubican como muy bueno, esto puede interpretarse como que ambas pruebas tienen una utilidad similar para efectos de diagnóstico de *B. bigemina* en los casos agudos de la enfermedad.

No obstante que la prueba de PCR presenta una sensibilidad y especificidad similar a la de la prueba estándar de oro (Microscopía óptica), el examen de frotis demostró identificar un mayor número de animales positivos verdaderamente positivos durante la incubación de la enfermedad. Sin embargo, es importante enfatizar que esta prueba requiere de un microscopista experimentado, de lo contrario podrían identificarse algunos casos como falsos positivos, pero más importante aún, la inadecuada identificación de formas o estadios del parásito (no clásicas para un microscopista carente de experiencia), podría dar como resultado la asignación de falsos negativos, con la consecuente falta de oportunidad para un tratamiento adecuado de un animal infectado. Se ha cuestionado el costo elevado de la prueba de PCR para uso rutinario en un laboratorio de diagnóstico, haciendo todavía más viable el uso del frotis sanguíneo para el diagnóstico de babesiosis causada por *B. bigemina* durante las etapas tempranas de la enfermedad. Sin embargo, en la medida en que se abaten los costos de los materiales y reactivos para la prueba de PCR, ésta es una técnica que bien podrá utilizarse como complemento de diagnóstico en el caso de animales con casos agudos y más importante, casos subclínicos, los cuales, por estar en la fase aguda, pero sin manifestación abierta de signos clínicos de enfermedad, podrían dar falsos negativos debido a la fluctuación de las parasitemias que se reportan durante esta etapa (Calder *et al.*, 1996). Además, la prueba PCR puede ser recomendada para determinar la presencia del parásito en animales de importancia reproductiva como sementales y animales donadores de embriones, cuando se requiera el traslado de los mismos, y también puede ser de gran auxilio en los monitoreos de programas de

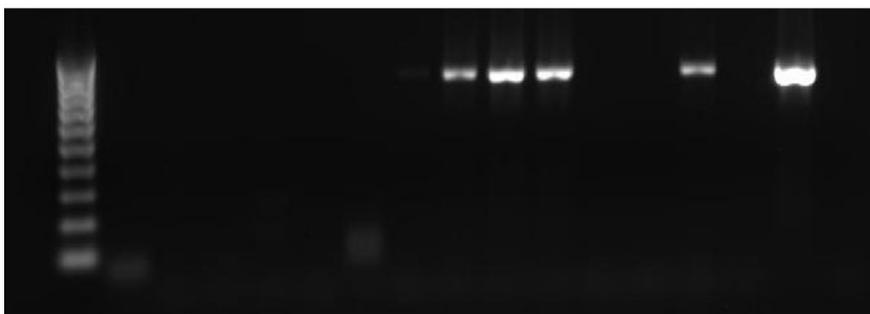
lucha integrada de garrapatas y enfermedades asociadas. Sin embargo, y a pesar del relativamente elevado costo, el uso de la prueba de PCR resulta particularmente apropiada y especialmente se aplica en proyectos de investigación para el desarrollo de estudios epidemiológicos a gran escala (OIE, 2021; Ganzinelli et al, 2020). Esto, derivado del hecho de que, con los nuevos procedimientos y reactivos comercialmente disponibles, se pueden procesar literalmente cientos, si no miles, de muestras sanguíneas en un solo día. A diferencia de la microscopía óptica, en la que un experto microscopista puede solo analizar, objetiva y concienzudamente, una treintena de frotis sanguíneos en una jornada (Figuroa et al, 1996).

3.4 COMPARACIÓN ENTRE LAS PRUEBAS DE PCR CON OLIGONUCLEÓTIDOS PARA AMPLIFICAR *SBP-4* O *VESA-1*

Amplificación del gen *sbp-4*: Mediante la técnica de PCR se amplificaron fragmentos de la región codificante del gen *sbp-4* de *B. bigemina*, obteniéndose un amplicón del tamaño esperado, aproximadamente 830 pb (Figura 2). La prueba de PCR para el gen *sbp-4*, permite identificar infección en animales probados a partir del día 10 PI (ver resultado representativo, Figura 2).

Figura 2: Análisis de la amplificación por PCR-*sbp-4* de muestras del Bovino 23: Gel de agarosa al 2% teñido con 0.2% de bromuro de etidio, visualizado con luz UV. Identificación de carriles: 1) Marcador de 100 pb; 2 - 14) Día Pos-Inoculación (DPI) 0 - 13; 15) Control PCR negativo; 16) Control PCR positivo.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



Se comparó una fecha pos-inoculación seleccionada al azar (Cuadro 5) con ambas pruebas de PCR dando como resultado para el gen *vesa-1* un total de 14 positivos de 17 muestras analizadas, mientras que en el caso del gen *sbp-4* se obtuvieron 15 positivos. Probablemente la capacidad del PCR-*sbp-4* para detectar un mayor número de positivos que el PCR-*vesa-1* se deba a que el primero tiene un ciclo de 45 repeticiones de ciclado, por lo que puede realizar un mayor número de copias del ADN del parásito.

Cuadro 5: Resultados de PCR con los genes *sbp-4* y *vesa-1* de muestras del día 9 PI.

PCR / ID	6	7	9	10	12	13	15	19	20	22	23	25	28	41	45	46	112
<i>vesa-1</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>sbp-4</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+

4 CONCLUSIONES

Las pruebas diagnósticas utilizadas para identificar *B. bigemina* tienen características particulares, dentro de estas características cabe mencionar el funcionamiento, la sensibilidad, la complejidad y el costo de cada una. Las ventajas y desventajas de cada prueba, principalmente en lo que se refiere a los criterios de fiabilidad, deben tomarse en cuenta al momento de seleccionar una técnica diagnóstica para uso rutinario. El objetivo general de esta investigación fue el de evaluar que técnicas diagnósticas son más convenientes para el diagnóstico de *B. bigemina*. La técnica de microscopía de frotis sanguíneo, por su valor predictivo positivo alto, se puede usar para confirmar la presencia de *Babesia*, cuando no se disponga de técnicas de alta sensibilidad y especificidad como son la PCR, y cuando se trate particularmente de casos agudos de la enfermedad. Se detectó una diferencia significativa entre el diagnóstico por frotis sanguíneos y PCR para los días cinco y seis pos-infección, por lo cual se podría suponer que la técnica utilizada sí influye en la detección de la presencia o ausencia de la enfermedad en los bovinos muestreados. La prueba de PCR-*sbp-4* dio un mayor número de resultados positivos que la prueba de PCR-*vesa-1*. La prueba de PCR podría ser usada como prueba tamiz en trabajos epidemiológicos debido a su alta sensibilidad y especificidad, aunque presenta un relativamente alto costo.

Recomendaciones: Comparar por un periodo de tiempo más prolongado (fase aguda y crónica) la sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR y la microscopía de frotis. Realizar una comparación entre las pruebas de PCR-*vesa1* con PCR-*sbp-4* pero aumentando el número de ciclos para el gen *vesa1* para observar si es posible incrementar el nivel de sensibilidad sin necesidad de un PCR adicional o anidado. Por otro lado, futuros trabajos deben realizar la misma comparación, pero con PCR anidado o PCR en tiempo real para ambos genes, y con muestras de bovinos inoculados experimentalmente y en bovinos infectados naturalmente, para estimar su verdadero potencial diagnóstico, determinando el porcentaje de sensibilidad y especificidad de cada prueba. Utilizar la técnica de PCR anidado como una técnica de diagnóstico al adquirir animales para experimentación que requieran estar negativos a *Babesia spp.*

REFERENCIAS

- Adams, L. G., & Todorovic, R. A. (1974). The chemotherapeutic efficacy of imidocarb dihydrochloride on concurrent bovine anaplasmosis and babesiosis. *Tropical Animal Health and Production*. 6(2):71-78.
- Allred, D.R. (2007). Dynamics of anemia progression and recovery in *Babesia bigemina* infection is unrelated to initiating parasite burden. *Veterinary Parasitology* 146:170–174.
- Álvarez, J. A., Rojas, C., & Figueroa, J. V. (2019). Diagnostic tools for the identification of *Babesia* sp. in persistently infected cattle. *Pathogens*, 8(3), 143. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030143>
- Álvarez, J. A., Rojas, C., & Figueroa, J. V. (2020). An Overview of Current Knowledge on in vitro *Babesia* Cultivation for Production of Live Attenuated Vaccines for Bovine Babesiosis in Mexico. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 364. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00364>
- Álvarez, J.A., J.A. Ramos, E.E. Rojas, et al. (2004). Field challenge of cattle vaccinated with a combined *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* frozen immunogen. *Annals New York Academy Sciences*. 1026: 277-283.
- Ávila T, S. (2009). *Estado actual de la ganadería bovina, comercialización, consumo e importancia de productos lácteos en México*. México: Manual moderno.
- Birkenheuer J.A., Levy G.M., Breitschwerdt B.E. (2003). Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *Journal of Clinical Microbiology* 41(9): 4172-4177.
- Bock R., Jackson L., De Vos A., Jorgensen W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology* 129(suppl): S247-S268.
- Brayton, K.A., Lau, A.O.T., Herndon, D.R., Hannick, L., Kappmeyer L.S., et al. (2007). Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. *PLoS Pathogens* 3(10): e148. doi:10.1371/journal.ppat.0030148.
- Böse, R., Jorgensen, W. K., Dalgliesh, R. J., Friedhoff, K. T., y de Vos, A. J. (1995). Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 57(1-3), 61–74. Doi:10.1016/03044017(94)03111-9.
- Calder J A, Reddy G R, Chieves L, Courtney C H, Littell R, Livengood JR, Norval R A, Smith C, Dame JB (1996). Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. *Journal Clinical Microbiology* 34(11):2748-2755.
- Callow, L. (1968). The infection of *Boophilus microplus* with *Babesia bigemina*. *Parasitology*, 58: 663-670.
- Cantó G.J., Figueroa J.V., Ramos J.A., Álvarez J.A., Mosqueda J.J., Vega C.A. (1999). Evaluación de la patogenicidad y capacidad protectora de un inmunógeno fresco combinado de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*. *Veterinaria México*. 30:215-220.
- Figueroa, J. V., y Alvarez, J. A. (2003). Investigaciones sobre la aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico y control de la babesiosis bovina. *Ciencia Veterinaria*, 9:76-94.
- Figueroa, J., Álvarez, J., Cantó, G., Ramos, J., Mosqueda, J. & Buening, G. (1996). Comparative sensitivity of two tests for the diagnosis of multiple hemoparasite infection of cattle. *Annals New York Academy Sciences*. 791:117-127.

Figuerola J.V., Chieves L.P., Johnson G.S., y Buening G.M. (1992). Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 3(10):2576-2582.

Figuerola J.V., Chieves L.P., Johnson G.S., y Buening G.M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Veterinary Parasitology* 50:69-81.

Ganzinelli, S., Benitez, D., Gantuya, S., Guswanto, A., Florin-Christensen, M., Schnittger, L., Igarashi, I. (2020). Highly sensitive nested PCR and rapid immunochromatographic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in a cattle herd with acute clinical and fatal cases in Argentina. *Transboundary & Emerging Diseases*. 67 Suppl 2:159-164. doi: 10.1111/tbed.13435.

Krause P.J., Telford S., Spielman A., Ryan R., Magera J., Rajan T.V., Christianson D., Alberghini T.V., Bow L., Persing D. (1996). Comparison of PCR with blood smear and inoculation of small animals for diagnosis of *Babesia microti* parasitemia. *Journal of Clinical Microbiology*. 34(11): 2791-2794.

Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich III, A. R., Lom, J., Lynn, Merinfeld, E.G., Page, F.C., Polanski, G., Sprage, V., Vavra, J. Wallace, F.G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *Journal Protozoology*. 27:37-58.

McCosker, P.G. (1981). The global importance of babesiosis. In Ristic, M. Kreier, J.P. (eds.) *Babesiosis*. Academic Press, N.Y. pp. 1-24.

Mosqueda, J., Hernandez-Silva, D.J., Ueti, M.W., Cruz-Reséndiz, A., Marquez-Cervantez, R., Valdez-Espinoza, U.M., Dang-Trinh, M.A., Nguyen, T.T., Camacho-Nuez, M., Mercado-Uriostegui, M.A., Aguilar-Tipacamú, G., Ramos-Aragon, J.A., Hernandez-Ortiz, R., Kawazu, S.I., Igarashi I. (2023). Spherical Body Protein 4 from *Babesia bigemina*: A novel gene that contains conserved B-cell epitopes and induces cross-reactive neutralizing antibodies in *Babesia ovata*. *Pathogens*, 22;12(3):495. doi: 10.3390/pathogens12030495.

OIE (2021). Babesiosis bovina., Capítulo 3.4.2. Manual de la OIE sobre animales terrestres. [www.woah.org/fileadmin/Health_standards/tahm/3.04.02_Babesiosis%20bovina.pdf](http://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.02_Babesiosis%20bovina.pdf)

OIE (2023). Validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas de animales terrestres. Capítulo 1.1.6. Manual de la OIE sobre animales terrestres. https://www.woah.org/fileadmin/Health_standards/tahm/1.01.06_Validación.pdf

O'Connor R.M., Lane T.J., Stroup S.E., Allred D.R. (1997). Characterization of a variant erythrocyte surface antigen (VESA1) expressed by *Babesia bovis* during antigenic variation. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 89: 259-270.

Pérez R.J.J., Uriostegui, V.P., Alvarez, M.J.A., Rojas MC., Zuniga, G.V.M., Figuerola M.J.V. (2012). *Babesia bigemina*: Initial gene identification by Expressed Sequence Tags (EST) analysis of the intraerythrocytic stage. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3(1):61-87.

Rojas, R.E.E., Mosqueda, J.J., Álvarez, M.J.A., Hernández O.R., Ramos, A.J.A., Cantó, A.G.J., Vega, M.C.A., Figuerola, M.J.V. (2011). Transmissibility of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* attenuated strains by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 2(3):267-281.

Rojas-Martínez, C., Rodríguez-Vivas, R.I., Figuerola-Millán, J.V., Bautista-Garfias, C.R., Castañeda-Arriola, R.O., Lira-Amaya, J.J., Uriostegui-Vargas, P., Ojeda-Carrasco, J.J., Alvarez-Martinez, J.A. (2018). Bovine babesiosis: Cattle protected in the field with a frozen vaccine containing *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* cultured in vitro with a serum-free medium. *Parasitology International*, 67(2):190-195. doi: 10.1016/j.parint.2017.11.004.

Sachman R.B., Lozano, L., Lira, J.J., Martínez, G., Rojas, C., Álvarez, A., Figueroa, J.V. (2021). Comparative genomic study of attenuated and virulent strains of *Babesia bigemina*. *Pathogens*. 10:318. doi: 10.3390/pathogens10030318.

Santamaria, R.M., Lira, J.J., Vargas, P., Alvarez, J.A., Rojas, C., Figueroa, J.V. (2020). Validation of an indirect ELISA using recombinant proteins as antigen to identify animals exposed to *Babesia bigemina*. *Transboundary & Emerging Diseases*, 67 Suppl 2:201-207. doi: 10.1111/tbed.13522.

Santamaria, R.M., Estrada, K., López, M.E., Rojas, E., Martínez, G., Alcalá, Y., Rojas, C., Álvarez, J.A., Lira, J.J., Santamaria, T.V., Sánchez-Flores A., Figueroa, J.V. (2024). Comparative transcriptome analysis of *Babesia bigemina* attenuated vaccine and virulent strains of Mexican origin. *Vaccines* (Basel). 12(3):309. doi: 10.3390/vaccines12030309.

Solis, S. (1991). Epidemiología de garrapatas *Boophilus* y *Amblyomma* en México. *Memorias del II Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten*, (págs. 19-30). 9, 10 y 11 de Octubre de 1991.Oaxtepec, Morelos, México.

Solorio-Rivera, J.L., & Rodriguez-Vivas, R.I. (1997). Epidemiología de la babesiosis bovina I. Componentes epidemiológicos. *Revista Biomedicina*. 8: 38-39.

Terkawi, M. A., Seuseu, F. J., Wibowo, P. E., Huyen, N. X., Minoda, Y., AbouLaila, m., Kawai, S., Yokoyama, N., Xuan, X., Igarashi, I. (2011). Secretion of a new spherical body protein of *Babesia bovis* into the cytoplasm of infected erythrocytes. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 178:40-45.

Toussaint, M. (1905). *Piroplasmosis bigeminum* in México. Boletín del Instituto patológico, Descrito por el M.V.Z. Eutimio López Vallejo in 1910. Algunas enfermedades microbianas y parasitarias. Estación Agrícola Central, Boletín No. 4.

SOBRE O ORGANIZADOR

EDUARDO EUGENIO SPERS realizou pós-doutorado na Wageningen University (WUR), Holanda, e especialização no IGIA, França. Possui doutorado em Administração pela Universidade de São Paulo (USP). Foi Professor do Programa de Mestrado e Doutorado em Administração e do Mestrado Profissional em Comportamento do Consumidor da ESPM. Líder do tema Teoria, Epistemologia e Métodos de Pesquisa em Marketing na Associação Nacional de Pós-Graduação e Pesquisa em Administração (ANPAD). Participou de diversos projetos de consultoria e pesquisa coordenados pelo PENSA e Markestrat. É Professor Titular no Departamento de Economia, Administração e Sociologia, docente do Mestrado em Administração e Coordenador do Grupo de Extensão MarkEsalq no campus da USP/Esalq. Proferiu palestras em diversos eventos acadêmicos e profissionais, com diversos artigos publicados em periódicos nacionais e internacionais, livros e capítulos de livros sobre agronegócios, com foco no marketing e no comportamento do produtor rural e do consumidor de alimentos.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Agricultural systems 17
Animal welfare 187, 189, 190, 200, 203, 205, 208
Atopic Dermatitis 178, 179, 185, 186
Atributos 216, 217, 220, 221, 224, 225, 226

B

Babesia bigemina 146, 147, 148, 149, 150, 152, 153, 165, 166, 167
Bagre armado 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69
Belgrade 45, 178, 180, 187, 189, 194, 195, 197, 198, 199, 200, 201, 203, 204, 206, 207, 210, 211, 212, 213, 214
Biodiversidade 1, 2, 4, 6, 109, 110
Buffel Z115 71, 75, 77, 78, 81, 83

C

Cana-de-açúcar 96, 97, 99
Carbon farming 17, 28, 30
Chemical composition 32, 33, 35, 37, 40, 45
Circuitos curtos de proximidade 86, 88, 93, 94
Citrus latifolia 101, 102, 107
Conifers 32, 33, 34, 37, 40, 41, 43, 44, 46, 50
Conservation 108, 109, 112, 113, 120, 122, 123, 133, 134, 135, 138, 141, 142, 144
Contamination control 187
COVID-19 4, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95

D

Deciduous trees 32, 33, 37, 40, 41, 43
Deforestation 108, 109, 111, 112, 119, 120, 121, 122, 123, 126, 127, 131, 132, 133, 138, 139, 142, 143, 145
Desempenho 96, 97
Diagnóstico 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 158, 159, 162, 164, 165, 166
Dilemma 108, 109, 113, 134, 141
Diseño 71, 72, 74, 216, 217, 218, 219, 221, 223, 224, 225, 226, 227
Dog 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 187, 188, 189, 192, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 206, 207, 208, 209, 210, 212, 213, 215

E

Elaeisfarming 109, 110, 114, 115, 123, 125, 127, 129, 130, 131, 133

Epidemiology 187, 209

F

Fertilización 70, 71, 72, 73, 75, 76, 79,

Fitohormonas 4, 70, 71, 72, 74, 75, 77, 78, 80, 81, 82, 83, 84, 85

Food allergens 178, 179, 180, 181, 184

Forest dendromass 47, 48

Forestry offsets 17

Frotis 146, 147, 148, 150, 151, 152, 154, 155, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164

G

Genótipos 76, 96, 97, 98, 99

Greenhouse gas mitigation 17

I

Impacts 29, 52, 109, 111, 116, 117, 118, 121, 122, 125, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 144, 145, 207

Inhalant allergens 178, 179, 180, 183

L

Legislative enforcement 187

M

Manejo 1, 2, 4, 6, 7, 8, 14, 15, 16, 69, 74, 81, 82, 83, 84, 218

Milk quality 169, 175

Modelo de studio 62

O

Ozone therapy 169, 174, 175, 176

P

PCR 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166

Peletizado 217

Persian lime 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106

Plan de acción 61, 62, 68
Plantas de cobertura 1, 9, 10, 11, 12, 15, 16
Porcino 216, 217, 219, 221, 226, 227
Práticas sostenibles de pesca 61, 62
Preservação 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 14, 90
Processing technology 48, 50, 56
Produção local 86, 90
Produtividade 1, 3, 4, 6, 9, 10, 13, 14, 16, 96, 97, 98, 99
Promoción 61, 62, 67, 68, 69
Public education 187
Public hygiene 187

R

Rentabilidad 70, 71, 72, 83, 84, 218

S

SAT 178, 184
Sectorial spot 101, 102
Segurança alimentar 86, 88, 110
Semilla 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85
Stray dogs 187, 188, 189, 197, 198, 199, 201, 203, 204, 205, 206, 207, 214
Structural characteristics 33
Subclinical mastitis 169, 170, 171, 173, 174
Sustentabilidade 1, 2, 6, 7, 13, 89, 94, 110

T

Tahiti lime 101, 107
Triturado 216, 217, 223

U

Urban health 187

W

Wood greenery 32, 33, 35, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 50, 53, 54, 55, 56, 60

Z

Zoonotic parasites 187, 188, 189