



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Valoración de la viabilidad de *Sarcocystis spp* en ganado ovino tras tratamiento térmico

Evaluation of the viability of *Sarcocystis spp* in sheep after heat treatment

Autor/es

Paula Juan Puente

Director/es

Juan Antonio Castillo Hernández  
María Jesús García Salinas

Facultad de Veterinaria

2020

---

## ÍNDICE

Índice .....	1
Resumen / Abstract .....	2
Introducción .....	4
3.1. Etiología .....	4
3.2. Ciclo biológico .....	5
3.3. Sarcocistosis en la especie ovina .....	7
3.4. Métodos de identificación .....	8
3.4.1. Identificación morfológica .....	9
3.4.2. Tinciones vitales .....	12
3.5. Aplicación de la congelación doméstica como tratamiento térmico .....	14
Justificación y objetivos .....	16
Metodología .....	17
5.1. Búsqueda bibliográfica .....	17
5.2. Muestras .....	17
5.2.1. Clasificación y tratamiento térmico .....	17
5.3. Técnicas .....	18
5.3.1. Digestión péptica .....	18
5.3.2. Tinciones vitales .....	20
5.4. Estudio estadístico de los resultados .....	22
Resultados y discusión .....	23
Conclusiones / Conclusions .....	28
Valoración personal .....	28
Bibliografía .....	29

## RESUMEN

La sarcocistosis en ovinos adultos causa una importante pérdida económica por decomiso de las canales con quistes de *Sarcocystis spp.* y por el momento no existe ningún control de la enfermedad ni un procedimiento de laboratorio que compruebe su viabilidad. Una opción para poder evaluar la viabilidad de los parásitos en la carne son las tinciones vitales. Hasta donde sabemos, pocos estudios han comprobado la viabilidad de los bradizoitos de *Sarcocystis spp.* mediante tinciones vitales después de aplicarle un tratamiento térmico. Por ello, el objetivo de este TFG es evaluar y comprobar la viabilidad de los bradizoitos de *Sarcocystis spp.* presentes en canales ovinas tras un tratamiento térmico utilizando la tinción Azul de Tripán en comparación con la doble tinción de fluorescencia (Ioduro de Propidio y Diacetato de Carboxifluoresceína).

Para la realización de este TFG se han analizado 50 muestras de carne decomisada de ovino por presencia de quistes de *Sarcocystis spp.*, procedentes de un matadero de Ciudad Real. Estas muestras se someten a una congelación doméstica a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24, 48, 72 o 96 horas y posteriormente se les aplica una digestión péptica. Una vez obtenidos los bradizoitos, se tiñen con ambas tinciones y se calcula la viabilidad.

Como resultado se obtiene una buena correlación entre las dos tinciones y se comprueba que se produce una significativa reducción de la viabilidad cuando se congelan a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 48 y 96 horas. Por tanto, ambas tinciones son métodos eficaces para la determinación de la viabilidad en *Sarcocystis* y la congelación doméstica a  $-20^{\circ}\text{C}$  es un método eficaz para inactivar los bradizoitos de *Sarcocystis* en la carne cruda de ovino. Lo ideal sería congelarla entre 48 y 96 horas o más.

**Palabras clave:** *Sarcocystis* en ovino, tinciones vitales, viabilidad, Azul de tripán, Doble tinción de fluorescencia, congelación doméstica, tratamiento térmico.

## ABSTRACT

**Evaluation of the viability of *Sarcocystis spp.* in sheep after heat treatment.**

Sarcocystosis in adult sheep causes a significant economic loss through the confiscation of carcasses containing *Sarcocystis spp.* cysts and there is currently no control of the disease or laboratory procedure to test its viability. One way of evaluating the viability of the parasites in meat is through vital staining. To our knowledge, few studies have proved the viability of *Sarcocystis spp.* bradyzoites by vital staining after heat treatment. Therefore, the aim of this Final Degree Project is to evaluate and check the viability of *Sarcocystis spp.* bradyzoites present in sheep carcasses after heat treatment using Trypan Blue staining compared to double fluorescence staining (Propidium Iodide and Carboxifluorescein Diacetate).

To carry out this Final Degree Project, 50 samples of seized sheep meat have been analysed for the presence of *Sarcocystis spp.* cysts, coming from a slaughterhouse in Ciudad Real. These samples were subjected to a domestic freezing at -20°C for 24, 48, 72 or 96 hours and then they were subjected to a pelvic digestion. Once the bradyzoites have been obtained, they are stained with both stains and the viability is calculated.

As a result, a good correlation is obtained between the two stains and it is proved that a significant reduction in viability occurs when they are frozen at -20°C for 48 and 96 hours. Therefore, both stains are effective methods for determining viability in *Sarcocystis* and domestic freezing at -20°C is an effective method for inactivating *Sarcocystis* bradyzoites in raw sheep meat. Ideally, it should be frozen for 48 to 96 hours or more.

**Keywords:** Sarcocystis in sheep, vital staining, viability, Trypan Blue, double fluorescence staining, domestic freezing, heat treatment.

## INTRODUCCIÓN

*Sarcocystis spp.* es un parásito unicelular (protozoo) caracterizado por la formación de quistes principalmente en los músculos estriados de los mamíferos, las aves y los animales poiquilotérmicos (Verma et al., 2017).

Estos quistes fueron descritos por primera vez en 1843 por Miesher en el músculo esquelético de un ratón (los que posteriormente fueron nombrados túbulos de Miesher), y en 1986 por Kühn en el cerdo, quien nombró al organismo *Synchytrium miescherianum*. Sin embargo, no era el género correcto, así que Lankester introdujo finalmente el nombre de *Sarcocystis* (Levine, 1986).

### 1.1. ETIOLOGÍA

Levine en 1986 estableció para el género *Sarcocystis* la siguiente clasificación taxonómica que se mantiene en la actualidad (Dubey et al., 2016a): Phylum *Apicomplexa*, Clase *Sporozoa*, Orden *Eucoccidiorida*, Suborden *Eimeriorina*, Familia *Sarcocystidae*, Subfamilia *Sarcocystinae*.

El género *Sarcocystis* presenta un ciclo indirecto en el que intervienen dos hospedadores con relación predador-presa, donde el predador (carnívoro) actúa como hospedador definitivo (HD) y la presa (herbívoro), como hospedador intermediario (HI) (Hernández Rodríguez et al., 1999).

El ganado ovino (*Ovis aries*) actúa de HI principalmente en 4 especies de *Sarcocystis*:

*Sarcocystis tenella* (sinónimo *S. ovis*) fue descrita por primera vez por Railliet y Moulé en 1886 y sus HD son el perro (*Canis familiaris*), el coyote (*Canis latrans*) y el zorro rojo (*Vulpes vulpes*) (Dubey et al., 2016a). Se encuentra en quistes microscópicos localizados en los músculos estriados, incluidos el corazón y la lengua, y en el SNC (Dubey et al., 1982).

*Sarcocystis arieticanis* fue descrita por primera vez en 1985 por Heydorn, su HD es el perro (*Canis familiaris*) y forma quistes microscópicos que se localizan en músculo estriado (Dubey et al., 2016a).

*Sarcocystis gigantea* (sinónimo *S. ovifelis*) fue descrita por Railliet en 1886 y Ashford en 1977 y su HD es el gato (*Felis catus*). Se encuentra en forma de quistes microscópicos y macroscópicos sobre todo en ovejas viejas, localizados principalmente en los músculos del esófago, la laringe y la lengua y, en menor medida, en el diafragma y el resto de la canal (Dubey et al., 2016a).

Por último, *Sarcocystis medusiformis*, descrita en 1979 por Collins, Atkinson y Charleston, forma quistes macroscópicos y microscópicos en el diafragma, los músculos abdominales y el resto de la canal (Dubey et al., 2016a).

Además de las principales, tal y como indica Dubey et al. (2016a) se han reportado otras especies encontradas de forma inusual en el ganado ovino: *S. mihoensis* (Saito et al., 1997), *S. gracilis* (Giannetto et al., 2005) y *S. microps* (Wang et al., 1988).

En cuanto a prevalencias, *S. tenella* es la más frecuente en España, seguida por *S. gigantea*. *S. arieticanis* es la menos frecuente (Hernández Rodríguez et al., 2003) y *S. medusiformis* no se ha descrito en Europa (Tenter, 1995; Dubey et al., 2016a). Según el estudio realizado por Martínez-Navalón et al. (2012), se detectaron quistes macroscópicos en el 12% de las ovejas del 60% de los rebaños analizados, siendo la prevalencia de rebaños de rango medio e intercuartil del 17% y del 6 al 33%, respectivamente.

## 1.2. CICLO BIOLÓGICO

El género *Sarcocystis* sigue un ciclo coccidiano (Figura 1), caracterizado por las fases de esquizogonia (fase de multiplicación asexual en el HI), la cual termina con la formación de los quistes, gametogonia (fase de multiplicación sexual en el HD) y esporogonia (fase de multiplicación asexual en HD). A continuación, se describen cada una de ellas:

### Esquizogonia

Ocurre en el ganado ovino tras ingerir ooquistes esporulados o esporoquistes libres que ha eliminado el HD (perro, gato), presentes en el agua o pastos contaminados. Los esporozoitos se liberan en el intestino delgado del HI (ovino), donde migran a la mucosa y submucosa en busca de capilares. La fase proliferativa o de esquizogonia se lleva a cabo en las células epiteliales de los vasos sanguíneos.

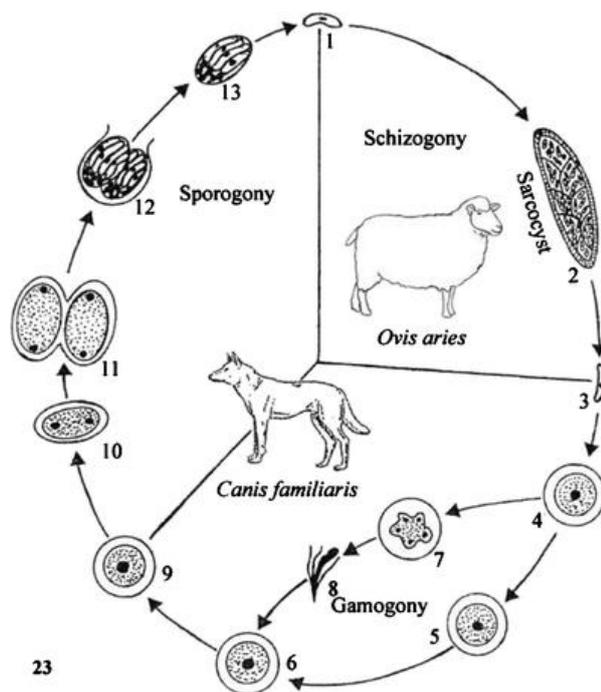
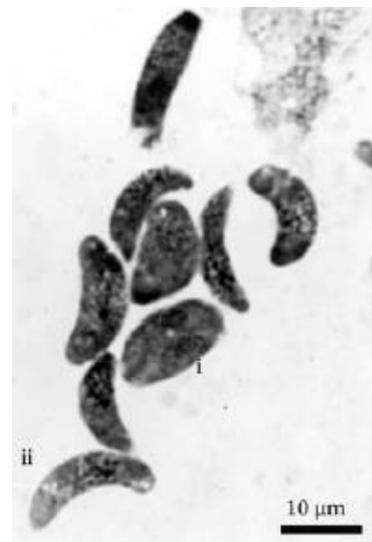


Figura 1. Ciclo biológico de *Sarcocystis arieticanis*. Original de Al Quraishy et al. (2014).

Por lo general, en los rumiantes, las especies de *Sarcocystis* realizan dos generaciones de esquizontes (Dubey y Lindsay, 2006), en diferentes localizaciones dependiendo de la especie: *S. tenella* realiza la primera en las arterias y arteriolas de todo el cuerpo (Heydorn y Karaer, 1986), a diferencia de *S. arieticanis* que la realiza en las arterias mesentéricas y de los linfonodos mesentéricos (Heydorn, 1985). En ambos casos, la segunda generación de esquizontes se localiza en los capilares sanguíneos de otros órganos, con preferencia en el glomérulo renal (Dubey y Lindsay, 2006). En el caso de *S. gigantea* sólo se ha demostrado una generación de esquizontes, la cual se localiza en capilares y arteriolas del pulmón, riñón y cerebro (Obendorf y Munday, 1986). De cada generación de esquizontes se obtienen merozoitos mediante endopoligenia (Dubey y Lindsay, 2006).

### Formación de sarcoquistes

Los merozoitos de segunda generación migran a las células musculares (musculo esquelético de contracción voluntaria e involuntaria: esofágico y cardíaco principalmente, también en lengua, diafragma, intercostales y músculos de la cara), fibras de Purkinje o SNC (Hernández Rodríguez, et al., 1999). El merozoito inicia la formación del sarcoquiste cuando, en la célula muscular o nerviosa, es rodeado por una vacuola parasitófora (a diferencia de los esquizontes, donde no ocurre) y se transforma en metrocito. Los metrocitos son células de forma redondeada-ovalada (Figura 2) que se dividen sucesivamente mediante endodiogenia hasta producir los bradizoitos, la forma infectante del HD (perro y gato). Los bradizoitos tienen forma de plátano (Figura 2) y conforme se acumulan, se produce la maduración del quiste (Dubey et al., 2016a).



**Figura 2.** *Sarcoquiste maduro con bradizoitos (ii) y un metrocito (i) con 2 bradizoitos formándose en su interior (tinción Giemsa). Original de Dubey, J.P. (1982). Obtenido de Dubey et al. (2016a) pág. 21.*

### Gametogonia

Ocurre en el HD (perro y gato) después de ingerir carne cruda de ovino con sarcoquistes maduros, infectantes aproximadamente 75 días después de la infección del HI (ovino) (Dubey y Lindsay, 2006). En el estómago se liberan los bradizoitos del interior del quiste y pasan al intestino delgado, donde penetran en la lámina propia del epitelio intestinal. Aquí es donde se produce la fase sexual, con la formación de macrogametos (femeninos) y microgametos (masculinos). Después, se produce la fecundación o fusión de los gametos y se forma el ovocito.

### Esporogonia

A partir de los ovocitos se forman los ooquistes, los cuales esporulan en la misma lámina propia. Los ooquistes del género *Sarcocystis* (Figura 3) son de tipo isosporoide, es decir, con 2 esporoquistes, cuyo tamaño es 9-12 x 7-12  $\mu\text{m}$  cada uno (Bowman et al., 2004). Los esporoquistes de *Sarcocystis* contienen 4 esporozoitos en su interior y los ooquistes tienen la pared muy delgada y frágil ( $<1\mu\text{m}$ ), la cual se rompe con facilidad en el intestino antes de salir del HD (perro y gato), por lo que en heces se van a encontrar mayoritariamente esporoquistes (Hernández Rodríguez et al., 1999). Los esporoquistes tienen una elevada resistencia, ya que en condiciones medioambientales propias de climas templados permanecen viables durante aproximadamente un año o incluso durante 2 años a 4°C, conservando su capacidad infectante. Por debajo de los 0°C son viables 2 meses, incluso en condiciones de sequedad viven 3 meses (Hernández Rodríguez et al., 1999).



**Figura 3.** Ooquiste con dos esporozoitos de *Sarcocystis* spp. en una muestra húmeda sin teñir (400x). Original de Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2017).

Los períodos prepatente y patente varían, pero para la mayoría de las especies de *Sarcocystis*, los ooquistes se excretan en las heces entre 7 y 14 días después de que el HD apropiado ingiera los sarcoquistes (Verma et al., 2017).

### 1.3. SARCOCISTOSIS EN LA ESPECIE OVINA

*Sarcocystis tenella* es la especie más patógena para los ovinos. En la mayoría de los casos, los signos clínicos son discretos y, cuando se presentan, incluyen anorexia, fiebre, anemia, pérdida de peso o disminución de la ganancia de peso y a veces pueden causar abortos en ovejas (Adriana et al., 2008). En las ovejas infectadas naturalmente se han observado signos neurológicos como encefalomiелitis, debilidad muscular, paresia de las extremidades posteriores y ataxia. Después de recuperarse de la enfermedad aguda, algunas ovejas pueden perder su lana. Las muertes agudas también pueden ocurrir sin otros síntomas (Henderson et al., 1997).

*Sarcocystis arieticanis* es menos patógena que *S. tenella* (Heydorn, 1985) y la sintomatología en este caso es bastante inespecífica, mostrándose una notable pérdida de peso, letargia y debilidad (Al Quraishy et al., 2014).

*Sarcocystis gigantea* es ligeramente patógena para la especie ovina. Aparte de la fiebre, se han descrito pocos síntomas relacionados con esta especie. Las pérdidas económicas

relacionadas con esta especie se deben a la presencia de quistes macroscópicos en las canales (Collins, citado en Dubey *et al.*, 2016a), las cuales se decomisan por que se consideran un impacto visual negativo en los consumidores (Martínez-Navalón *et al.*, 2012).

*Sarcocystis medusiformis*, es una especie no patógena (Dubey *et al.*, 2016a).

A diferencia de las especies que se transmiten por los perros, las que se transmiten por los gatos suelen ser poco o nada patógenas, como *S. gigantea* y *S. medusiformis*. Esto se debe a que los sarcoquistes de estas especies necesitan varios meses o años para ser infecciosos y se ha demostrado que no se suele completar el ciclo en animales jóvenes (Dubey *et al.*, 2016a).

#### 1.4. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN

La finalidad de la identificación es principalmente para diferenciar *Sarcocystis spp.* de los diferentes géneros de coccidios (como *Toxoplasma spp.* y *Neospora spp.*), diferenciar taxonómicamente las 200 especies que existen dentro del género (Dubey *et al.*, 2016a), así como para llevar a cabo el diagnóstico de la infección y de la enfermedad, tanto en HD como en HI. Actualmente los métodos que se emplean para la identificación de *Sarcocystis spp.* son:

- **Identificación morfológica:** basada en las características estructurales de las diferentes fases del parásito (ooquistes, esporoquistes, sarcoquistes, bradizoitos, etc.), mediante la observación a simple vista, tinciones histológicas o con microscopio electrónico. Por otra parte, se pueden emplear **tinciones vitales** con el uso de colorantes (fluorescentes o no) para determinar la viabilidad de las células, basándose en la integridad de la membrana celular. Esta técnica es interesante en el ámbito de investigación para comprobar la efectividad de un tratamiento para la destrucción de los parásitos o para evaluar el éxito de las técnicas de cultivo celular y técnicas de criopreservación.
- **Caracterización molecular:** mediante técnicas moleculares como la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y sus variantes. Los marcadores que se emplean actualmente son el gen 18S rRNA, el gen 28S rRNA, el gen *cox1* mitocondrial (subunidad I de la oxidasa del citocromo C) y la región ITS-1 (Dubey *et al.*, 2016a; Hu *et al.*, 2017; Gjerde *et al.*, 2020). La caracterización molecular puede ayudar a la especiación, sin embargo, la especificidad/exactitud depende de los genes analizados (Dubey *et al.*, 2016a).
- **Técnicas inmunológicas:** se pueden detectar los anticuerpos específicos de *Sarcocystis spp.* mediante varias pruebas serológicas, principalmente ELISA e IFAT, que muestran una alta sensibilidad para la fase tardía de la infección. No obstante, estas pruebas no son específicas de la especie, ya que las preparaciones tradicionales de antígenos son derivadas de merozoitos de cualquier especie heteróloga de *Sarcocystis* (Tenter, 1995).

A continuación, se resumen las características morfológicas más relevantes de las diferentes fases de *Sarcocystis* spp., así como las técnicas empleadas y la evaluación de viabilidad de los bradizoitos.

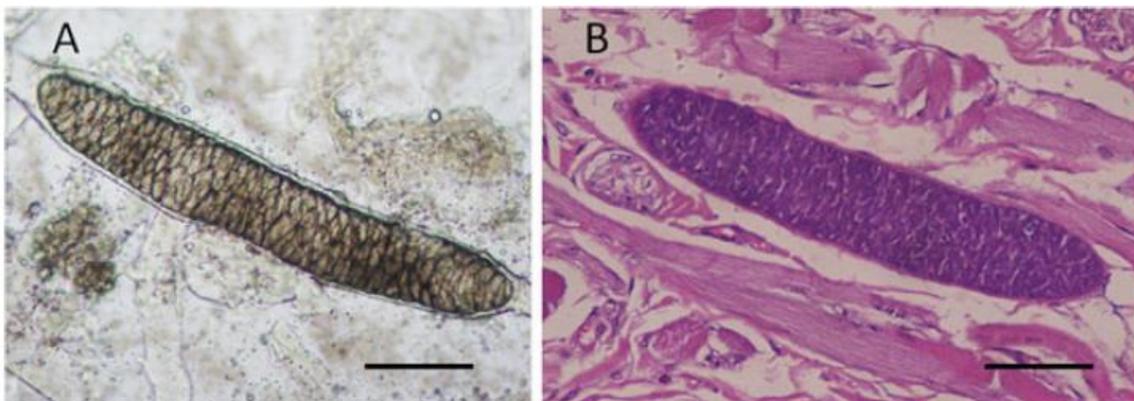
#### 1.4.1. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

##### OOQUISTES/ESPOROQUISTES

Se detectan en las heces del HD mediante métodos de flotación, bien como ooquistes o como esporoquistes (Verma et al., 2017). Su morfología (mencionada anteriormente, **Figura 3**) permite diferenciarlos de otras especies de coccidios, pero no tiene ningún valor taxonómico para diferenciar entre especies de *Sarcocystis* (Dubey et al., 2016a).

##### SARCOQUISTES

Los quistes están formados por una pared de la cual salen prolongaciones hacia su interior que pueden crear septos y cavidades donde se encuentran los parásitos (**Figura 4**). La forma y el tamaño del sarcoquiste varían con la edad del quiste (estado de maduración), el tipo de célula huésped parasitada (son más redondeados en SNC) y las técnicas utilizadas para el estudio (Dubey et al., 2016a). La mayoría tienen una forma alargada y fusiforme, pudiendo ser macroscópicos (de color blanquecino, similares a un grano de arroz) o microscópicos, dependiendo de la especie de *Sarcocystis*, cuyas características se describen en la **Tabla 1**.

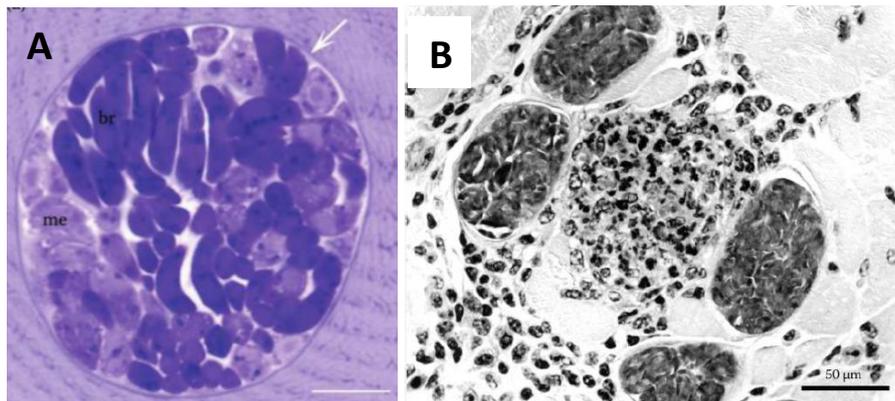


**Figura 4.** *Sarcocystis* spp. en la lengua de una oveja. **(A)** Muestra prensada que contiene un quiste no teñido; los septos que dividen los compartimentos internos son oscuros. **(B)** Sección histológica de un quiste teñido con hematoxilina y eosina; los septos se visualizan como estructuras no teñidas (claras). Original de Bittencourt et al., (2016) pág. 1685.

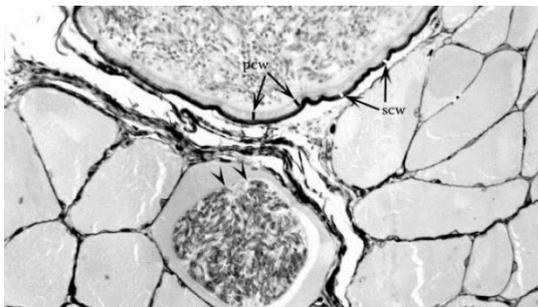
Las técnicas que se emplean para el estudio morfológico de los sarcoquistes son:

**Histología:** se realizan cortes de los tejidos afectados (músculo y SNC) y se tiñen con hematoxilina y eosina para poder observar las estructuras que componen el quiste (**Figura 7**). En estas preparaciones se pueden observar los parásitos, que variarán en función del estado de

madurez del sarcoquiste: si es inmaduro (**Figura 5A**), contendrá metrocitos en la corteza (los cuales apenas se observan cuando son maduros) y bradizoitos en la médula, pero si es demasiado antiguo o grande (**Figura 5B**), los bradizoitos del centro se degeneran y se infiltran granulocitos. Los metrocitos se tiñen menos que los bradizoitos. Otras tinciones que se pueden realizar son la tinción PAS (Periodic Acid-Schiff), que tiñe los gránulos de amilopectina de los bradizoitos de color rojo brillante y la tinción de Giemsa, donde se observan los metrocitos de color rosa/magenta (Dubey et al., 2016a), así como la tinción con Azul de Toluidina (**Figura 5A**) y la tinción de plata metanina de Gomori (**Figura 6**), entre otras.



**Figura 5. (A)** Tinción con Azul de Toluidina de *S. muris*: Sarcoquiste inmaduro con metrocitos (me) poco teñidos y bradizoitos (br) intensamente teñidos. Original de Teglas, M.B. et al. (1998). Obtenido de Dubey et al. (2016a) pág. 6. **(B)** En el centro, un sarcoquiste degenerado rodeado de células mononucleares e infiltrado por granulocitos; 4 sarcoquistes maduros (Tinción H y E). Original de Dubey, J.P., Speer, C.A. y Epling, G.P. (1982). Obtenido de Dubey et al. (2016a) pág. 22.



**Figura 6.** Tinción de plata metanina de Gomori (tiñe el tejido conectivo). Sarcoquistes de *S. gigantea* (arriba) y *S. arieticanis* (abajo) en el músculo esquelético de una oveja. La pared del quiste primario (pcw) en *S. gigantea* es gruesa y está rodeada por una cápsula de tejido conectivo (pared del sarcoquiste secundario, scw), mientras que *S. arieticanis* no tiene una pared de sarcoquiste secundario. Original de Dubey et al. (2016a) pág. 8.

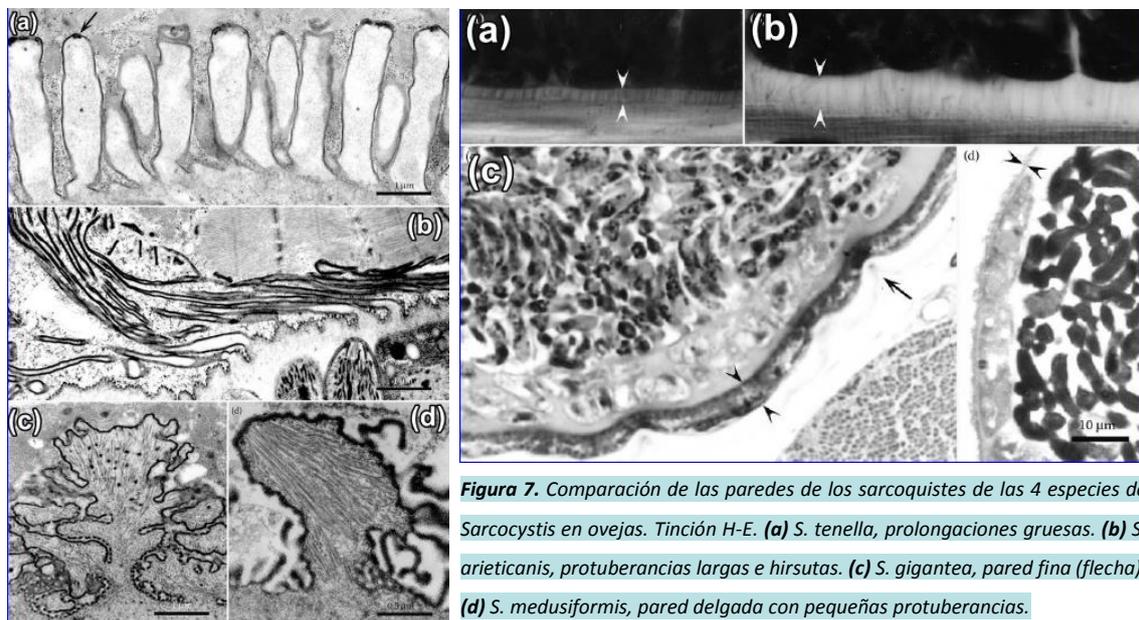
**Microscopía electrónica:** mediante este método se observa la estructura de la pared quística, criterio útil para la diferenciación de especies de *Sarcocystis*, ya que la estructura y el grosor son diferentes para las distintas especies (Dubey et al., 2016a). También se observa la pared quística que puede ser lisa, estriada o hirsuta o puede poseer protuberancias ramificadas complejas (**Figura 8**). Externamente, se observa la pared primaria, la fina capa de material denso que está en contacto con la célula hospedadora y debajo, se encuentra una capa amorfa de material granular, que forma los septos. En los quistes macroscópicos, una pared secundaria de tejido conectivo (fibras de colágeno) envuelve el quiste (Hernández Rodríguez et al., 1999).

**Placas de compresión:** mediante las placas de compresión que se usan para la triquinoscopia, se pueden observar los sarcocistes microscópicas del tejido muscular sin necesidad de tinciones.

Las características morfológicas que diferencian las especies de *Sarcocystis* que afectan al ganado ovino se muestran en la **Tabla 1**, así como las diferencias en la pared quística (**Figura 7 y 8**).

**Tabla 1.** Comparación de las características de *Sarcocystis* spp. que afectan al ganado ovino (Saito et al., 1997)

Especies	Longitud quiste (µm)	Grosor pared quística (µm)	Prolongaciones		Microtúbulos	Esporoquistes (µm)
			Forma	Tamaño (µm)		
<i>S. tenella</i>	700	1-3	Empalizada	3,5 x 0,5	-	12-15 x 8-10,5
<i>S. arieticanis</i>	900	<1	Hirsuto	5-10	-	15-16 x 9-10
<i>S. gigantea</i>	10000	<2	De coliflor	-	+	10,5-14 x 8-9,7
<i>S. medusiformis</i>	8000	<2	Serpenteada	-	+	10,3-13 x 7,3-8,8
<i>S. mihoensis</i>	1300-2100	10-12	Digitiforme	8-10 x 2,2-2,5	+	15,5-16 x 8-9



**Figura 7.** Comparación de las paredes de los sarcocistes de las 4 especies de *Sarcocystis* en ovejas. Tinción H-E. **(a)** *S. tenella*, prolongaciones gruesas. **(b)** *S. arieticanis*, protuberancias largas e hirsutas. **(c)** *S. gigantea*, pared fina (flecha). **(d)** *S. medusiformis*, pared delgada con pequeñas protuberancias.

**Figura 8.** Microscopía electrónica de transmisión: Comparación de las prolongaciones de la pared del sarcociste de las 4 especies de *Sarcocystis* en ovejas. **(a)** *S. tenella*, estructuras de placa. **(b)** *S. arieticanis*, filamentosas o hirsutas. **(c)** *S. gigantea* en forma de coliflor. **(d)** *S. medusiformis*, serpenteadas. Figura 7 y 8 originales de Dubey et al. (2016a) pág. 218 y 224, respectivamente.

## BRADIZOITOS

Para poder llevar a cabo la identificación de los bradizoitos de *Sarcocystis* a nivel microscópico o molecular y además concentrarlos (para analizar una mayor cantidad de tejido), se utiliza la digestión péptica.

Esta técnica consiste en simular las condiciones fisiológicas del aparato digestivo de un animal vivo, con el objetivo de digerir la carne fresca y romper la pared de los quistes que contiene el tejido muscular, liberándose los bradizoitos de su interior. Para ello se utiliza la pepsina, una enzima presente en el jugo gástrico que se encarga de la proteólisis.

Después de realizar la digestión, se filtra el contenido y éste se centrifuga para obtener los bradizoitos.

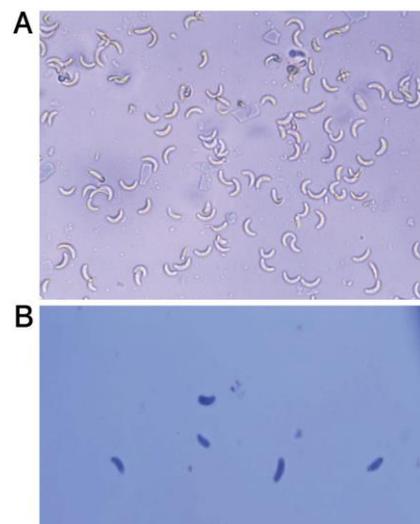
Los bradizoitos se pueden observar a microscopio óptico mediante tinciones histológicas comunes o mediante tinciones de viabilidad. También se ha estudiado su ultraestructura mediante microscopio electrónico. Sin embargo, estos métodos no se usan para la diferenciación de especies de *Sarcocystis* debido a que son muy similares entre especies (Verma et al., 2017).

### 1.4.2. TINCIONES VITALES

Existen diferentes protocolos y tipos de colorantes para evaluar la viabilidad de las células.

**Tinción con Azul de Tripán (o técnica de viabilidad por exclusión):** Basada en el protocolo de Strober (2015) que se fundamenta en el principio de que ciertos colorantes, como el Azul de Tripán (AT), no penetran las membranas celulares intactas que poseen las células vivas. Por tanto:

- Las células viabiles (Figura 9A) que mantienen la membrana intacta: excluyen el colorante, quedando su citoplasma claro.
- Las células no viabiles (Figura 9B) con la membrana dañada: permiten el paso del colorante, quedando su citoplasma teñido de azul.



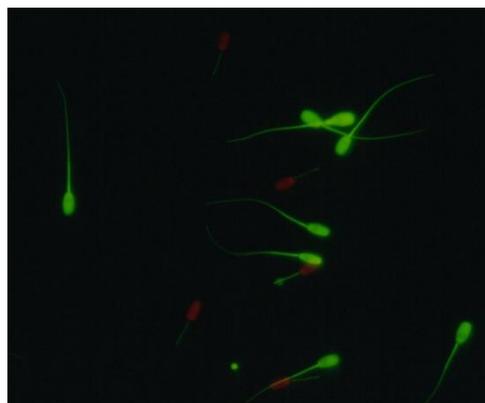
**Figura 9.** Evaluación viabilidad bradizoitos con tinción Azul de Tripán. **A)** Bradizoitos vivos. **B)** Bradizoitos muertos. Original de Honda et al., 2018.

Se ha empleado para evaluar la viabilidad de diferentes parásitos como *Toxoplasma gondii* (Borges *et al.*, 2016; Ahmadpour *et al.*, 2019; Shojaee *et al.*, 2019), *Trichomonas vaginalis* (Tasca *et al.*, 2003), *Eimeria tenella* (Dong *et al.*, 2011), *Giardia intestinalis* (Eligio-García *et al.*, 2017), *Schistosoma haematobium* (Forson *et al.*, 2019), *Taenia pisiformis* (Toral-Bastida *et al.*, 2011) entre muchos otros. En cuanto a *Sarcocystis spp.*, hay pocos estudios que emplean el AT para determinar la viabilidad de los bradizoitos (Dubey *et al.*, 2016b; Honda *et al.*, 2018; Murata *et al.*, 2018) aunque también se ha empleado para evaluar otras fases del ciclo, como por ejemplo los merozoitos (Elsheikha *et al.*, 2003, 2006) y los esporozoitos (Jäkel *et al.*, 1997).

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para el recuento de las células viables con microscopio óptico sin fluorescencia (In Kim *et al.*, 2016), ya que se trata de una técnica rápida, sencilla y asequible (Strober, 2015). Sin embargo, estudios recientes han investigado la combinación del AT con proteínas fluorescentes para poder contabilizar la viabilidad con este colorante mediante citometría de flujo (Avelar-Freitas *et al.*, 2014). Del mismo modo, también ha sido objeto de comparación con otras tinciones vitales, como el Ioduro de Propidio (Kim *et al.*, 2011; Rashidi *et al.*, 2018), la tinción modificada de Field (Afzan *et al.*, 2012) o la Eritrosina B (In Kim *et al.*, 2016).

**Doble tinción de fluorescencia:** Basada en la técnica para la determinación de viabilidad de espermatozoides de Harrison y Vickers (1990), la cual usa como reactivos el Ioduro de Propidio (IP) y el Diacetato de Carboxifluoresceína (CFD).

El CFD es un colorante permeable a la membrana celular, por lo que penetra fácilmente en células con la membrana intacta. Sin embargo, no es fluorescente. Su fluorescencia se manifiesta como resultado de la hidrólisis de los enlaces de éster de la membrana, dando lugar a la formación de 6-carboxyfluoresceína, la cual es impermeable (queda retenida dentro de la célula) y tiñe de verde fluorescente el citoplasma (Figura 10). Por el contrario, el IP es impermeable a la membrana plasmática pero se une a los ácidos nucleicos, de forma que cuando la membrana está dañada, los tiñe de rojo fluorescente (Figura 10) (Garner *et al.*, 1986).



**Figura 10.** Doble tinción de fluorescencia en espermatozoides. De color verde, espermatozoides viables. De color rojo, espermatozoides no viables. Original de Facultad de Veterinaria Universidad de Murcia.

El IP se ha empleado en muchos estudios de viabilidad de parásitos mediante citometría de flujo, como por ejemplo en *Eimeria tenella* (Dong et al., 2011), *Toxoplasma gondii* (Shamseddin et al., 2015), *Taenia pisiformis* (Toral-Bastida et al., 2011), *Plasmodium falciparum* (Boissière et al., 2012), *Leishmania infantum* (Rashidi et al., 2018) y en *Sarcocystis neurona*, concretamente en esporoquistes (Elsheikha et al., 2004).

La combinación de CFD e IP (llamada doble tinción de fluorescencia) para determinar la viabilidad se ha usado comúnmente en espermatozoides y experimentalmente en *Streptococcus macedonicus* (Papadimitriou et al., 2006) y otras bacterias ácido lácticas (Bunthof et al., 2001). La tinción más similar empleada en parásitos fue con IP y Diacetato de Fluoresceína, un derivado de la fluoresceína como el CFD, en ooquistes de *Cryptosporidium parvum* (Korich et al., 1990) y en esporoquistes de *Sarcocystis cruzi* (Savini et al., 1996). Así pues, la doble tinción de fluorescencia no ha sido empleada en bradizoitos de *Sarcocystis spp.*

#### 1.5. APLICACIÓN DE LA CONGELACIÓN DOMÉSTICA COMO TRATAMIENTO TÉRMICO

El proceso de congelación es el cambio de estado del agua libre que se encuentra dentro y fuera de las células, pasando de estado líquido a sólido, formándose cristales de hielo. Al tratarse de una congelación doméstica (no ultracongelación), la velocidad de congelación es lenta y los cristales que se forman son grandes y puntiagudos. Como consecuencia, se rompen las membranas celulares y la pérdida de integridad de la membrana celular conlleva la muerte del parásito. Por otra parte, la diferencia de velocidad de congelación del fluido extracelular y el intracelular conduce a un desequilibrio de la presión osmótica entre el interior y el exterior de la célula, siendo otra causa de muerte celular (Chen et al., 2007). En principio, a mayor tiempo de congelación, más crecen los cristales y mayor porcentaje de células con membranas dañadas.

Por el momento, al no existir ninguna vacuna para el ganado, el único método de prevención es el control. La excreción de *Sarcocystis* en las heces de los HD es el factor clave en la propagación de la infección, por tanto, se tiene que evitar que estos se infecten. Para evitarlo, es conveniente no alimentarlos con carne cruda, y si es así, lo mejor es congelarla, ya que puede reducir drásticamente o eliminar los sarcoquistes infecciosos de la carne (Dubey et al., 2016a).

Diferentes estudios han llevado a cabo evaluaciones de la viabilidad de los sarcoquistes y de los bradizoitos, mediante diferentes métodos, para determinar a qué temperatura se debe congelar y durante cuánto tiempo. Algunos de ellos, se resumen en la **Tabla 2**:

**Tabla 2.** Comparación del tratamiento térmico eficaz en diferentes especies de *Sarcocystis*.

Especie de <i>Sarcocystis</i>	HI	Temperatura y tiempo de congelación	Determinación de la viabilidad	Referencias
<i>S. gigantea</i>	Oveja	-14°C, 516 días	Presencia de esporoquistes en heces de gato.	(Collins and Charleston, 1980)
<i>Sarcocystis spp.</i>	Guanaco ( <i>Lama guanicoe</i> )	-18°C y -24°C (no indica durante cuánto tiempo)	Presencia de esporoquistes en heces de perros, gatos, ratas y ratones.	(Gorman et al., 1984)
<i>Sarcocystis spp.</i>	Vacuno	-18°C, 48 h	Tinción fluorescente (DAPI).	(Koudela and Steinhäuser, 1984)
<i>S. levinei</i>	Búfalo	-4°C, 48 h	Presencia de esporoquistes en heces de perro.	(Srivastava et al., 1986)
<i>S. miescheriana</i> y <i>S. suihominis</i>	Cerdo	-4 °C, 48 h -20 °C, 24 h	Presencia de esporoquistes en heces de perro.	(Saleque et al., 1990)
<i>S. capracanis</i>	Cabra	-20°C, 72 h	Presencia de esporoquistes en heces de perro.	(Singh and Shah, 1990)
<i>S. suihominis</i> y <i>S. miescheriana</i>	Cerdo	-20°C, 20 y 30 días	Estructural mediante microscopía electrónica.	(Chen et al., 2007)
<i>S. aucheniae</i>	Llama	-20 °C, 10 días	Presencia de esporoquistes en heces de perro.	(Godoy et al., 2007)
<i>S. fayeri</i>	Caballo	-20°C, 48 h	Electrotransferencia para determinar la proteína 15 kDa.	(Harada et al., 2013)
<i>S. sybillensis</i> y <i>S. wapiti</i>	Ciervo sica ( <i>Cervus nippon nippon centralis</i> )	-20°C, 2 h -30°C, 7 h -80°C, 8 h	Tinción Azul de Tripán.	(Honda et al., 2018)

Hay bastantes discrepancias en lo que al tiempo de congelación se refiere, siendo la temperatura -20°C en la mayoría de los casos. Estas diferencias pueden ser debidas a que se tratan de diferentes especies, pudiendo ser alguna más sensible que otra a la congelación. Sin duda, a más tiempo menos viabilidad. En estos estudios no se ha determinado la viabilidad de las células per se, sino que en la mayoría de ellos se ha aplicado la congelación y se ha infectado a los HD, basándose en la presencia de ooquistes o esporoquistes en las heces de éstos.

Otros estudios han probado de inactivar mediante congelación la toxina (Sarcocystina) presente en los quistes de algunas especies de *Sarcocystis*, (Godoy et al., 2007). Esta toxina puede afectar al huésped si se rompe el sarcoquiste y se libera, además que puede estar implicada en intoxicaciones alimentarias causadas por la ingestión de carne cruda con quistes de algunas especies de *Sarcocystis*, como *S. fayeri* en carne de caballo y *S. aucheniae* en carne de llama. Sin embargo, no está claro en qué especies se encuentra ni cómo actúa (Dubey et al., 2016a).

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Una de las causas más comunes de decomiso por parasitosis en ovinos adultos es la sarcocistosis, debido a la presencia de quistes macroscópicos en la musculatura. Según la normativa vigente (Reglamento (UE) 2017/625), se deben decomisar enteras las canales afectadas en dos o más zonas afectadas, lo que conlleva una importante pérdida económica: en un estudio realizado en España, entre el 12% de los animales positivos, el 21% de las canales fueron decomisadas parcialmente y el 79% totalmente, lo que puede representar para la industria española una pérdida de 20 millones de euros anuales (Martínez-Navalón et al., 2012). A pesar de que las especies de *Sarcocystis* que afectan al ganado ovino no son zoonóticas, la justificación del decomiso se debe al impacto visual negativo que los quistes pueden tener en el consumidor (Martínez-Navalón et al., 2012). Actualmente no existe ningún control de esta parasitosis, ya que se decomisan las canales directamente en el propio matadero. Por otra parte, tampoco hay ninguna metodología de laboratorio capaz de determinar su viabilidad.

Las tinciones vitales pueden ser una herramienta interesante para realizar este control, además de su uso en el ámbito de la investigación para comprobar la efectividad de un tratamiento en cualquier especie de *Sarcocystis*, pudiendo aplicar los resultados obtenidos en aquellas especies que son zoonóticas.

Hay pocos estudios de viabilidad realizados en *Sarcocystis spp.* utilizando tinciones vitales, muchos de ellos emplean otras técnicas (bioensayos en HD o cultivos in vitro) para determinar la viabilidad, por ello los objetivos de este TFG son:

- Evaluar dos tipos de tinciones vitales para confirmar la viabilidad de *Sarcocystis*: la tinción con Azul de Tripán, ampliamente utilizada en diferentes parásitos (entre ellos, *Sarcocystis*) y la doble tinción de fluorescencia, la cual no se ha empleado en bradizoitos de *Sarcocystis*. Asimismo, no hay ningún estudio que compare los resultados de ambas tinciones.
- Evaluar la sensibilidad de los bradizoitos a la congelación mediante las tinciones vitales, para determinar si es un tratamiento eficaz de la carne ante la presencia de quistes de *Sarcocystis*.

## METODOLOGÍA

### 3.1. BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA

Se ha realizado una revisión bibliográfica de artículos de revistas científicas, mayoritariamente especializadas en parasitología, mediante la búsqueda de palabras clave como “*Sarcocystis* en ovino”, “Viabilidad *Sarcocystis*”, “Viabilidad parásitos”, “Tinciones vitales”, “Azul de tripán”, “Ioduro de propidio”, “Congelación *Sarcocystis*” en bases de datos científicas como PubMed, ScienceDirect, Google Scholar y Alcorze (base de datos de la Biblioteca de la Universidad de Zaragoza).

Se ha priorizado la búsqueda de artículos de los últimos 10 años, aunque muchos de ellos son de la década de los 90, debido a la poca actualización de las técnicas.

Además de los artículos, también se ha consultado el libro *Sarcocystosis of Animals and Humans* de Dubey et al. (2016), donde hace una amplia revisión bibliográfica de los hallazgos sobre *Sarcocystis* hasta el momento y bastante actualizada.

Para la recopilación y organización de toda la información, se ha utilizado Mendeley, un gestor de referencias bibliográficas.

### 3.2. MUESTRAS

Para la realización de este TFG se han empleado 50 muestras correspondientes a 50 ovejas adultas, procedentes del matadero de Tomelloso (Ciudad Real, Castilla-La Mancha) y se han analizado en el laboratorio de parasitología del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

Cada muestra constaba de tejido muscular ovino, formada por 3 o 4 fragmentos de diferentes localizaciones (esófago, costal, tercio posterior, abdomen, axila, escápula, diafragma...), decomisados por la presencia de quistes macroscópicos de *Sarcocystis spp.*

---

#### 3.2.1. CLASIFICACIÓN Y TRATAMIENTO TÉRMICO

Las muestras se recibieron en envases de 250 ml refrigerados y marcados con la fecha de sacrificio del animal (día anterior a la recepción).

Se procesaron como frescas o se les aplicó una congelación doméstica a -20°C a diferentes tiempos: 24, 48, 72 o 96 horas, dependiendo del día que se analizaron. El número de muestras que se analizó cada día dependía de las muestras que llegaban, en función de los decomisos por quistes de *Sarcocystis* que había el día de sacrificio, siendo de 2 a 6 muestras por día.

En total se analizaron 10 muestras para cada uno de los tratamientos: 10 muestras frescas, 10 muestras congeladas 24 horas, 10 muestras congeladas 48 horas, 10 muestras congeladas 72 horas y 10 muestras congeladas 96 horas.

### 3.3. TÉCNICAS

Una vez realizado el tratamiento térmico, se descongelaron a temperatura ambiente las muestras que se iban a procesar y se llevó a cabo la digestión péptica para obtener los bradizoitos. Posteriormente se realizaron las tinciones vitales.

#### 3.3.1. DIGESTIÓN PÉPTICA

Para la realización de esta técnica se adaptaron los protocolos utilizados para la obtención de bradizoitos de *Toxoplasma gondii* de Dubey (1998) y Bayarri *et al.* (2010). En la **Tabla 3** se incluyen los materiales, equipos y reactivos utilizados para la realización de la digestión péptica.

**Tabla 3.** Materiales, equipos y reactivos utilizados para la realización de la digestión péptica.

MATERIALES	
Hay que lavar el material entre muestras con agua muy caliente y jabón (evitar contaminación cruzada).	
Espátula	Pipetas graduadas de 5 y 20 ml
Tijeras y pinzas	Imanes para agitador
Papel de aluminio	Tubos Falcon de 50 ml
Papel Parafilm	Gradilla para tubos Falcon de 50 ml
Matraces Erlenmeyer de 125 ml	Embudos con filtro
Morteros	Pipetas Pasteur desechables
EQUIPOS	REACTIVOS
Báscula	Solución de NaCl al 0,85% (250 ml).
Agitadores	Solución péptica (250 ml).
Estufa	Solución de Bicarbonato Sódico al 1,2% (125 ml).
Centrífuga	PBS comercial (tampón fosfato salino).
pH metro	

**Preparación de reactivos:** Las soluciones empleadas deben ser preparadas el mismo día para asegurar su eficacia.

- Solución de NaCl al 0,85% (250 ml): se enrasa un matraz de Erlenmeyer de 250 ml con agua destilada, se pesan 2,1 g de NaCl y se añaden al matraz. A continuación, se pone un imán y se agita hasta que el soluto esté bien disuelto.

- Solución de Pépsica (250 ml): Se enrasa un matraz de Erlenmeyer de 250 ml con agua destilada y se añaden 1,3 g de pepsina (actividad 1:10000) y 2,5 g de NaCl. Con una pipeta graduada de 5 ml se añaden al matraz 3,5 ml de HCl. A continuación, se pone un imán y se agita a 37°C hasta que alcance la temperatura y se disuelvan los solutos. Finalmente se mide el pH, el cual debe ser 1,1-1,2 ya que la pepsina actúa con un pH óptimo  $\leq 2$  (si es superior pierde el efecto proteolítico).
- Solución de Bicarbonato sódico al 1,2% (pH 8,3): En un matraz de 250 ml se añaden 125 ml de agua destilada y 1,5 g de  $\text{NaHCO}_3$ . A continuación, se pone un imán y se agita hasta que disuelvan los solutos. Finalmente se mide el pH, el cual debe tener un valor de 8,3.

Hay que medir el pH de todas las soluciones y corregirlas con HCl o NaOH en caso de que sea necesario: si el valor de pH está alto se añade HCl y si está bajo, NaOH, hasta alcanzar el valor óptimo.

**Procedimiento:** En primer lugar, se seleccionan los fragmentos con quistes y se pesan 10 g de cada muestra, previamente descongelada. Seguidamente, se trituran en un mortero con las tijeras hasta obtener pequeños fragmentos. La muestra tiene que quedar bien picada para favorecer la acción de la pepsina, sin contener tejido conectivo ni grasa. Se añaden 10 ml de solución de NaCl y se machaca con la maza. Se pasa el machacado a un matraz de Erlenmeyer de 250 ml y se lavan los restos del mortero con otros 10 ml de solución de NaCl que se añaden al matraz.

Posteriormente se añaden 20 ml de solución pépsica y un imán, se cierra con el tapón del matraz (o con Parafilm y papel de aluminio) y se incuba en los agitadores de la estufa a 37°C durante 30 minutos. La temperatura, el tiempo y el pH de la pepsina son importantes para que la digestión sea efectiva, así como agitar la muestra, para asegurarse de que actúa en todo el tejido.

Mientras tanto se prepara el material para el filtrado: Tubos Falcon de 50 ml, una gradilla para tubos y embudos con filtro (se puede añadir gasa si el tamaño del filtro es demasiado grande). Una vez pasados los 30 minutos, se filtra el contenido y se recoge en los Falcons.

A continuación, se realizan una serie de centrifugaciones y lavados: Primero se centrifugan los tubos cerrados durante 10 minutos a 2800 rpm, para separar físicamente las partículas en suspensión (bradizoitos) del sobrenadante. Una vez terminado, se retira el sobrenadante y se añaden 25 ml de la solución de Bicarbonato sódico para neutralizar la pepsina, alcalinizando la muestra de forma que se impide la destrucción de los bradizoitos (Dubey, 1998). Se homogeniza el precipitado con la solución con una pipeta Pasteur y se

centrifuga sin tape (10 minutos, 2800 rpm). Al terminar se retira el sobrenadante y se añaden 50 ml de PBS para asegurarse de que no quedan restos de pepsina, se homogeniza y se centrifuga sin tape. Se repite el último paso y se retira el sobrenadante.

Finalmente, se añaden 2 ml de PBS y se homogeniza con la pipeta Pasteur. A continuación, se ajusta la concentración de bradizoitos mediante el contaje con cámara de Neubauer y se resuspende de nuevo en 1 ml de PBS. La concentración óptima para que los colorantes actúen con la mayor eficacia es de  $5 \times 10^6$  células/ml. Seguidamente se procede a la preparación de las tinciones vitales.

### 3.3.2. TINCIONES VITALES

Como se ha mencionado anteriormente, hay diferentes tipos de tinciones para la evaluación de la viabilidad y en este TFG se emplearon el Azul de Tripán y la combinación de IP-CFD (doble tinción de fluorescencia). En la **Tabla 4**, se presentan los materiales, equipos y reactivos utilizados en ambas técnicas, difiriendo solamente con los colorantes empleados para cada una de ellas.

**Tabla 4.** Materiales, equipos y reactivos utilizados para la realización de las tinciones vitales.

<b>MATERIALES</b>	<p>Tubos Eppendorf de 2 ml.</p> <p>Pipetas automáticas y sus correspondientes puntas.</p> <p>Gradilla para tubos Eppendorf.</p> <p>Cámara de Neubauer o hemocitómetro.</p>
<b>EQUIPOS</b>	<p>Agitador vórtex.</p> <p>Microscopio óptico con filtro de fluorescencia (B – 2A: 450-490 nm de excitación).</p> <p>Estufa.</p>
<b>REACTIVOS</b>	<p>Viabilidad por exclusión: Azul de Tripán (AT) al 0,4%.</p> <p>Doble tinción de fluorescencia (mantenerlos en oscuridad, son fotosensibles):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diacetato de Carboxifluoresceina (CFD).</li> <li>• Ioduro de Propidio (IP).</li> </ul>

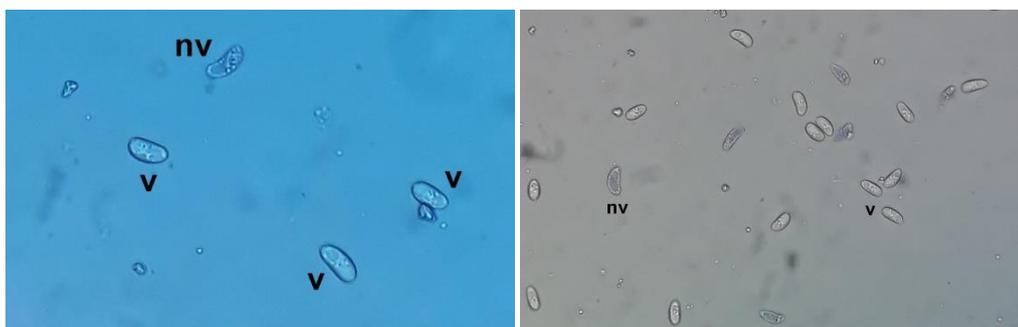
### TINCIÓN CON AZUL DE TRIPÁN

Técnica de viabilidad por exclusión, basada en el protocolo de Strober (2015).

**Preparación y puesta a punto:** Se preparó el colorante al 0,4% (0,4 g de AT en 100 ml de agua destilada) y se estableció la proporción más adecuada: 1:1, 1:5 o 1:50. En este caso se eligió 1:1, ya que esta proporción permitió diferenciar claramente las células dañadas de las no dañadas, proporcionando un azul intenso a las dañadas y sin teñir en exceso el fondo de la preparación ni los posibles artefactos que pudieran llevar a error y confundirlos con células teñidas/dañadas.

**Tinción:** Se añaden 150 µl de muestra y 150 µl de AT en un tubo Eppendorf y se voltea. Se incuba 3 minutos a temperatura ambiente y se procede a la cuantificación.

**Cuantificación:** Se observa a microscopio óptico un total de 5 campos escogidos al azar a 40x y se contabilizan los bradizoitos teñidos (no viables) y los no teñidos (viables) (**Figura 11**) en los siguientes 3 – 5 minutos, ya que conforme pasa el tiempo los bradizoitos se mueren debido a la acción del reactivo (Strober, 2015).



**Figura 11.** Tinción Azul de Tripán en bradizoitos de *Sarcocystis* (40x). Bradizoitos viables (v) y bradizoitos no viables (nv).

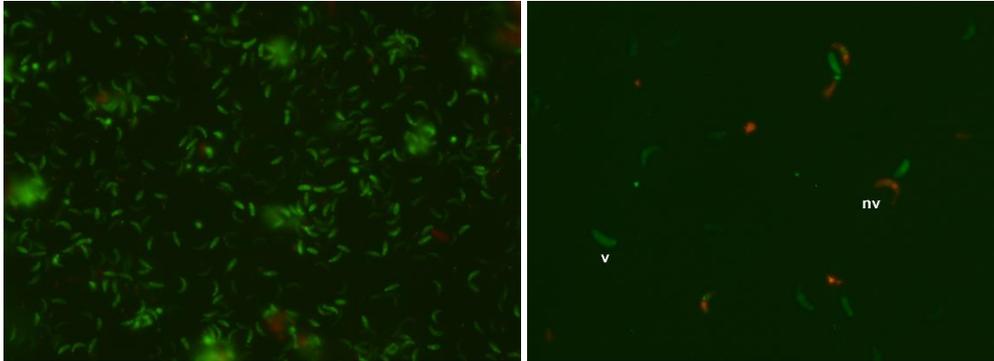
## DOBLE TINCIÓN DE FLUORESCENCIA

Basada en la técnica para la determinación de viabilidad de espermatozoides de Harrison y Vickers (1990).

**Puesta a punto:** Al tratarse de células diferentes, en este caso bradizoitos, se probaron diversas proporciones de reactivos: 1:1, 1:10, 1:20, 1:30 hasta 1:150. Finalmente, se eligieron IP = 1:50 y CFD = 1:100, debido a que esta combinación, al igual que en la tinción anterior, permitió diferenciar bien las células dañadas y no dañadas. Hay que tener en cuenta que un exceso de CFD hace que el fondo de la preparación adquiera un exceso de fluorescencia y no permite la identificación de las células no viables.

**Tinción:** Se añaden 500 µl de muestra, 10 µl de CFD y 5 µl de IP en un tubo Eppendorf y se voltea. Se incuba la dilución de la muestra con los colorantes durante 10 minutos a 37° en la estufa y se prepara la muestra al hemocitómetro.

**Cuantificación:** A continuación, se observa a microscopio con un filtro de fluoresceína (B – 2A): 450-490 nm de excitación a 40x y se contabilizan los bradizoitos rojos fluorescentes (no viables) y los bradizoitos verdes fluorescentes (viables) en un total de 5 campos escogidos al azar (Figura 12).



**Figura 12.** Doble tinción de fluorescencia en bradizoitos de *Sarcocystis* (40x). Izquierda: bradizoitos viables. Derecha: bradizoitos viables (v) y bradizoitos no viables (nv).

#### CÁLCULO DE LA VIABILIDAD

Una vez contados los bradizoitos viables y los no viables, se procedió al cálculo de la viabilidad (% de células viables del total en una muestra) mediante la siguiente fórmula, obteniendo dos valores de % de viabilidad (uno por cada tinción) en cada muestra:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{total células vivas}}{\text{total células vivas} + \text{total células muertas}} \times 100$$

#### 3.4. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todos los datos se recogieron en una hoja de cálculo de Microsoft Office Excel para su posterior análisis estadístico. Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics Base 22.0. La normalidad de los datos se comprobó mediante los tests Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Al tratarse de datos con distribución no normal, la correlación entre ambas técnicas de tinción se realizó mediante *Spearman's correlation test*, empleando las dos tinciones (AT y Doble fluorescencia) como variables. Mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis se comprobó si existen diferencias en el porcentaje de viabilidad entre los distintos tiempos de congelación, trabajando con dos pares de variables: Estado-Azul de Tripán y Estado-Doble Fluorescencia. Para ello, se consideraron estadísticamente significativos los valores de  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de viabilidad obtenidos con las tinciones Azul de Tripán y doble tinción de fluorescencia y con diferentes tratamientos térmicos (fresca, congelación 24h, 48h, 72h y 96h) se presentan en la **Tabla 5**:

**Tabla 5.** Resultados de viabilidad (%) en ambas tinciones (AT y Doble tinción de fluorescencia).

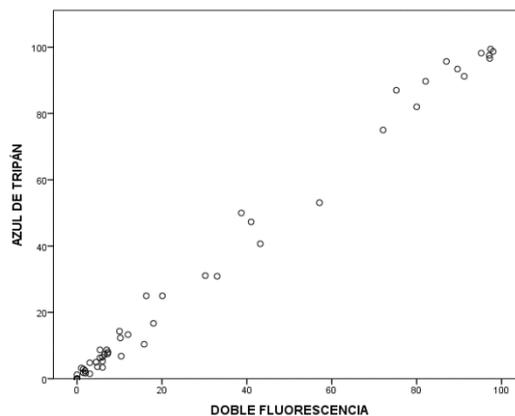
ESTADO	AZUL DE TRIPAN (%)	DOBLE TINCIÓN DE FLUORESCENCIA (%)
FRESCA	91,2	91,2
FRESCA	87	75,2
FRESCA	98,7	98
FRESCA	97,5	97,1
FRESCA	89,7	82,1
FRESCA	98,2	95,2
FRESCA	95,7	87
FRESCA	93,4	89,6
FRESCA	99,4	97,4
FRESCA	96,6	97,2
24 HORAS	47,3	41
24 HORAS	30,9	33
24 HORAS	31,1	30,2
24 HORAS	75	72,1
24 HORAS	82	80
24 HORAS	25	16,3
24 HORAS	25	20,1
24 HORAS	50	38,7
24 HORAS	53,1	57,1
24 HORAS	40,7	43,15
48 HORAS	3,6	4,8
48 HORAS	8,7	5,4
48 HORAS	14,3	10
48 HORAS	6,5	6
48 HORAS	1,7	2
48 HORAS	13,3	12
48 HORAS	8,7	7
48 HORAS	16,7	18
48 HORAS	5,3	6
48 HORAS	3,4	6
72 HORAS	8	7,3
72 HORAS	6,3	5,4
72 HORAS	10,4	15,8
72 HORAS	12,3	10,2
72 HORAS	5	4,5
72 HORAS	6,8	10,4

72 HORAS	1,8	1,5
72 HORAS	1,2	0
72 HORAS	4,8	3
72 HORAS	3,2	1
96 HORAS	7,3	6,5
96 HORAS	7,5	7,2
96 HORAS	0	0
96 HORAS	2,9	1,5
96 HORAS	2,4	1,9
96 HORAS	1,5	3
96 HORAS	0	0

El resultado de la correlación de Spearman fue:  $r_s = 0,985$ ,  $P < 0,001$ . Por tanto, comparando los datos obtenidos con la **Tabla 6** (Schober et al., 2018), se llega a la conclusión de que la correlación entre ambas tinciones es muy buena y significativa. Además, en la **Figura 13** se puede observar que la correlación entre ambas tinciones es muy buena, ya que los datos siguen una tendencia lineal.

**Tabla 6.** Ejemplo de un enfoque convencional para interpretar un coeficiente de correlación (Schober et al., 2018).

Magnitud absoluta del coeficiente de correlación observada	Interpretación
0,00-0,10	Correlación insignificante
0,10-0,39	Correlación débil
0,40-0,69	Correlación moderada
0,70-0,89	Correlación fuerte
<b>0,90-1,00</b>	<b>Correlación muy fuerte</b>



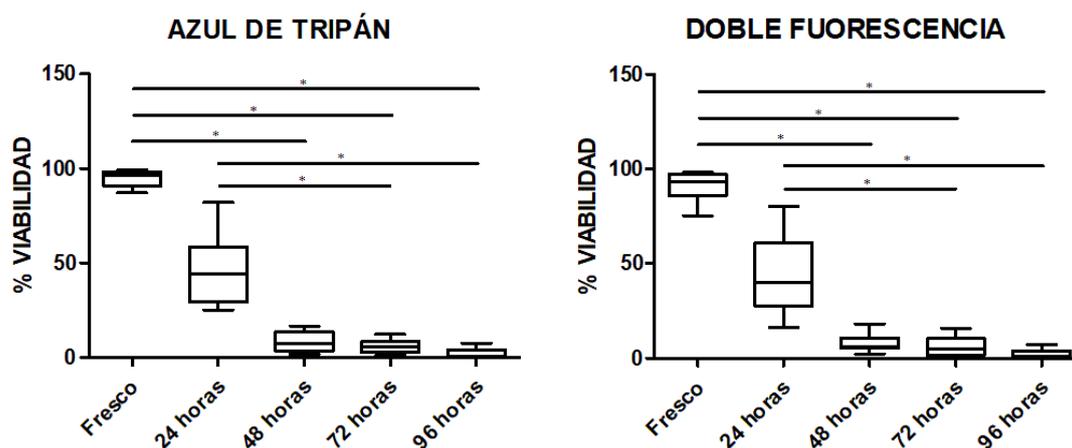
**Figura 13.** Representación gráfica de la correlación entre la tinción con AT y la doble tinción de fluorescencia.

También se puede comprobar que existen diferencias significativas en los valores de viabilidad del parásito entre los diferentes tiempos de congelación, tanto si se valora por la tinción de Azul de Tripán como por la Doble Fluorescencia ( $P_{KW} < 0.001$ , en ambos casos).

La representación de los datos se hace mediante el post-test Bonferoni, cuyos resultados se expresan en la **Tabla 7** y en la **Figura 14**:

**Tabla 7.** Resultados del post-test Bonferoni para ambas tinciones: Superíndices con diferente letra, para cada una de las técnicas, señalan que existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

ESTADO	N	Azul de Tripán	Doble Fluorescencia
FRESCA	10	96,15 (87-99,4) <sup>a</sup>	93,2 (75,2-98) <sup>a</sup>
24 HORAS	10	44 (25-82) <sup>a,b</sup>	39,85 (16,3-80) <sup>a,b</sup>
48 HORAS	10	7,6 (1,7-16,7) <sup>b,c</sup>	6 (2-18) <sup>b,c</sup>
72 HORAS	10	5,65 (1,20-12,3) <sup>c</sup>	4,95 (0-15,80) <sup>c</sup>
96 HORAS	10	0,75 (0-7,5) <sup>c</sup>	0,75 (0-7,2) <sup>c</sup>



**Figura 14.** Representación gráfica de la relación de los resultados de viabilidad para cada tinción con los tiempos de tratamiento térmico.

En ambas tinciones (**Figura 14**) se observa que el porcentaje de viabilidad disminuye en función de las horas que se congela la muestra. Esta disminución apenas se observa a partir de las 48 horas de congelación (el porcentaje de viabilidad es similar entre las 48, 72 y 96 horas de congelación, siendo menor del 20%). La reducción de viabilidad es estadísticamente significativa entre la muestra fresca y tras la congelación de 48, 72 y 96 horas. También entre las 24 y 72 horas y entre las 24 y 96 horas. Por tanto, a partir de las 48 horas la viabilidad es menor del 18%, a partir de las 72 horas menor del 15,8% y a partir de las 96 horas menor del 7,5%. En conclusión, lo ideal sería congelar la carne entre 48 y 96 horas para inactivar el parásito, siendo más efectivo durante 96 horas.

Los resultados entre ambas tinciones han sido concluyentes, sin embargo, la evaluación de la viabilidad mediante contaje con cámara de Neubauer podría ser un proceso tedioso si el tamaño de la muestra fuese más grande. Si fuese el caso, se podría emplear el contaje mediante citometría de flujo con la doble tinción de fluorescencia y con AT, tal y como se indica en el estudio realizado por Avelar-Freitas et al. (2014), donde la correlación entre el AT y el IP con citometría de flujo es bastante buena ( $r^2=0,9758$ ). De todas formas, se hubiese podido utilizar solamente la tinción de fluorescencia con el IP, ampliamente utilizado para determinar la viabilidad de otros parásitos, ya que este tiñe de rojo el núcleo de las células dañadas sin tener que utilizar el CFD. No obstante, la combinación de ambos es interesante para observar bien el contraste entre las células vivas y las muertas.

En cuanto a la tinción con AT, a pesar de ser una técnica rápida y sencilla, Strober (2015) plantea que la medición de la viabilidad a partir de la integridad de la membrana celular, al ser un método indirecto puede suponer un problema. Por lo tanto, puede darse que una célula con la membrana dañada pueda seguir siendo viable gracias a la capacidad de reparación de ese daño o que una célula con la membrana intacta no sea viable funcionalmente. Además, la conservación de las muestras teñidas no es posible puesto que a medida que aumenta el tiempo de exposición de las células al colorante, estas lo incorporan, sobreestimando los resultados de células no viables (Avelar-Freitas et al., 2014). Otro inconveniente de la técnica, según expone In Kim et al. (2016), son los problemas ambientales y sanitarios que presenta el AT por posibles efectos teratogénicos, aunque en este caso no supone un problema debido a las pocas muestras analizadas y la seguridad empleada en el manejo de los colorantes. Aun así, la Eritrosina B es más segura que el AT, por lo que se hubiese podido emplear esta primera para la determinación de viabilidad.

En lo que respecta al tratamiento térmico aplicado, en la **Tabla 2** se muestran diversos estudios en los que se ha obtenido la temperatura y tiempo mínimo de tratamiento para la inactivación de los bradizoitos, basándose la mayoría en la infectividad de éstos. De los estudios que emplean tinciones vitales para la evaluación de viabilidad, el que obtiene resultados similares a los obtenidos en este TFG es el de Koudela and Steinhäuser (1984), donde la viabilidad se evalúa mediante la tinción fluorescente DAPI.

Si comparamos los resultados en función de las especies de *Sarcocystis*, deducimos que, probablemente *S. gigantea* esté presente en las muestras analizadas en este TFG, ya que estas contenían quistes macroscópicos, descartando *S. medusiformis* por su baja prevalencia en Europa. De todas formas, aunque los animales fueron sacrificados al matadero (por lo que se

sobreentiende que no tenían sintomatología), no se puede descartar la presencia de *S. tenella* o *S. arieticanis*, porque no se pudo demostrar su presencia.

Collins y Charleston (1980) fueron los únicos en estudiar la viabilidad de *Sarcocystis gigantea* tras aplicarle un tratamiento térmico. Sus resultados (**Tabla 2**) fueron muy diferentes a los obtenidos en este TFG: en su estudio, los quistes seguían siendo infecciosos a los 60 días tras aplicar un tratamiento de  $-14^{\circ}\text{C}$  y a los 516 días ya no eran infecciosos. Puede ser debido a que los quistes sean más resistentes a  $-14^{\circ}\text{C}$  que a  $-20^{\circ}\text{C}$  y según la metodología empleada, no se sabe si entre los 60 y los 516 días se evaluó la viabilidad. Por otra parte, se comprobó alimentando gatos con quistes y observando la presencia de ooquistes o esporoquistes en sus heces, sin indicar que porcentaje de los gatos se infectaron. En este TFG no se evaluó la infectividad sino la viabilidad, por lo que sería interesante estudiar si tras aplicar el tratamiento térmico, aún con una baja viabilidad, los parásitos seguirían siendo infectantes. Sin embargo, autores como Chen et al. (2007), en su estudio de cómo afecta la congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante largos periodos de tiempo en la estructura del sarcoquiste, concluye que los bradizoitos se degeneran y se disuelven con la congelación y que es probable que se pierda la actividad de los bradizoitos, lo que podría significar que los quistes así tratados ya no sean infecciosos. Además, Van Bree et al. (2018), indican que no hay riesgo de transmisión a los animales congelando la carne cruda durante uno o dos días a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Como se ha mencionado anteriormente, el único método de prevención de la sarcocistosis es el control de la infección de los HD (perro y gato). Al tratarse de animales domésticos y de compañía en la mayoría de los casos, la principal causa de infección ocurre en aquellos perros y gatos que frecuentan las explotaciones ganaderas con mayor probabilidad de alimentarse de carne cruda de los cadáveres, así como perros y gatos callejeros que se alimentan de basura. En estos casos es difícil hacer el control mediante el tratamiento térmico de la carne, ya que lo mejor sería evitar el acceso a ésta. En los casos en los que sí que se puede emplear es en perros y gatos de compañía que siguen una dieta BARF (*Biologically Appropriate Raw Food*) casera (Van Bree et al., 2018), congelando la carne cruda mínimo 48 horas antes de administrarla.

Los resultados obtenidos han sido favorables: hay una buena correlación entre los resultados de las dos tinciones y la viabilidad se reduce considerablemente a medida que los tiempos de congelación son más elevados, sobre todo a partir de las 48 horas.

## CONCLUSIONES

- La congelación doméstica a -20°C durante 48 horas o tiempos superiores es un método eficaz para inactivar los bradizoitos de *Sarcocystis* en la carne cruda de ovino.
- Es el primer estudio que compara la tinción de Azul de Tripán con la doble tinción de fluorescencia.
- Es el primer estudio que emplea la Doble tinción de fluorescencia para determinar la viabilidad de *Sarcocystis*.
- Tanto la tinción con Azul de Tripán como la doble tinción de fluorescencia son métodos eficaces para la determinación de la viabilidad en *Sarcocystis spp.*

## CONCLUSIONS

- Domestic freezing at -20°C for 48 hours or more is an effective method to inactivate *Sarcocystis* bradyzoites in raw sheep meet.
- It is the first study to compare Trypan Blue staining with double fluorescence staining.
- This is the first study to use double fluorescence staining to evaluate *Sarcocystis* viability.
- Both Trypan Blue staining and double fluorescence staining are effective methods to determining *Sarcocystis spp.* viability.

## VALORACIÓN PERSONAL

El campo de la parasitología siempre me ha llamado la atención y la realización de este trabajo ha sido una experiencia muy enriquecedora desde el punto de vista académico. He aprendido técnicas de laboratorio que hasta ahora desconocía y, sobre todo, he aprendido de mis compañeras del Área de Enfermedades Parasitarias, en especial de Paz Peris Peris, a quien le agradezco mucho su dedicación. También me gustaría agradecer a mis tutores M<sup>a</sup> Jesús Gracia Salinas y Juan Antonio Castillo Hernández, por la constancia y ayudarme a mejorar en la realización de este trabajo. Como valoración final estoy muy satisfecha con los resultados y el aprendizaje adquirido durante esta experiencia, a pesar de las circunstancias relacionadas con el COVID-19.

Por último, quiero mencionar que este Trabajo de Fin de Grado ha sido financiado por FEDER/Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades – Agencia Estatal de Investigación – Proyecto RTC-2017-6594-2.



“Promover el desarrollo tecnológico, la innovación y una investigación de calidad”

## BIBLIOGRAFÍA

Adriana, T., Mircean, V., Blaga, R., Bratu, C.N. y Cozma, V. (2008). "Epidemiology and Etiology in Sheep Sarcocystosis". *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*, 65 (2), pp. 49–54. Disponible en: <https://journals.usamvcluj.ro/index.php/veterinary/article/view/1522/0> [Consultado 04-08-2020]

Afzan, M.Y., Sivanandam, S. y Suresh, K., (2012). "Modified Field stain - rapid viability test for *Trichomonas vaginalis*". *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), pp. 132–137. DOI:10.1111/j.1365-2672.2011.05185.x

Ahmadpour, E., Ebrahimzadeh, M.A., Sharif, M., Edalatian, S., Sarvi, S., Montazeri, M., Mehrzadi, S., Akbari, M., Rahimi, M.T. y Daryani, A. (2019). "Anti-Toxoplasma activities of *Zea mays* and *Eryngium caucasicum* extracts, in vitro and in vivo". *Journal of Pharmacopuncture*, 22 (3), pp. 154–159. DOI:10.3831/KPI.2019.22.020

Al Quraishy, S., Morsy, K., Bashtar, A.R., Ghaffar, F.A. y Mehlhorn, H. (2014). "*Sarcocystis arieticanis* (Apicomplexa: Sarcocystidae) infecting the heart muscles of the domestic sheep, *Ovis aries* (Artiodactyla: Bovidae), from K. S. A. on the basis of light and electron microscopic data". *Parasitology Research*, 113 (10), pp. 3823–3831. DOI: 10.1007/s00436-014-4050-2

Avelar-Freitas, B.A., Almeida, V.G., Pinto, M.C.X., Mourão, F.A.G., Massensini, A.R., Martins-Filho, O.A., Rocha-Vieira, E. y Brito-Melo, G.E.A. (2014). "Trypan blue exclusion assay by flow cytometry". *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47 (4), pp. 307–315. DOI:10.1590/1414-431X20143437

Bayarri, S., Gracia, M.J., Lázaro, R., Pérez-Arquillué, C., Barberán, M. y Herrera, A. (2010). "Determination of the viability of *Toxoplasma gondii* in cured ham using bioassay: Influence of technological processing and Food safety implications". *Journal of Food Protection*, 73 (12), pp. 2239–2243. DOI: 10.4315/0362-028X-73.12.2239

Bittencourt, M.V., Meneses, I.D.S., Ribeiro-Andrade, M., de Jesus, R.F., de Araújo, F.R. y Gondim, L.F.P. (2016). "*Sarcocystis spp.* in sheep and goats: frequency of infection and species identification by morphological, ultrastructural, and molecular tests in Bahia, Brazil". *Parasitology Research*, 115 (4), pp. 1683–1689. DOI: 10.1007/s00436-016-4909-5

Boissière, A., Arnathau, C., Duperray, C., Berry, L., Lachaud, L., Renaud, F., Durand, P. y Prugnolle, F. (2012). "Isolation of *Plasmodium falciparum* by flow-cytometry: Implications for single-trophozoite genotyping and parasite DNA purification for whole-genome high-throughput sequencing of archival samples". *Malaria Journal*, 11 (163), pp. 1-7. DOI: 10.1186/1475-2875-11-163

Borges, I.P., Castanheira, L.E., Barbosa, B.F., Naves De Souza, D.L., Da Silva, R.J., Mineo, J.R., Tudini, K.A.Y., Rodrigues, R.S., Ferro, E.A.V. y De Melo Rodrigues, V. (2016). "Anti-parasitic effect on *Toxoplasma gondii* induced by BnSP-7, a Lys49-phospholipase A 2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom". *Toxicon*, 119, pp. 84–91. DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.05.010

Bowman, D.D., Lynn, R.C. y Emberhard, M.L. (2004). *Georgis Parasitología para veterinarios* (8ª edición). Madrid: S.A. Elsevier España.

Bunthof, C.J., Bloemen, K., Breeuwer, P., Rombouts, F.M. y Abee, T. (2001). "Flow Cytometric Assessment of Viability of Lactic Acid Bacteria". *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (5), pp. 2326–2335. DOI: 10.1128/AEM.67.5.2326–2335.2001

Centers for Disease Control and Prevention (2017). Sarcocystosis. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/sarcocystosis/index.html> [Consultado 07-08-2020].

Chen, L., Zhou, B., Yang, Z., Li, C., Attwood, S.W., Wang, W., Lei, L., Sun, X. y Zhang, Z. (2007). "Effects of frozen storage on the structure of sarcocysts in pig muscle and implications in taxonomic studies". *Experimental Parasitology*, 115 (4), pp. 393–398. DOI:10.1016/j.exppara.2006.10.003

Collins, G.H. y Charleston, W.A.G. (1980). "Studies on *Sarcocystis* species VII: the effect of temperature on the viability of macrocysts (*Sarcocystis gigantea*) of sheep". *New Zealand Veterinary Journal*, 28 (9), pp. 189–191. DOI: 10.1080/00480169.1980.34744

Dong, X., Abdelnabi, G.H., Lee, S.H., Li, G., Jin, H., Lillehoj, H.S. y Suo, X. (2011). "Enhanced egress of intracellular *Eimeria tenella* sporozoites by splenic lymphocytes from coccidian-infected chickens". *Infection and Immunity*, 79 (8), pp. 3465–3470. DOI: 10.1128/IAI.01334-10

Dubey, J.P. (1998). "Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues". *Veterinary Parasitology*, 74 (1), pp. 75–77. DOI:10.1016/S0304-4017(97)00135-0

Dubey, J.P., Calero-Bernal, R., Rosenthal, B.M., Speer, C.A. y Fayer, R. (2016a). *Sarcocystosis of Animals and Humans* (2ª edición). Boca Ratón: CRC Press - Taylor & Francis Group.

Dubey, J.P. y Lindsay, D.S. (2006). "Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants". *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 22 (3), pp. 645–671. DOI: 10.1016/j.cvfa.2006.08.001

Dubey, J.P., Moré, G., Van Wilpe, E., Calero-Bernal, R., Verma, S.K. y Schares, G. (2016b). "*Sarcocystis rommeli*, n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) from Cattle (*Bos taurus*) and its Differentiation from *Sarcocystis hominis*". *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63 (1), pp. 62–68. DOI: 10.1111/jeu.12248

Dubey, J.P., Speer, C.A., Callis, G. y Blixt, J.A. (1982). "Development of sheep-canid cycle of *Sarcocystis tenella*". *Canadian Journal of Zoology*, 60 (10), pp. 2464–2477. DOI: 10.1139/z82-315

Eligio-García, L., Pontifez-Pablo, E., Pérez-Gutiérrez, S. y Jiménez-Cardoso, E. (2017). "Antigiardial Effect of Kramecyne in Experimental Giardiasis". *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, pp. 1–7. DOI: 10.1155/2017/6832789

Elsheikha, H.M., Murphy, A.J. y Mansfield, L.S. (2004). "Viability of *Sarcocystis neurona* sporocysts after long-term storage". *Veterinary Parasitology*, 123 (3-4), pp. 257–264. DOI:10.1016/j.vetpar.2004.06.013

Elsheikha, H.M., Rosenthal, B.M., Murphy, A.J., Dunams, D.B., Neelis, D.A. y Mansfield, L.S. (2006). "Generally applicable methods to purify intracellular coccidia from cell cultures and to quantify purification efficacy using quantitative PCR". *Veterinary Parasitology*. 135 (3-4), pp. 223–234. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.09.014

Elsheikha, H.M., Saeed, M.A., Fitzgerald, S.D., Murphy, A.J. y Mansfield, L.S. (2003). "Effects of and host cell type on the in vitro growth and development of *Sarcocystis falcatula*". *Parasitology Research*, 91 (1), pp. 22–26. DOI: 10.1007/s00436-003-0902-x

Facultad de Veterinaria Universidad de Murcia. Técnicas de análisis seminal (Fisiología de la Reproducción). Disponible en: <https://www.um.es/grupo-fisiovet/Im-analisis-seminal.htm> [Consultado 07-09-2020]

Forson, P.O., Tetteh-Quarcoo, P.B., Ahenkorah, J., Aryee, R., Okine, E.N., Afutu, E., Djameh, G.I., Agyapong, J., Anang, A.K. y Ayeh-Kumi, P.F. (2019). "Ability of Vital and Fluorescent Staining in the Differentiation of *Schistosoma haematobium* Live and Dead Eggs". *Medical Sciences*, 7 (4), pp. 1–8. DOI: 10.3390/medsci7040064

Garner, D.L., Pinkel, D., Johnson, L.A. y Pace, M.M. (1986). "Assessment of Spermatozoal Function Using Dual Fluorescent Staining and Flow Cytometric Analyses". *Biology of Reproduction*, 34 (1), pp. 127–138. DOI: 10.1095/biolreprod34.1.127

- Giannetto, S., Poglayen, G., Brianti, E., Gaglio, G. y Scala, A. (2005). "Sarcocystis gracilis - like sarcocysts in a sheep". *Veterinary Record*, 156 (10), pp. 322–323. DOI: 10.1136/vr.156.10.322
- Gjerde, B., de la Fuente, C., Alunda, J.M. y Luzón, M. (2020). "Molecular characterisation of five *Sarcocystis* species in domestic sheep (*Ovis aries*) from Spain". *Parasitology Research*, 119 (1), pp. 215–231. DOI: 10.1007/s00436-019-06504-6
- Godoy, R., Vilca, M., Gonzáles, A., Leyva, V. y Sam, R. (2007). "Saneamiento y detoxificación de carne de llama (*Lama glama*) inyectada con *Sarcocystis aucheniae* mediante coccion, horneado, fritura y congelado". *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 18 (1), pp. 51–56. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172007000100006&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172007000100006&lng=es&nrm=iso) [Consultado 01-09-2020]
- Gorman, T.R., Alcaíno, H.A., Muñuz, H. y Cunazza, C. (1984). "Sarcocystis sp. in guanaco (*Lama guanicoe*) and effect of temperature on its viability". *Veterinary Parasitology*, 15 (2), pp. 95–101. DOI: 10.1016/0304-4017(84)90025-6
- Harada, S., Furukawa, M., Tokuoka, E., Matsumoto, K., Yahiro, S., Miyasaka, J., Saito, M., Kamata, Y., Watanabe, M., Irikura, D., Matsumoto, H. y Sugita-Konishi, Y. (2013). [Control of Toxicity of *Sarcocystis fayeri* in Horsemeat by Freezing Treatment and Prevention of Food Poisoning Caused by Raw Consumption of Horsemeat]. Idioma: Japonés. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 54 (3), pp. 198–203. DOI: 10.3358/shokueishi.54.198
- Harrison, R.A.P. y Vickers, S.E. (1990). "Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa". *Reproduction*, 88 (1), pp. 343–352. DOI: 10.1530/jrf.0.0880343
- Henderson, J.M., Dies, K.H., Haines, D.M., Higgs, G.W. y Ayroud, M. (1997). "Neurological symptoms associated with sarcocystosis in adult sheep". *Canadian Veterinary Journal*, 38 (3), pp. 168–170. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1576552/> [Consultado 14-08-2020]
- Hernández Rodríguez, S., Gutiérrez Palomino, P.N. y Martínez Cruz, S. (2003). "Sarcocistosis", en: Sánchez Acedo, M.C. (Coord.) *Enfermedades Parasitarias Del Ganado Ovino y Caprino*. Barcelona: GEA, pp. 74–79.
- Hernández Rodríguez, S., Martínez Moreno, A. y Gutiérrez Palomino, P.N. (1999). "Parasitosis sistémicas: Sarcocistosis", en: Cordero del Campillo, M. (Coord.) *Parasitología Veterinaria*. Madrid: Mc Graw Hill Interamericana, pp. 319–328.
- Heydorn, A.O. (1985). [The development of *Sarcocystis arieticanis* n. sp.] Idioma: alemán. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 98 (7), pp. 231–241.

Heydorn, A.O. y Karaer, Z. (1986). [Schizogony of *Sarcocystis ovicanis*]. Idioma: alemán. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 99 (6), pp. 185–189.

Honda, M., Sawaya, M., Taira, K., Yamazaki, A., Kamata, Y., Shimizu, H., Kobayashi, N., Sakata, R., Asakura, H. y Sugita-Konishi, Y. (2018). "Effects of temperature, pH and curing on the viability of *Sarcocystis*, a Japanese sika deer (*Cervus Nippon centralis*) parasite, and the inactivation of their diarrheal toxin". *Journal of Veterinary Medical Science*, 80 (8), pp. 1337–1344. DOI:10.1292/jvms.18-0123

Hu, J.-J., Huang, S., Wen, T., Esch, G.W., Liang, Y. y Li, H.L. (2017). "*Sarcocystis* spp. in domestic sheep in Kunming City, China: Prevalence, morphology, and molecular characteristics". *Parasite* 24 (30), pp. 1–8. DOI: 10.1051/parasite/2017025

In Kim, S., Kim, H.J., Lee, H.J., Lee, K., Hong, D., Lim, H., Cho, K., Jung, N. y Yi, Y.W. (2016). "Application of a non-hazardous vital dye for cell counting with automated cell counters". *Analytical Biochemistry*, 492 (1), pp. 8–12. DOI: 10.1016/j.ab.2015.09.010

Jäkel, T., Henke, M., Weingarten, B., Kliemt, D. y Seidinger, S. (1997). "In vitro cultivation of the vascular phase of *Sarcocystis singaporensis*". *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44 (4), pp. 293–299. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1997.tb05669.x

Kim, J.S., Nam, M.H., An, S.S.A., Lim, C.S., Hur, D.S., Chung, C. y Chang, J.K. (2011). "Comparison of the automated fluorescence microscopic viability test with the conventional and flow cytometry methods". *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 25 (2), pp. 90–94. DOI:10.1002/jcla.20438

Korich, D.G., Mead, J.R., Madore, M.S., Sinclair, N.A. y Sterling, C.R. (1990). "Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability". *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (5), pp. 1423–1428. DOI: 10.1128/aem.56.5.1423-1428.1990

Koudela, B. y Steinhauser, L. (1984). "Evaluation Of Vitality Of *Sarcocystis* In Beef By The DAPI Fluorescence Test". *Acta Veterinaria Brno*, 53, pp. 193–197. Disponible en: [https://actavet.vfu.cz/media/pdf/avb\\_1984053030193.pdf](https://actavet.vfu.cz/media/pdf/avb_1984053030193.pdf) [Consultado 01-09-2020]

Levine, N.D. (1986). "The Taxonomy of *Sarcocystis* (Protozoa, Apicomplexa) Species". *The Journal of Parasitology*, 72 (3), pp. 372–382. DOI: 10.2307/3281676

Martínez-Navalón, B., Anastasio-Giner, B., Cano-Fructuoso, M., Sanchez-Martínez, P., Llopis-Morant, A., Perez-Castarlenas, B., Goyena, E. y Berriatua, E. (2012). "Short communication.

*Sarcocystis* infection: a major cause of carcass condemnation in adult sheep in Spain". *Spanish Journal of Agricultural Research*, 10 (2), pp. 388–392. DOI: 10.5424/sjar/2012102-523-11

Murata, R., Suzuki, J., Hyuga, A., Shinkai, T. y Sadamasu, K. (2018). "Molecular identification and characterization of *Sarcocystis* spp. in horsemeat and beef marketed in Japan". *Parasite*, 25 (27), pp. 1–8. DOI: 10.1051/parasite/2018026

Obendorf, D.L. y Munday, B. (1986). "Demonstration of schizogonous stages of *Sarcocystis gigantea* in experimentally infected sheep". *Veterinary Parasitology*, 19 (1-2), pp. 35–38. DOI:10.1016/0304-4017(86)90029-4

Papadimitriou, K., Pratsinis, H., Nebe-von-Caron, G., Kletsas, D. y Tsakalidou, E. (2006). "Rapid assessment of the physiological status of *Streptococcus macedonicus* by flow cytometry and fluorescence probes". *International Journal of Food Microbiology*, 111 (3), pp. 197–205. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.042

Rashidi, S., Kalantar, K., Rostamzadeh, D. y Hatam, G. (2018). "The Importance of Checking *Leishmania* Promastigotes Viability in the Proteomics Analysis of Secretions". *Turkiye parazitolojii dergisi*, 42 (2), pp. 245–248. DOI: 10.5152/tpd.2018.5834

Saito, M., Shibata, Y., Kubo, M. y Itagaki, H. (1997). "*Sarcocystis mihoensis* n. sp. from Sheep in Japan". *Journal of Veterinary Medical Science*, 59 (2), pp. 103–106. DOI: 10.1292/jvms.59.103

Saleque, A., Juyal, P.D. y Bhatia, B.B. (1990). "Effect of temperature on the infectivity of *Sarcocystis miescheriana* cysts in pork". *Veterinary Parasitology*, 36 (3-4), pp. 343–346. DOI:10.1016/0304-4017(90)90047-f

Savini, G., Robertson, I.D. y Dunsmore, J.D. (1996). "Viability of the sporocysts of *Sarcocystis cruzi* after exposure to different temperatures and relative humidities". *Veterinary Parasitology*, 67 (3-4), pp. 153–160. DOI: 10.1016/S0304-4017(96)01046-1

Schober, P., Boer, C. y Schwarte, L. (2018). "Correlation coefficients: Appropriate use and interpretation". *Anesthesia & Analgesia*, 126 (5), pp. 1763–1768. DOI:10.1213/ANE.0000000000002864

Shamseddin, J., Akhlaghi, L., Razmjou, E., Shojaee, S., Monavari, S.H.R., Tajik, N., Ebrahimi, S.A. y Meamar, A.R. (2015). "Conjugated linoleic acid stimulates apoptosis in RH and tehran strains of *Toxoplasma gondii*, in vitro". *Iranian Journal of Parasitology*, 10 (2), pp. 238–244. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4522299/> [Consultado 26-08-2020]

Shojaee, S., Firouzeh, N., Keshavarz, H., Jafar-Pour Azami, S., Salimi, M. y Mohebbali, M. (2019). "Nanosilver Colloid inhibits *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in vitro". *Iranian Journal of Parasitology*, 14 (3), pp. 362–367. DOI: 10.18502/ijpa.v14i3.1474

Singh, K.P. y Shah, H.L. (1990). "Viability and infectivity of sarcocysts of *Sarcocystis capracanis* of the goat after maintaining them at different temperatures". *Indian Journal of Animal Sciences*, 60 (4), pp. 429–430. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19920883140> [Consultado 01-09-2020]

Srivastava, P.S., Saha, A.K. y Sinha, S.R.P. (1986). "Effects of heating and freezing on the viability of sarcocysts of *Sarcocystis levinei* from cardiac tissues of buffaloes". *Veterinary Parasitology*, 19 (3-4), pp. 329–332. DOI: 10.1016/0304-4017(86)90080-4

Strober, W. (2015). "Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability". *Current Protocols in Immunology*, 111 (1), pp. A3.B.1-A3.B.3. DOI: 10.1002/0471142735.ima03bs111

Tasca, T., Borges, F.P., Bonan, C.D., De Carli, G.A., Battastini, A.M.O. y Sarkis, J.J.F. (2003). "Effects of metronidazole and tinidazole on NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase from intact cells of *Trichomonas vaginalis*". *FEMS Microbiology Letters*, 226 (2), pp. 379–384. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00637-2

Tenter, A.M. (1995). "Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals". *International Journal for Parasitology*, 25 (11), pp. 1311–1330. DOI: 10.1016/0020-7519(95)00068-D

Toral-Bastida, E., Garza-Rodríguez, A., Jiménez-González, D.E., García-Cortés, R., Avila-Ramírez, G., Maravilla, P. y Flisser, A. (2011). "Development of *Taenia pisiformis* in golden hamster (*Mesocricetus auratus*)". *Parasites and Vectors*, 4 (147), pp. 1–4. DOI: 10.1186/1756-3305-4-147

Unión Europea. Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios. Diario Oficial de la Unión Europea L 95/1, 7 de abril de 2017.

Van Bree, F., Bokken, G., Mineur, R., Franssen, F., Opsteegh, M., Van Der Giessen, J., Lipman, L. y Overgaauw, P. (2018). "Zoonotic bacteria and parasites found in raw meat-based diets for cats and dogs". *Veterinary Record*, 182 (2), pp. 1- 8. DOI: 10.1136/vr.104535

Verma, S.K., Lindsay, D.S., Grigg, M.E. y Dubey, J.P. (2017). "Isolation, culture and cryopreservation of *Sarcocystis* species". *Current Protocols in Immunology*, 45 (1), pp. 20D.1.1-20D.1.27. DOI: 10.1002/cpmc.32

Wang, G., Wei, T., Wang, X., Li, W., Zhang, P., Dong, M. y Xiao, H. (1988). "The morphology and life cycle of *Sarcocystis microps* n. sp. in sheep of Qinghai in China". *China Vet. Technol*, 6, pp. 9–11.