



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
E.A.P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

**DIAGNÓSTICO DE *Sarcocystis aucheniae* POR PCR SEMI-ANIDADA EN
SANGRE DE ALPACAS DE LA PROVINCIA DE HUANCAVELICA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

BACH. DEISY JANETH ROJAS VALDEZ

ASESOR:

Dr. Mblgo. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO

CO-ASESOR:

Dr. M.V. MARCO ANTONIO CABRERA GONZÁLEZ

CAJAMARCA – PERÚ

2022

COPYRIGHT ©

DEISY JANETH ROJAS VALDEZ

Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Rojas, V. 2022. **Diagnóstico de *Sarcocystis aucheniae* por PCR semi-anidada en sangre de alpacas de la provincia de Huancavelica/** Deisy Janeth Rojas Valdez.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto

Co-Asesor: Dr. M.V. Marco Antonio Cabrera González

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo – UNC
2022

**DIAGNÓSTICO DE *Sarcocystis aucheniae* POR PCR SEMI-ANIDADA EN
SANGRE DE ALPACAS DE LA PROVINCIA DE HUANCAVELICA**

AUTORA: Bach. Deisy Janeth Rojas Valdez

ASESOR: Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto

CO-ASESOR: Dr. M.V. Marco Antonio Cabrera González

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR



M.Cs. Alfonso Miranda Leiva
Presidente del jurado Evaluador



Dr. Demetrio Cieza Yrigoin
Secretario jurado Evaluador



M. Cs. Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos
Vocal jurado Evaluador

Cajamarca, 2022 – Perú



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO

PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 3:15 pm del 18 de julio del año 2022, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente 1D-102 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: "Diagnóstico de *Sarcocystis aucheniae* por PCR semi-anidada en sangre de alpacas de la provincia de Huancavelica", de la Bachiller en: Ciencias Biológicas Deisy Janeth Rojas Valdez.

Siendo las 4:15 pm del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: APROBADA, con el calificativo de 17, con lo cual la Bachiller en Ciencia Biológicas se encuentra expedita para la obtención del Título Profesional de: BIOLÓGO BIOTECNÓLOGO.

Jurado Evaluador:

Presidente: M.Cs. Alfonso Miranda Leiva

Secretario: Dr. Demetrio Cieza Yrigoin

Vocal: M.Cs. Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos

Asesor: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

Co-asesor: Dr. Marco Antonio Cabrera González

M.Cs. Alfonso Miranda Leiva
Presidente del jurado Evaluador

Dr. Demetrio Cieza Yrigoin
Secretario jurado Evaluador

M. Cs. Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos
Vocal jurado Evaluador

Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto
Asesor

Dr. Marco Antonio Cabrera González
Co-asesor

Deisy Janeth Rojas Valdez
Bachiller

A: Dedico este trabajo de investigación a mis padres por su apoyo e impulso de superación hacia mi persona.

Agradecimiento

Quiero expresar mi gratitud a Dios, a mi familia y amigos por ayudarme y alentarme en este proceso de investigación.

Agradezco al laboratorio de Biotecnología en Sanidad Animal de la Estación Experimental INIA, Baños del Inca-Cajamarca por el apoyo brindado durante la ejecución del proyecto.

Mi profundo agradecimiento a mis asesores Marco Antonio Rivera Jacinto y Marco Antonio Cabrera Gonzales quienes me apoyaron y guiaron en la ejecución de este estudio con su enseñanza de sus valiosos conocimientos, gracias a cada uno de ustedes por su paciencia, dedicación, apoyo incondicional y amistad.

Finalmente, quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento al Dr. René Molleapaza Poma, Segundo Salamanca, Delia Foroca Mamani y Norma Bujaico Mauricio principales colaboradores durante la toma de muestra en el camal de Huancavelica quienes con su enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.

Tabla de contenido

Lista de abreviaciones	xi
Glosario	xii
Resumen	xv
Abstract	xvi
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	4
MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes de la investigación	4
2.2. Bases teóricas	5
2.2.1. Sarcocistosis	5
2.2.2. Clasificación Taxonómica.....	5
2.2.3. Estadios de desarrollo.....	6
2.2.3.1. Los ooquistes.....	6
2.2.3.2. Macroquistes	7
2.2.4. Ciclo biológico	8
2.2.5. Patogenia	9
2.2.6. Epidemiología	11
2.2.7. Diagnóstico	12
2.2.8. Reacción en cadena de la polimerasa	14
2.2.8.1 Desnaturalización	15
2.2.8.2. Hibridación.....	15
2.2.8.3. Extensión.....	16
2.2.9. PCR anidada y PCR semi-anidada	16

2.2.10. Gen ARNr 18S	17
2.2.11. Gen mitocondrial 16S.....	18
2.2.12. Optimización de los parámetros de PCR.....	18
CAPÍTULO III.....	20
DISEÑO DE LA CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS	20
3.1 Nivel de investigación.....	20
3.2 Tipo y diseño de investigación.....	20
3.3. Población y Muestra.....	20
3.4. Unidad de análisis	20
3.5. Recolección y transporte de muestras y controles.....	20
3.6. Extracción de ADN de sangre de alpaca y macroquistes de <i>S. aucheniae</i>	22
3.7. Optimización y la sensibilidad analítica de la PCR semi-anidada	22
3.8. Electroforesis.....	25
3.9. La Purificación y secuenciación de productos de PCR	25
3.10. Técnicas de procesamiento y análisis de los datos.....	25
CAPÍTULO IV	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1.Resultados.	26
4.2.Discusión.....	31
CAPÍTULO V.....	37
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	37
5.1.Conclusiones	37
5.2.Recomendaciones.....	38
LISTA DE REFERENCIAS.....	39
APÉNDICES.....	49
Apéndice N° 1. Población de alpacas en el Camal de la provincia de Huancavelica.	49
Apéndice N ° 2. Recolección de muestras de Sangre de alpaca.....	49
Apéndice N° 3. Muestras de sangre de alpaca colectadas en tubos Vacutainer con EDTA.	50
Apéndice N ° 4. Alpacas adultas de la zona Granja Porcón- Cajamarca	50

Apéndice N ° 5. Toma de muestra de sangre de alpacas de la Granja Porcón- Cajamarca.....	51
Apéndice N ° 6. Carcasas de alpacas inspeccionadas en el Camal Municipal de Huancavelica.	51
Apéndice N ° 7. Carne de alpaca infectada con macroquistes de <i>S. aucheniae</i>	52
Apéndice N ° 8. Macroquistes de <i>S. aucheniae</i> aislados de carne de alpaca.	52
Apéndice N ° 9. Protocolo de extracción de ADN de sangre de alpaca.....	53
Apéndice N° 10. Observación de bandas del gen ARNr 18S de <i>Sarcocystis aucheniae</i> a diferentes concentraciones de ADN aislado de macroquistes.....	54
Apéndice N° 11. Cromatograma de secuencia ARNr 18S de <i>S. aucheniae</i> aislado de ADN extraído de sangre de alpaca (Código 27S).....	54

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura anatómica de género <i>Sarcocystis</i>	6
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Sarcocystis spp.</i> en camélidos sudamericanos.	9
Figura 3. Detección de <i>S. aucheniae</i> por la técnica molecular PCR semi-anidada. Carril 1: Control positivo (macroquiste); Carril 9: Control negativo; Carriles 4, 6 y 7 se visualiza dos bandas que representan al gen ARNr 18S del parásito (aprox. 580 pb) y el gen mitocondrial 16S de alpaca (250 pb); ambos amplificados de ADN obtenida de sangre de alpaca; Carriles 2, 3, 5 y 8 son resultados positivos a <i>S. aucheniae</i> en sangre de alpaca, sin usar primers para el gen mitocondrial 16S de alpaca.....	26
Figura 4. Detección de <i>S. aucheniae</i> por la técnica molecular PCR semi-anidada. Carril 1: Control positivo del parásito. Carril 2: Muestra positiva en sangre de alpaca. Carril 3: Control negativo. Carriles 4, 5, 6 y 7 Muestras negativas a <i>S. aucheniae</i> en sangre de alpaca.	27
Figura 5. Amplificación del gen ARNr 18S de <i>S.aucheniae</i> por PCR semi-anidada a diferentes concentraciones de ADN.....	27
Figura 6. Repetibilidad de la prueba molecular PCR semi-anidada, después de la primera amplificación en tres días, utilizando dos réplicas cada día. En la parte superior de cada imagen se indican los días y las réplicas realizadas por cada muestra.....	28

Índice de tablas

Tabla 1: Cebadores utilizados para amplificar el gen ARNr 18S de <i>S. aucheniae</i> y el gen mitocondrial 16S de alpaca. Modificado de Decker-Franco et al (2018).....	24
Tabla 2: Condiciones de ciclaje de la PCR semi-anidada. Tomado de Decker-Franco et al (2018).	24
Tabla 3. Comparación de la detección de <i>S. aucheniae</i> en alpacas por la técnica PCR semi-anidada en alpacas.	29
Tabla 4. Porcentaje de resultados positivos y negativos a <i>S. aucheniae</i> por PCR semi-anidada.	29

Lista de abreviaciones

ARNr: Ácido Ribonucleico ribosómico.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

EDTA: El ácido etilendiaminotetraacético

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

Glosario

Especificidad:

Se define como la proporción o porcentaje de individuos correctamente diagnosticados con ausencia de la afección por la prueba de diagnóstico en estudio, es decir, es la proporción de verdaderos negativos que fueron correctamente identificados por el test, del total de individuos sanos según la prueba de referencia (Jacobson, 1998). De lo anterior se deduce que la especificidad es el cociente entre los verdaderos negativos dividido por la suma de verdaderos negativos y falsos positivos (Bravo y Cruz, 2015).

Esquizogonia:

Tipo de reproducción asexual de un parásito en su estado de esporozoito, mediante fisión múltiple dentro del organismo hospedero, dando lugar a los merozoitos (Mullens y Murillo, 2017).

Recumbencia.

Se refiere al animal (paciente) que está acostado y es incapaz de pararse por sus propios medios de manera temporal o permanente (Fowler, 2008). Es un signo que puede observarse cuando la alpaca tiene una alta densidad parasitaria en su organismo.

Repetitibilidad:

La repetibilidad mide la variación de los resultados obtenidos con la prueba al analizar muestras idénticas en un laboratorio con un solo operador. La repetibilidad consiste en realizar la prueba utilizando el mismo protocolo, los mismos reactivos y los mismos controles (Waugh y Clark, 2021).

Sensibilidad Analítica:

Es la capacidad de una prueba para detectar concentraciones muy bajas de una molécula o analito (por ejemplo: ADN) en una muestra biológica. Se la denomina también límite de detección, el cual es la concentración real más baja de un analito en una muestra dada que se puede detectar de forma consistente con precisión aceptable, pero no necesariamente cuantificada, en condiciones de laboratorio y a partir de un tipo definido de muestra (Burd, 2010).

Carcasa:

Se refiere al cuerpo del animal al que se le ha quitado los órganos, la cabeza y las extremidades (Quispe *et al.*, 2012).

**DIAGNÓSTICO DE *Sarcocystis aucheniae* POR PCR SEMI-
ANIDADA EN SANGRE DE ALPACAS DE LA PROVINCIA DE
HUANCAVELICA**

Resumen

El protozoo *Sarcocystis aucheniae* es el agente causal de sarcocistosis en llamas y alpacas; la enfermedad en su fase aguda es generalmente asintomática, es decir que no muestra signos específicos, aunque el parásito está circulando en sangre. El presente estudio tuvo como objetivo establecer la sensibilidad analítica y especificidad de la técnica molecular PCR semi-anidada para el diagnóstico de *S. aucheniae* en sangre de alpacas de la provincia de Huancavelica. Para determinar la sensibilidad analítica de la PCR semi-anidada se utilizó ADN genómico extraído de macroquistes de *S. aucheniae* con el que se realizó la prueba a concentraciones muy bajas (1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 1 pg, y 0.01 pg). La especificidad de la PCR semi-anidada se determinó al comparar la prueba molecular en sangre con el método de necropsia; para ello se colectó muestras de sangre de alpacas de Huancavelica (n=8) y de Cajamarca (n=7) de donde también se obtuvo ADN para análisis molecular, habiéndose inspeccionado previamente las carcasas de los animales. Se colectó 42 muestras adicionales de sangre de alpacas de Huancavelica con el fin de detectar el gen ARNr18S de *S. aucheniae* por PCR semi-anidada, teniendo como control positivo al ADN de macroquiste y como control negativo sangre de alpaca negativa al parásito. La sensibilidad analítica de la PCR semi-anidada tuvo como límite de detección 1 pg de ADN y la especificidad de la técnica fue de 80 %. El 32% de alpacas de Huancavelica fue positivo al parásito por PCR semi-anidada. Concluimos que la PCR semi-anidada tuvo un buen límite de detección y alta especificidad para diagnosticar *S. aucheniae* en sangre de alpaca.

Palabras clave: Diagnóstico; PCR semi-anidada; *S. aucheniae*; Alpaca

Abstract

The protozoan *Sarcocystis aucheniae* is the causal agent of sarcocystosis in llamas and alpacas; the disease in its acute phase is generally asymptomatic, that is, it does not show specific signs, although the parasite is circulating in the blood. The objective of this study was to establish the analytical sensitivity and specificity of the semi-nested PCR molecular technique for the diagnosis of *S. aucheniae* in the blood of alpacas from the province of Huancavelica. To determine the analytical sensitivity of the semi-nested PCR, genomic DNA extracted from macrocysts of *S. aucheniae* was used, with which the test was performed at very low concentrations (1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng, 1 pg, and 0.01 pg). The specificity of the semi-nested PCR was determined by comparing the molecular test in blood with the necropsy method; For this, blood samples were collected from alpacas from Huancavelica (n=8) and Cajamarca (n=7) from which DNA was also obtained for molecular analysis, having previously inspected the carcasses of the animals. Forty-two additional blood samples were collected from alpacas from Huancavelica in order to detect the *S. aucheniae* rRNA18S gene by semi-nested PCR, using macrocyst DNA as a positive control and blood from parasite-negative alpaca as a negative control. The analytical sensitivity of the semi-nested PCR had a detection limit of 1 pg of DNA and the specificity of the technique was 80%. The 32% of alpacas from Huancavelica were positive for the parasite by semi-nested PCR. We conclude that semi-nested PCR had a good detection limit and high specificity for diagnosing *S. aucheniae* in alpaca blood.

Keywords: Diagnosis; semi-nested PCR; *S. aucheniae*; Alpaca

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La crianza de alpacas es una actividad económica importante para una parte significativa de la población altoandina del Perú debido a que de estos camélidos se obtienen diversos productos como carne, fibra, cueros, pieles y abono que son comercializados (Aguirre, 2004). Las alpacas son animales aptos para la ganadería comercial en la sierra por su capacidad de adaptación a condiciones ambientales extremas como la altitud, la falta de agua, las pendientes pronunciadas y las heladas presentes en esta región (Wheeler, 1991). Su carne se caracteriza por su alto contenido de proteínas y bajo colesterol en comparación a la carne de res; también es atractiva para la cocina gourmet local e internacional, constituyendo una fuente de ingresos adicional para los productores (Vilca, 1991; Leguía, 1991). Sin embargo, las alpacas que son criadas en malas condiciones sanitarias pueden desarrollar enfermedades parasitarias como la sarcocistosis, afectando esta producción y los beneficios que aportan estos camélidos a la comunidad.

La sarcocistosis es una enfermedad causada por el parásito *Sarcocystis aucheniae* que afecta a diversos camélidos sudamericanos que incluyen a las llamas y alpacas (Saeed *et al.*, 2018). De hecho, se han reportado varios casos de llamas y alpacas con esta parasitosis en países como Perú, Bolivia, Argentina, Chile y Colombia; siendo Perú el más afectado ya que alberga a la mayor población de alpacas en Sudamérica, estimada en 95% (Romero *et al.*, 2017; Saeed *et al.*, 2018). En regiones alto andinas del país, como por ejemplo Huancavelica, se ha reportado prevalencias mayores al 70% de sarcocistosis

en alpacas diagnosticadas a través de necropsias, en las que se observa la presencia de macroquistes del parásito en el músculo esquelético del animal (Medrano, Hung y Rubio, 2006; Gomez y Mallqui, 2018). Esto también causa un impacto negativo en la comercialización de las carcasas, trayendo como consecuencia pérdidas económicas para los criadores debido a que los animales parasitados son decomisados.

En cuadros agudos de sarcocistosis en alpaca se han presentado síntomas como miositis eosinofílica y aborto, lo cual se asociaría a la ingesta elevada de esporocistos (Gabor *et al.*, 2010; La Perle *et al.*, 1999). Sin embargo, la sarcocistosis es generalmente asintomática en la fase aguda porque no muestra signos específicos y es poco probable que se detecten macroquistes en los tejidos durante esta etapa ya que el parásito estaría solo en sangre (Saeed *et al.*, 2018). Frente a esta problemática, se ha diseñado una técnica de PCR semi-anidada que detecta el parásito en la sangre de llamas (Decker Franco *et al.*, 2018), pero ésta aún no ha sido aplicada en alpacas ni se ha puesto a prueba en nuestro país para diagnosticar el parásito en su etapa temprana, es decir, cuando está circulando en sangre.

Por otro lado, la aplicación de la PCR para el diagnóstico de *S. aucheniae* implica que la técnica sea optimizada y, lo que es más importante, que se dé a conocer toda la metodología necesaria para trabajarla y repetirla en otros lugares, ya que en los artículos científicos no se describen todos los pasos y volúmenes de reactivos a utilizar, lo cual facilitaría el proceso y tiempo de trabajo en el laboratorio.

Por la problemática descrita se formuló la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la sensibilidad analítica y especificidad de la PCR semi-anidada para el diagnóstico de *S. aucheniae* en sangre de alpacas de la provincia de Huancavelica?

Asimismo, se planteó la hipótesis de investigación en la que se afirmó que la técnica molecular PCR semi-anidada tiene una sensibilidad analítica de 1 ng/uL de ADN y una especificidad del 80 % para detectar *S. aucheniae* en sangre de alpacas de la provincia de Huancavelica.

Debido a todo lo descrito anteriormente, la presente investigación tuvo el objetivo de establecer la sensibilidad analítica y especificidad de la técnica molecular PCR semi-anidada para el diagnóstico de *S. aucheniae* en sangre de alpacas de la provincia de Huancavelica. Los objetivos específicos del estudio fueron: a) Optimizar el protocolo de PCR semi-anidada para la detección de *S. aucheniae* en sangre de alpacas de la provincia de Huancavelica. b) Determinar la concentración más baja de ADN del parásito para amplificar el gen ARNr 18S de *S. aucheniae* mediante PCR semi-anidada con la finalidad de especificar la sensibilidad analítica de la técnica molecular. c) Determinar la especificidad de la técnica PCR semi-anidada para el diagnóstico de *S. aucheniae* en sangre de alpacas.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Los investigadores Heckeroth y Tenter (1999) desarrollaron dos técnicas de PCR anidada para identificar dos especies diferentes de *Sarcocystis*, basadas en secuencias únicas de genes de ARN ribosómicos de subunidades pequeñas de *Sarcocystis arieticanis* y *Sarcocystis tenella*. Las técnicas moleculares permitieron la diferenciación de infecciones de estas dos especies en muestras de sangre de ovejas. Se obtuvieron resultados positivos de la PCR en las primeras fases de multiplicación del parásito en ovejas que fueron infectadas experimentalmente de las cuales cinco se infectaron con *S. tenella* y seis con *S. arieticanis*. Se concluyó que las técnicas tuvieron una buena especificidad y sensibilidad analítica para diagnosticar las infecciones de estas dos especies en la fase aguda de la enfermedad.

Martin *et al.* (2016), demostraron que se puede detectar *S. aucheniae* en sangre de llama utilizando PCR semi-anidada. Se optimizó las condiciones de PCR usando ADN genómico extraído de bradizoítos de macroquistes y se amplificó la región específica del gen ARNr 18S de *S. aucheniae*. La PCR semi-anidada permitió detectar infecciones naturales por *S. aucheniae* en llamas de dos regiones andinas de Argentina, Buenos Aires Pampa (n = 3) y Jujuy Puna (n = 4), reportándose como positivas al segundo grupo que correspondían a llamas pastoreadas libremente. A pesar de su buena sensibilidad, esta técnica no fue validada en campo y su aplicación fue realizada en una población no significativa.

En otro trabajo de investigación la técnica mejorada de la PCR semi-anidada demostró ser altamente sensible; se amplificó la región específica del gen ARNr 18S de *S. aucheniae* y del gen mitocondrial 16S de *Lama glama*. Este método se aplicó en muestras de sangre de llamas de Argentina y Bolivia (n = 225), y resultó el 18,7% positivo para *S. aucheniae* y la sensibilidad de la técnica fue de 27% y su especificidad 75% (Decker Franco *et al.*, 2018).

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Sarcocistosis

La sarcocistosis es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo *Sarcocystis aucheniae* que produce macroquistes en el músculo esquelético de alpacas según estudios basados en el gen ARNr 18S (Holmdahl *et al.*, 1999). De hecho, tiene como hospederos intermediarios a los camélidos sudamericanos que incluyen alpacas (*Vicugna pacos*), llamas (*Lama glama*) y guanacos (*Lama guanicoe*) (Regensburger *et al.*, 2015; More *et al.*, 2016). Estos camélidos también desarrollan la enfermedad con la especie *Sarcocystis mansoni* que únicamente produce microquistes en el músculo cardíaco (More *et al.*, 2016).

2.2.2. Clasificación Taxonómica

Los protozoarios del género *Sarcocystis* pertenecen al Phylum Apicomplexa (Levine, 1970), Clase Sporozoasida, Subclase Coccidiasina (Leuckart, 1879), orden Eucoccidiorina (Levine, 1986) y familia Sarcocystidae (Poche, 1913). Presentan estructuras propias del phylum Apicomplexa (Figura 1), un anillo polar rodeado por una banda de microtúbulos, un cono truncado de fibrillas denominado conoide que, junto a

las roptrias, los micronemas y una pequeña boca llamada microporo conforman el complejo apical (Decker, 2015).

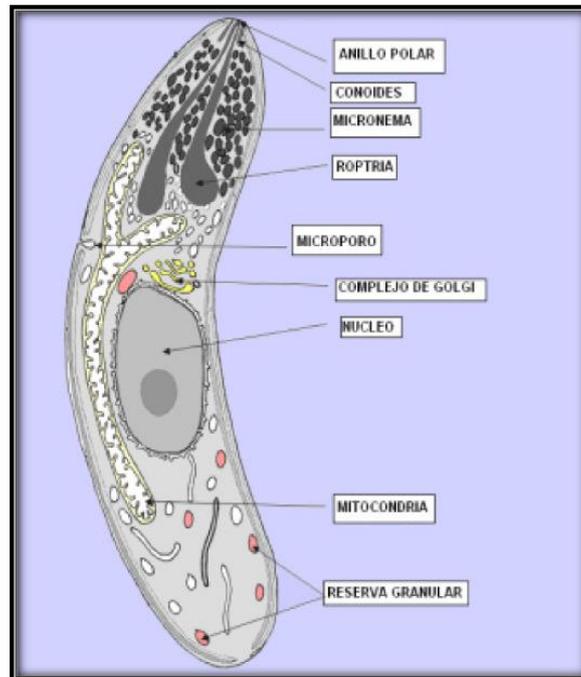


Figura 1. Estructura anatómica de género *Sarcocystis*.

Fuente: Tomado de Decker (2015).

2.2.3. Estadios de desarrollo

Sarcocystis aucheniae posee diferentes formas parasitarias dentro de su ciclo biológico, entre ellas se encuentran los ooquistes y sarcoquistes, principales formas infectivas que liberan el perro y la alpaca respectivamente.

2.2.3.1. Los ooquistes

Los ooquistes esporulados son eliminados a través de las heces y tienen una membrana delicada que al romperse liberan dos esporoquistes (pueden estar libres o aun encapsulados) y éstos a su vez contienen cuatro esporozoitos cada uno (Urquhart *et al.*,

2001). Poseen una forma elipsoide y también presentan un residuo granular disperso en su interior en forma de mórula ubicada en la parte lateral de cada uno de los polos (Cordero del campillo *et al.*, 1999). Los esporoquistes de *S. auheniae* tienen un tamaño de 15,16 -16,10 x 10,48-11,20 μm (White, 1998). El perro elimina estas formas parasitarias en sus heces (Cornejo *et al.*, 2007), lo que constituye una fuente de contaminación en el agua y los alimentos que consumen los hospederos intermediarios (Dubey *et al.*, 2015).

2.2.3.2. Macroquistes

Los macroquistes también llamados sarcoquistes macroscópicos son de color amarillo pálido, tienen forma de arroz y están rodeados por una densa y secundaria pared de quiste que mide 50 μm de espesor (Regensburger *et al.*, 2015; More *et al.*, 2016). Se localizan generalmente en el músculo esquelético del hospedero intermediario en partes como cuello, muslo, esófago, diafragma e intercostales (Valderrama, 1999). Cada macroquiste alberga de 10 a 15 millones de bradizoitos (13 a 18 x 3 a 5 μm), que tienen forma ovalada y alargada; se encuentran empaquetados en sacos separados por tabiques. Cada bradizoíto contiene muchos micronemas (orgánulos secretores) y poseen gránulos de amilopectina ubicados en las mitades anterior y posterior respectivamente (Regensburger *et al.*, 2015; More *et al.*, 2016). Es importante resaltar que se ha realizado estudios recientes donde las secuencias de genes de ARNr 18S de macroquistes tenían una homología del 98 a 99 % con las secuencias publicadas anteriormente de *S. aucheniae* en camélidos sudamericanos (Holmdahl *et al.*, 1999; Carletti *et al.*, 2013; Regensburger *et al.*, 2015; More *et al.*, 2016).

2.2.4. Ciclo biológico

El ciclo vital de *S.aucheniae* aún no ha sido completamente investigado, sin embargo puede ser entendido en base a estudios realizados en otras especies de *Sarcocystis* (Saeed *et al.*, 2018). Los protozoos de este género son intracelulares obligatorios y su ciclo de vida implica merogonia (desarrollo asexual), gametogonia y esperogonia (desarrollo sexual) (Gajadhar *et al.*, 2015; Marchiondo, Cruthers y Fourie, 2019). Posee un ciclo de vida indirecto ya que requiere de dos hospedadores obligatorios (Leguía, *et al.*, 1989). Realiza su reproducción asexual en un herbívoro como alpacas y llamas y su reproducción sexual en un carnívoro (Decker Franco *et al.*, 2018); y se le atribuye al perro como hospedero definitivo (Cornejo *et al.*, 2012; Zacarías *et al.*, 2013) ya que se demostró que perros infectados experimentalmente con macroquistes de *S. aucheniae* pueden eliminar hasta 37.000 esporoquistes por gramo de heces por animal después de 29 días post-infección (Cornejo *et al.*, 2007).

El camélido se infecta por la ingesta de ooquistes esporulados o esporoquistes del medio ambiente, los esporozoítos se liberan en el intestino y luego penetran las células endoteliales de los vasos sanguíneos donde realizan un número desconocido de ciclos de esquizogonia; los merozoitos que surgen de los esquizontes migran a través de la sangre hasta llegar a los miocitos (Decker Franco *et al.*, 2018). Los merozoitos usan mecanismos de invasión para formar dentro de los miocitos una vacuola parasitófora que se va a convertir en quiste el cual en su interior alberga a los bradizoitos (Saeed *et al.*, 2018). El huésped definitivo se infecta al consumir quistes, luego los parásitos se liberan en su intestino, invadiendo células epiteliales intestinales formándose un cigoto; éste se convierte en esporoquiste el cual se libera con las heces al medio ambiente (figura 2) (Decker Franco *et al.*, 2018).

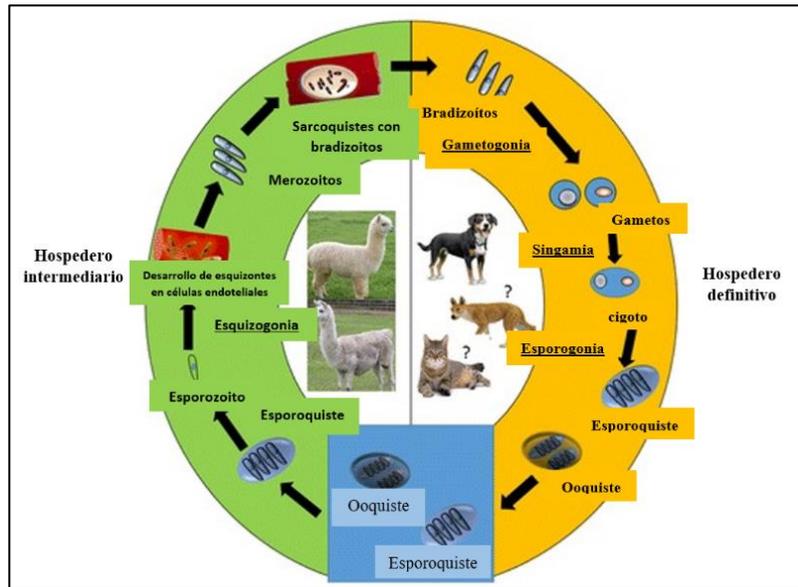


Figura 2. Ciclo de vida de *Sarcocystis spp.* en camélidos sudamericanos.

Fuente: Tomado de Saeed *et al.* (2018).

2.2.5. Patogenia

En el hospedero intermediario, la patogenia de esta enfermedad no ha sido abordada por completo. Estudios reportan que genera una destrucción masiva del endotelio vascular de los capilares y arteriales en la mayoría de órganos del animal como resultado de la reproducción asexual del parásito (Leguía y Casas, 1999). Generalmente la cantidad y distribución de macroquistes en el hospedero depende de varios factores que aún faltan investigar que incluyen el número de esporoquistes ingeridos y el estado inmunitario (Fayer, Esposito y Dubey, 2015; Dubey *et al.*, 2016). En crías de alpacas infectadas con esporoquistes microscópicos se demostró una disminución de su peso corporal y hematocrito; y con altas dosis del parásito se obtuvo una mortalidad del 92 % (Chávez *et al.*, 2008).

En alpaca se ha presentado síntomas en casos fatales como recumbencia, hipotermia y falta de respuesta a estímulos externos, disnea, marcados temblores musculares, disminución de la producción de leche y aborto (la Perle *et al.*, 1999). Se observó también hemorragias en las miofibras del músculo esquelético con macroquistes. Se ha reportado que causa miositis necrosante e histiocítica con la observación de estructuras subcutáneas parecidas a abscesos en todo el cuello y gran cantidad de eosinófilos en la parte cervical (Gabor *et al.*, 2010). En hematología se mostró hiperproteinemia e hiperglobulinemia y eosinofilia periférica. En necropsia se ha encontrado múltiples lesiones caseosas pálidas, blancas y estriadas en la musculatura craneal y cervical así también, se observó necrosis en varias partes de los tejidos con presencia de histiocitos, células gigantes y linfocitos (Gabor *et al.*, 2010). Estos estudios demuestran que el desarrollo asexual del parásito genera necrosis en la musculatura, sin embargo, no es suficiente para causar enfermedad o la muerte del animal (Dubey *et al.*, 2016).

La fase aguda de la sarcocistosis es la más perjudicial, dependiendo de la cantidad de esporocistos o esporoquistes ingeridos, el animal puede presentar pérdida de peso, aborto espontáneo, anorexia y muerte, comúnmente después de 20 a 30 días post-infección (Leguía y Clavo, 1989). Estos signos aparecen en la segunda fase de generación de esquizontes de parásito cuando salen hacia el torrente sanguíneo, destruyendo muchas células vasculares (arterias) que causan hemorragia en diferentes órganos del cuerpo (Sam, 1988; Dubey, 1989; Leguía y Clavo, 1989). Las infecciones crónicas en llamas y alpacas se traducen en la presencia de macroquistes en músculo esquelético de estos animales (Vargas, 2018).

2.2.6. Epidemiología

En la mayoría de los casos, las infecciones naturales en camélidos sudamericanos son asintomáticos. Se ha encontrado prevalencias de infecciones por *S. aucheniae* en alpacas del 74 a 100 % y en llamas del 34 al 100% (Andes Viscarra *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 2017; Schnake *et al.*, 2016). Sin embargo, para determinar las cifras de prevalencia se debe tener en cuenta, los métodos de diagnóstico utilizados, la edad del animal y el tipo de tejido analizado.

Las prácticas de manejo y la presencia de perros influyen en la exposición de *Sarcocystis* en camélidos. Se ha demostrado una mayor prevalencia (50 %) en llamas criadas en malas condiciones sanitarias y en presencia de perros pastores a diferencia de las que han sido criadas en buenas condiciones sanitarias y en ausencia de perros pastores (Romero *et al.*, 2017) . De hecho, los esporoquistes infecciosos en las heces del perro pueden permanecer por varios meses y su maduración no depende de las condiciones climáticas (Savini, Robertson y Dunsmore, 1996) lo que podría contribuir a las altas tasas de infección en estos camélidos si permanecen en malas condiciones sanitarias (Romero *et al.*, 2017) .

La edad podría ser un factor de riesgo en las infecciones por *Sarcocystis* en alpacas y llamas ya que se demostró que los animales de mayor edad albergan con más frecuencia los macroquistes en comparación a las más jóvenes (Castro *et al.*, 2004; Rooney *et al.*, 2014; Romero *et al.*, 2017). El género y la raza también pueden contribuir al desarrollo de macroquistes, por ejemplo, en un estudio se demostró que las hembras y llamas con pelo largo presentaron tasas de infección más altas que los machos y llamas de pelo corto (Rooney *et al.*, 2014). Por otro lado, las alpacas pueden infectarse desde el nacimiento

por recibir poca protección a través del calostro (Leguía y Clavo, 1989). La alpaca puede contraer la enfermedad desde el nacimiento, al recibir muy poca protección a través del calostro (Leguía y Clavo, 1989).

2.2.7. Diagnóstico

En la actualidad no hay disponibilidad de pruebas estándares o comerciales para diagnosticar la sarcocistosis en camélidos sudamericanos. Se considera como método de diagnóstico definitivo para esta enfermedad a la observación de macroquistes en músculo del animal muerto, siendo el más utilizado en la mayoría de estudios (Beldomenico *et al.*, 2003; Rooney *et al.*, 2014; Schnake *et al.*, 2016; Decker Franco *et al.*, 2018; Leguía y Santiago, 2018). Sin embargo, es un reto el diagnóstico de la sarcocistosis aguda porque no puede presentar síntomas o signos específicos y en esta etapa la probabilidad de encontrar macroquistes en músculo es muy baja (Saeed *et al.*, 2018).

Se han realizado estudios para evaluar la diversidad genética de *Sarcocystis* y diagnosticar al parásito mediante métodos moleculares en camélidos. En alpacas se desarrolló el primer estudio de identificación molecular de macroquistes de *S. aucheniae* a través de la amplificación del gen ARNr *18S* por PCR convencional, también se realizó el secuenciamiento, y resultó que su relación filogenética con otras especies de *Sarcocystis spp.* como las que infectan a ganado bovino y búfalo, es lejana (Holmdahl *et al.*, 1999). Posteriormente, se amplificó el gen ARNr *18S* de macroquistes de *S. aucheniae* provenientes de llamas y guanacos; y la comparación de secuencias de ARNr *18S* de las diferentes especies de camélidos sudamericanos mostraron una alta identidad de secuencia, indicando que *S. aucheniae* infecta a alpacas llamas y guanacos (Carletti *et al.*, 2013; Regensburger *et al.*, 2015). Sin embargo, estos estudios no tuvieron valor para

detectar *Sarcocystis* en sangre ya que se aisló ADN de un quiste desarrollado.

A partir de lo anteriormente descrito se deduce que se puede realizar un diagnóstico molecular, y a partir de ello se desarrolló técnicas moleculares para el diagnóstico temprano de *S. aucheniae* en sangre. Por ejemplo, Martin *et al.* (2016), demostraron que se puede detectar *S. aucheniae* en sangre de llama utilizando PCR semi-anidada ya que pudieron identificar al parásito en llamas naturalmente infectadas de las regiones andinas de Argentina. En otro trabajo de investigación la técnica mejorada de la PCR semi-anidada demostró tener una buena sensibilidad analítica ya que se pudo detectar concentraciones bajas de parásito en sangre. También la técnica molecular fue específica porque se diseñó primers que solo se unen a la región específica del gen ARNr 18S de *S. aucheniae* y no a otras especies de parásitos similares, siendo útil para diagnosticar el parásito en muestras de sangre.

Por otro lado, otros estudios han utilizado métodos serológicos para diagnosticar la sarcocistosis en camélidos sudamericanos; entre ellos se desarrolló el método serológico ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas indirecto) para detectar anticuerpos anti-*Sarcocystis* en suero de llamas dónde estaría presente un antígeno soluble llamado MACSA el cual fue aislado de macroquistes recolectados de alpacas naturalmente infectadas, pero, se reportó una baja sensibilidad y especificidad de la prueba con de un 65 % para cada una, concluyendo que la prueba era inadecuada para la detección del parásito en animales individuales (Andes Viscarra *et al.*, 2003).

Más adelante, se aplicó la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes para determinar la seroprevalencia de sarcocistosis en llamas, donde se utilizó antígenos

derivados de bradizoítos de *S. aucheniae* y *S. cruzi* (afecta a bovinos). Se concluyó que la prueba detecta anticuerpos anti-*Sarcocystis* en el 96% de las muestras de suero de llama, sin embargo, se observó reactividad cruzada entre las dos especies de *Sarcocystis* ya que se usaron dos tipos de bradizoitos, lo cual indica que la prueba no sería confiable para detectar una sola especie (Moré *et al.*, 2008).

Últimamente se ha desarrollado la técnica ELISA para la detección de anticuerpos anti- *Sarcocystis* en suero de llama; en este estudio se aisló el antígeno proteico sa23 una fracción inmunogénica soluble de 23 kDa de macroquistes de *S. aucheniae*, sin embargo, esta técnica no fue comparada con un estudio molecular o con la necropsia. Se concluye que se puede detectar *S. aucheniae* mediante métodos serológicos, pero en estos estudios no hubo claridad de la naturaleza de los antígenos utilizados o se verificó el diagnóstico con métodos moleculares e histopatológicos (Romero *et al.*, 2017).

2.2.8. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática que consiste en la síntesis *in vitro* de millones de copias de una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia diana es copiada fielmente (Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2010). Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células (Villegas, Sánchez y Chuaire, 2009). Los elementos para que se lleve a cabo la reacción son el templado o molde (ADN), la enzima, los oligonucleótidos o Primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg^{+}), una solución amortiguadora y H_2O (Carriço *et al.*, 2013). Todos estos

elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión (Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2010).

2.2.8.1 Desnaturalización

El primer paso en el ciclo térmico empieza con el proceso denominado inicialización con la finalidad de activar la polimerasa. Tiene una duración de 1 a 10 minutos a una temperatura de 94 °C a 96 °C, dependiendo del tipo de plantilla de ADN y de la enzima polimerasa. Luego sigue la etapa de desnaturalización que se realiza generalmente a una temperatura de 93 °C y 98 °C; en esta etapa los enlaces de hidrógeno en el ADN de doble cadena se rompen formando dos moléculas separadas de ADN de cadena sencilla que servirán como templado para el siguiente paso (Sreejith *et al.*, 2018). El tiempo necesario en este paso depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de guanina y citosina es alta, se requiere más tiempo para romper sus uniones porque el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que es (adenina y timina) (Alves *et al.*, 2009).

2.2.8.2. Hibridación

Los cebadores se unen a sus secuencias complementarias en el molde de ADN de cadena sencilla y la formación del complejo templado-primers se realiza a una óptima temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) la cual generalmente oscila entre 50-60 °C (Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2010). La estabilidad y especificidad del complejo será eficiente si se ha realizado un correcto diseño de los primers y se ha sometido a una temperatura adecuada (Villegas, Sánchez y Chuaire, 2009).

2.2.8.3. Extensión

En esta etapa, la Taq polimerasa empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida para sintetizar nuevas cadenas de ADN, la enzima actúa sobre el complejo templado-primers y adiciona desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) complementarios para formar las cadenas completas de ADN requerida (Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2010). La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3' a una temperatura óptima de 72 °C para que la enzima funcione de manera correcta (Villegas, Sánchez y Chuaire, 2009). Luego, se habrán formado los amplicones con un tamaño deseado con el número total de pares de bases (pb) apropiados y conocidos por el investigador. Al final de la reacción, para comprobar si la secuencia blanco de interés se amplificó, los amplicones o productos de PCR son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2010).

2.2.9. PCR anidada y PCR semi-anidada

La PCR anidada se diseñó a partir de la PCR convencional con algunas modificaciones para tener una mejor sensibilidad y especificidad (Carr, Williams y Hayden, 2010). La PCR anidada consiste en dos reacciones de PCR sucesivas y en usar dos pares de cebadores que se dirigen a un solo Locus (Marmioli y Maestri, 2007; Carr, Williams y Hayden, 2010) . En la primera reacción se utiliza el primer par de cebadores para amplificar la secuencia diana; en la segunda reacción el otro par de cebadores se une a sitios del primer amplicón y se obtiene una secuencia amplificada interna más corta (Marmioli y Maestri, 2007). La PCR semi-anidada es otra forma de amplificar una secuencia diana, se deriva de la PCR anidada con ciertas modificaciones donde también se realiza dos rondas de reacción en cadena de la polimerasa, pero se utiliza el mismo

cebador para ambas rondas (un total de tres pares de cebadores) es vez de usar dos pares de cebadores diferentes en ambas rondas (Perera y Acevedo, 2018). La PCR semi-anidada también es altamente sensible en comparación con la PCR anidada que podría utilizarse para amplificar y detectar un gen específico de un parásito (Perera y Acevedo, 2018).

2.2.10. Gen ARNr 18S

Los genes que codifican el ARNr 18S se denominan ADN ribosomal 18S, situado en el núcleo de las eucariotas (Torres-Machorro *et al.*, 2010). Los organismos eucariotas poseen ribosomas 80S compuestos por una subunidad ribosómica grande (60S), y la subunidad ribosómica pequeña (40S) (Saini y Kumar, 2021). El ARN ribosómico 18S (ARNr 18S) es parte del ARN ribosómico y es el ARN estructural que compone la subunidad ribosómica eucariota pequeña (40S) de los pequeños ribosomas citoplasmáticos eucariotas, y por lo tanto es uno de los componentes básicos de todas las células eucariotas (Sorof y Cheng, 2015).

La utilidad de este gen presenta ventajas debido a que las regiones flanqueantes de la secuencia de ADNr 18S se encuentran muy conservadas y evolucionan lentamente en los distintos organismos, lo que permite el uso de cebadores universales (Panek *et al.*, 2013). Además, es importante señalar que estas secuencias se encuentran repetidas en gran cantidad de veces en el genoma facilitando la extracción, amplificación y secuenciación del material genético (Fayet-Lebaron, Kiss y Jády, 2010).

Por las ventajas mencionadas anteriormente el gen ARNr 18S ha sido estudiado y empleado como blanco para elucidar la identidad y presencia de parásitos en sangre utilizando diferentes técnicas moleculares (Rougemont *et al.*, 2004). En el caso del gen

ARNr 18S de *S. aucheniae* se ha empleado por algunos estudios (Martin *et al.*, 2016; Decker Franco *et al.*, 2018) porque la región de este gen es polimórfica, permitiendo el desarrollo de técnicas específicas de detección de especies (Heckerroth y Tenter, 1999; Carletti *et al.*, 2013).

2.2.11. Gen mitocondrial 16S

El ADN mitocondrial está presente en los eucariotas y es una molécula relativamente pequeña, abundante y fácil de aislar (Fonseca *et al.*, 2008) . En los mamíferos, el genoma mitocondrial es una molécula de ADN bicatenaria, circular y cerrada de aproximadamente 16,6 kb que contiene los genes que codifican dos tipos de ARNr (12S y 16S) (Taanman, 1999) y 22 ARNt (ácido ribonucleico de transferencia) que son necesarios para la síntesis de proteínas mitocondriales; estos genes están localizados en la mitocondria que posee sus propios sistemas de replicación, transcripción y traducción de ADN específicos de orgánulos (Attardi, 1988; Wallace, 1999; Pirger, Rácz y Kiss, 2009). Es necesario resaltar que la estructura y la organización de los genes del ADN mitocondrial está muy conservada entre los mamíferos (Taanman, 1999).

2.2.12. Optimización de los parámetros de PCR

Se están desarrollando numerosas y diversas aplicaciones de la PCR en todas las disciplinas de la patología diagnóstica y la investigación, y ningún protocolo único es apropiado para todas las situaciones (Cao *et al.*, 2004). La optimización de la PCR requiere un delicado equilibrio entre la amplificación de productos específicos y evitar la producción de productos no específicos, teniendo en cuenta cada paso, desde la extracción de la plantilla de ADN hasta los tiempos y temperaturas de los ciclos, debe considerarse detenidamente (Cao *et al.*, 2004).

La optimización de la concentración de los componentes de la reacción (cloruro de magnesio, ADN polimerasa, trifosfatos de nucleótidos y cebadores) y la selección de la temperatura de hibridación y la duración del tiempo para cada paso del ciclo térmico influirán en la sensibilidad y especificidad de la reacción (Singh, 1997). La optimización de la PCR se realiza cambiando las concentraciones de reactivos y comprobando a qué concentración se obtiene bandas de buena intensidad; la concentración óptima de cada reactivo y los tiempos óptimos y temperaturas óptimas de los ciclos se deben determinar experimentalmente (Singh, 1997).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE LA CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

3.1 Nivel de investigación

Descriptivo-Transversal.

3.2 Tipo y diseño de investigación

Tipo de investigación: Investigación básica.

Diseño de investigación: No experimental.

3.3. Población y Muestra

La población estuvo constituida por 120 alpacas sacrificadas en el camal de Huancavelica en periodo de tiempo que fue destinado a la colecta de muestras. Por conveniencia se eligieron al azar cincuenta alpacas adultas (muestra), de ambos sexos, provenientes de la provincia de Huancavelica.

3.4. Unidad de análisis

Cada muestra de sangre de las alpacas adultas.

3.5. Recolección y transporte de muestras y controles

Las muestras de sangre para el análisis molecular fueron colectadas asépticamente en tubos Vacutainer de 3 mL con anticoagulante EDTA (Decker Franco *et al.*, 2018) por personal especializado del SENASA-Huancavelica (Apéndice N °2). La sangre se obtuvo de la vena yugular de 50 alpacas adultas del camal municipal de la provincia Huancavelica (Apéndice N °1). A ocho de las alpacas muestreadas no se les encontró

presencia de macroquistes durante la inspección del músculo cervical y de sus carcasas (Apéndice N°6). Las muestras fueron acondicionadas y enviadas en un cooler con gel refrigerante a 4 °C hasta el Laboratorio de Investigación de Biotecnología Animal de la Estación Experimental del INIA, Baños del Inca-Cajamarca.

Los macroquistes de *S. aucheniae* a ser utilizados como control positivo fueron identificados por el médico veterinario del camal mediante examinación visual del músculo cervical de la alpaca sacrificada; luego se recolectó porciones de 5 x 8 cm de músculo infestado con macroquistes (Apéndice N°7) que posteriormente fueron acondicionadas en un cooler con gel refrigerante a 4 °C y enviados hasta el laboratorio de biotecnología Animal de la Estación Experimental INIA, Baños del Inca-Cajamarca. Todas las muestras se mantuvieron a -20 °C hasta su procesamiento.

Se recolectaron dos muestras de sangre de crías de alpacas de dos meses de edad de la Granja Porcón, en Cajamarca que sirvieron como control negativo para la aplicación de la técnica molecular PCR semi-anidada. Se seleccionaron a crías de alpacas como control negativo debido a que dependen de la leche materna hasta los cinco meses de edad (Raggi *et al.*, 1995) y no estarían infectadas con el parásito por no consumir pasto y agua donde estarían presentes las formas infectivas.

Se colectó asépticamente muestras de sangre de siete alpacas de la Granja Porcón, en el departamento de Cajamarca (Apéndice N° 4), criadas en buenas condiciones sanitarias, es decir, que el pastoreo no es ambulante sino rotacional en una sola área de terreno debidamente cercada y sin la presencia de perros. Las alpacas de este lugar fueron sacrificadas y sus carcasas debidamente inspeccionadas por un médico veterinario, no se

encontraron macroquistes en ellas. La sangre de las alpacas de este lugar y las ocho alpacas de Huancavelica mencionadas anteriormente sirvió para realizar el análisis molecular mediante la técnica PCR semi-anidada y luego comparar los resultados obtenidos por esta prueba molecular con el método de necropsia, con la finalidad de calcular la especificidad.

3.6. Extracción de ADN de sangre de alpaca y macroquistes de *S. aucheniae*

El ADN genómico de las muestras de sangre de las alpacas se extrajo a partir de 300 µL de cada muestra utilizando el protocolo de extracción del kit de purificación Wizard® (Promega,USA) y 5 µL de Proteinasa K (20mg/ml) (Apéndice N° 9).

Para extraer ADN de macroquistes de *S. aucheniae* primero estos se aislaron del músculo cervical con ayuda de un bisturí y fueron lavados en un tubo de microcentrífuga con solución salina tamponada (PBS) estéril a pH 7,4 (Apéndice N° 8). Luego, los macroquistes se trituraron en un mortero con el uso de nitrógeno líquido y finalmente se procedió a realizar la extracción de ADN genómico utilizando el protocolo del mismo kit antes mencionado.

Las muestras de ADN fueron eluidos usando 100 µL de solución de rehidratación y se conservaron a 4 °C hasta su uso posterior.

3.7. Optimización y la sensibilidad analítica de la PCR semi-anidada

La técnica de PCR semi-anidada se optimizó con ADN genómico de macroquistes de *S. aucheniae* con las siguientes condiciones: 1 µL (5 mM) de cada cebador para el gen de *S. aucheniae*, 6.5 µL de agua molecular y 12.5 µL de G2 Green Master Mix (Promega,

Madison, EE. UU); como templado se utilizó 2 μ L de muestra de ADN a concentraciones de 10, 20, 30, 50 y 100 ng/ μ L (Apéndice N ° 10), teniendo un volumen final de 25 μ L. La reacción de PCR-semi-anidada se realizó en dos rondas, en la primera ronda se utilizó los cebadores Forward 1 cocc18S-F1 y Reverse Sauch-R-18S junto con los demás componentes para amplificar una secuencia de 730 pb del gen ARNr 18S. En la segunda ronda se utilizó los cebadores Forward 2: scocc18S-F2 y el mismo Reverse Sauch-R-18S (tabla1), para obtener una secuencia de 580 pb del mismo gen a partir de la secuencia más grande obtenida en la primera ronda. Las condiciones de ciclaje utilizadas se muestran en la tabla 2.

Para determinar la sensibilidad analítica de la técnica molecular también se utilizó ADN genómico extraído de macroquiste de *S. aucheniae*, pero a concentraciones más bajas (1ng, 0,1 ng, 0,01ng, 1pg, y 0.01pg) con la finalidad de encontrar la concentración de ADN más baja que la técnica puede detectar. El ADN a las concentraciones mencionadas se empleó como templado para hacer PCR del gen ARNr 18S con las condiciones optimizadas.

La misma técnica de PCR semi-anidada y optimizada se aplicó para el diagnóstico del parásito en sangre. Para la segunda ronda de PCR se hizo un ajuste adicional considerando que consistió en añadir 1 μ L (5 mM) de los cebadores para la amplificación del gen mitocondrial 16S de alpaca, resultando un volumen final de 27 μ L.

Tabla 1: Cebadores utilizados para amplificar el gen ARNr 18S de *S. aucheniae* y el gen mitocondrial 16S de alpaca. Modificado de Decker-Franco et al (2018).

Etapas de PCR	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95 ° C	2 min	
Desnaturalización	95 ° C	30 s	30 ciclos
Alineamiento	62 °C (primera ronda) 63 °C (segunda ronda)	30 s	
Extensión	72 °C	30 s	
Extensión final	72° C.	5 min	

Tabla 2: Condiciones de ciclaje de la PCR semi-anidada. Tomado de Decker-Franco *et al* (2018).

Cebadores	Secuencia	Tamaño del gen amplificado
Forward 1: cocc18S-F1	GAAAGTTAGGGGCTCGAAGA	
Reverse Sauch-R-18S	CCAATCCATACTTGGAAAAACGG	730 pb
Forward 2: scocc18S-F2	- GACGGAAGGGCACCACCAGG-	
Reverse Sauch-R-18S	CCAATCCATACTTGGAAAAACGG	583 pb
Lg_16sRNA_F	AAGGAACTCGGCAAACACGA	
Lg_16sRNA_R	ATTTGTTTCATCCCCGCCTCT	257 pb

3.8. Electroforesis

Los productos de PCR se separaron por electroforesis horizontal (100 V, 50 min) en gel de agarosa al 1,5% en buffer TBE (40 mM Tris-Borato, / 1 mM EDTA, pH 8) al que se le adicionó SYBR Safe (Invitrogen), empleando un marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega, USA). Los productos de PCR se observaron mediante un transiluminador UV (Visi-Blue™ Transiluminator, Jena Analytic).

3.9. La Purificación y secuenciación de productos de PCR

Dos amplicones, producto de PCR obtenidos a partir de ADN de muestras de sangre de alpaca y un amplicón del gen ARNr 18S obtenido a partir de ADN de macroquiste fueron purificados y enviados a secuenciar por el Servicio de secuenciación de Macrogen, Corea del Sur (<http://dna.macrogen.com/eng>).

3.10. Técnicas de procesamiento y análisis de los datos

Los resultados que se obtuvieron de la prueba molecular se incorporaron a una base de datos en el programa de Excel, debidamente ordenados. Luego se calculó el porcentaje de positivos y negativos para *S. aucheniae* en el programa informático GraphPad Prism versión 9.0. Para el análisis bioinformático, las secuencias (Apéndice N °11) se editaron en el programa Chromas v. 2.6.6 y después fueron comparadas con las secuencias de ARNr 18S de *S. aucheniae* depositadas en el GenBank en la base de datos de NCBI (Centro Nacional de Información de Biotecnología de EE. UU <Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando BLASTn.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados.

Se obtuvo un amplicón de 580 pb con respecto al gen ARNr 18S de *S. aucheniae* como resultado de la aplicación de la técnica molecular PCR semi-anidada, con el uso del ADN genómico extraído de sangre y macroquistes. En la figura 3 se observan cuatro bandas de 250 pb que representan al fragmento del gen mitocondrial 16S de alpaca (considerando que el carril 9 es sangre de alpaca utilizada como un control negativo para el parásito) utilizado para confirmar que se ha utilizado muestras de sangre de alpaca.

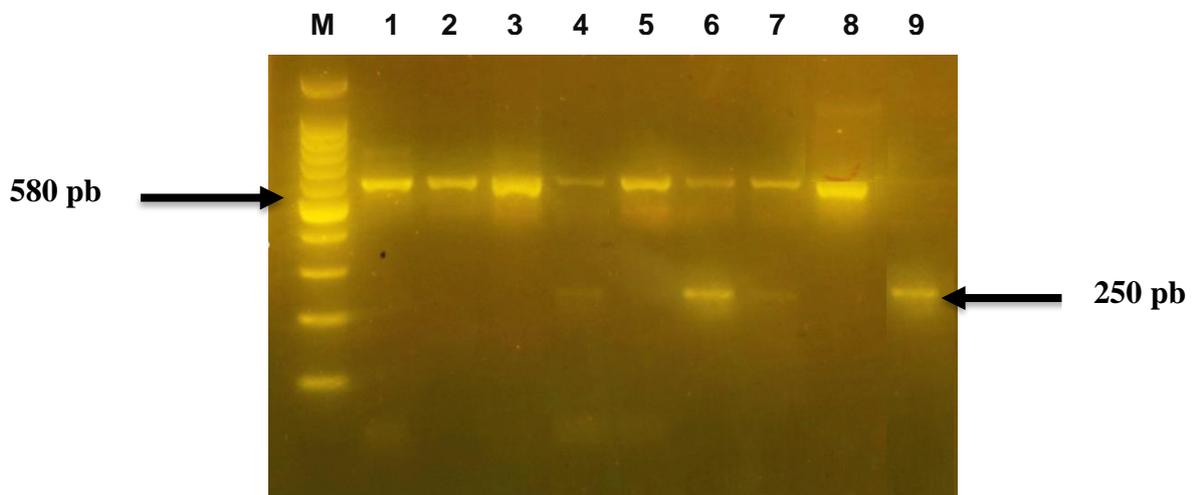


Figura 3. Detección de *S. aucheniae* por la técnica molecular PCR semi-anidada. Carril 1: Control positivo (macroquiste); Carril 9: Control negativo; Carriles 4, 6 y 7 se visualiza dos bandas que representan al gen ARNr 18S del parásito (aprox. 580 pb) y el gen mitocondrial 16S de alpaca (250 pb); ambos amplificados de ADN obtenida de sangre de alpaca; Carriles 2, 3, 5 y 8 son resultados positivos a *S. aucheniae* en sangre de alpaca, sin usar primers para el gen mitocondrial 16S de alpaca.

Se observa el control positivo de *S. aucheniae* con un amplicón de 580 pb y muestra positiva en sangre. Los carriles del 3 al 7 pertenecen a sangre de alpacas con resultado negativo a *S. aucheniae* por lo que solo se visualiza el gen mitocondrial 16S de alpaca (figura 4).

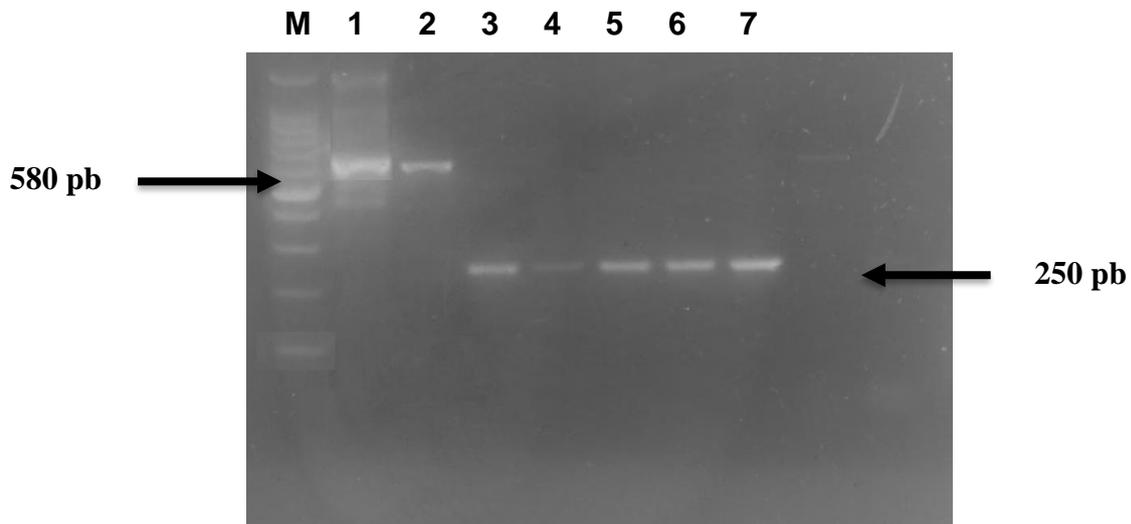


Figura 4. Detección de *S. aucheniae* por la técnica molecular PCR semi-anidada. Carril 1: Control positivo del parásito. Carril 2: Muestra positiva en sangre de alpaca. Carril 3: Control negativo. Carriles 4, 5, 6 y 7 Muestras negativas a *S. aucheniae* en sangre de alpaca.

La sensibilidad analítica de la PCR semi-anidada se determinó a partir de diluciones del ADN de macroquiste de *S. aucheniae*. Se observó que fue posible detectar hasta una concentración de ADN del parásito de un picogramo (pg) (figura 5).

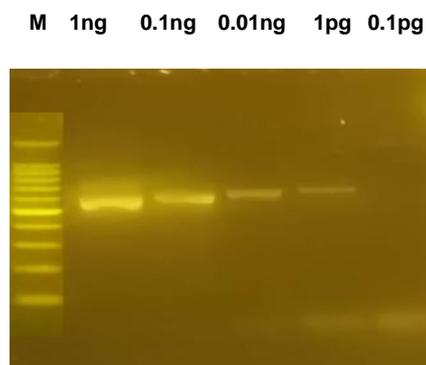


Figura 5. Amplificación del gen ARNr 18S de *S. aucheniae* por PCR semi-anidada a diferentes concentraciones de ADN.

La repetibilidad se confirmó en tres días en ADN del parásito presente en sangre, empleando dos réplicas para cada muestra. No se encontraron diferencias entre los patrones de amplificación luego de la primera reacción de amplificación (Figura 6).

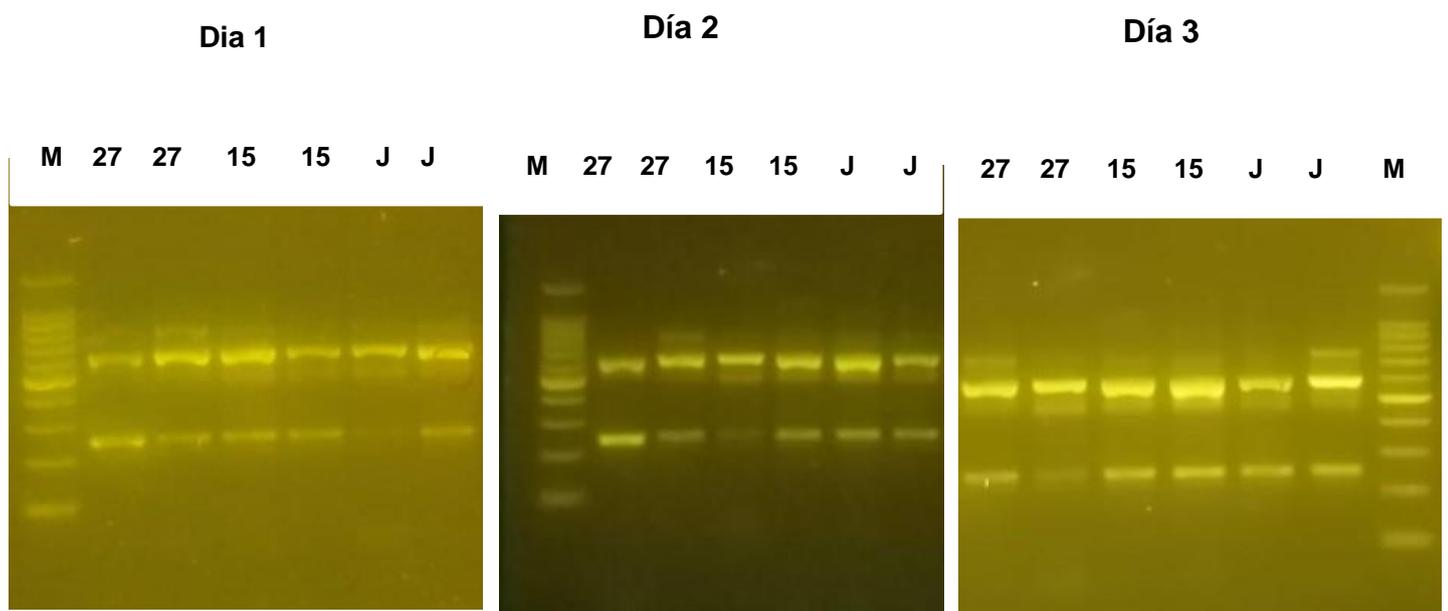


Figura 6. Repetibilidad de la prueba molecular PCR semi-anidada, después de la primera amplificación en tres días, utilizando dos réplicas cada día. En la parte superior de cada imagen se indican los días y las réplicas realizadas por cada muestra.

La especificidad de la PCR semi-anidada fue de 80%, para su determinación se empleó muestras de sangre de quince alpacas de las cuales ocho fueron de la provincia de Huancavelica y siete de la Granja Porcón-Cajamarca todas negativas a macroquistes de *S. aucheniae*, de acuerdo con la necropsia; se observó que 3 de las muestras provenientes de Huancavelica dieron resultados positivos mediante la técnica PCR semi-anidada (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de la detección de *S. aucheniae* en alpacas por la técnica PCR semi-anidada en alpacas.

PCR semi-anidada	NECROPSIA (Presencia de quistes)
	Negativos
Negativos	12 (a)
Positivos	3 (b)
Total	15

Fuente: Elaboración propia.

$$\% \text{ Especificidad} = \frac{b}{b+a} = 0.8 * 100 = 80\%$$

Se tomaron muestras de sangre de alpacas (n= 50) que no se les realizó necropsia y también están incluidas las ocho alpacas a las que se realizó necropsia, de las cuales el 32% dieron positivas y el 68 % fueron negativas a *S. aucheniae*.

Tabla 4. Porcentaje de resultados positivos y negativos a *S. aucheniae* por PCR semi-anidada.

	Porcentaje de positivos <i>S. aucheniae</i>	Porcentaje de negativos a <i>S. aucheniae</i>
Muestras de Sangre	32 %	68 %

Fuente. Elaboración propia

Las secuencias del parásito obtenidas de sangre de alpaca mostraron un porcentaje de identidad alto con secuencias del gen ARNr 18S de *S. aucheniae* depositadas en el GenBank (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de identidad de las secuencias del gen ARNr 18S de *S. aucheniae* aislado de muestra de sangre (D y 27S) y Macroquiste (31C) con las demás secuencias del mismo gen almacenadas en la base de datos del Gen Bank.

Códigos de las secuencias del gen ARNr 18S de <i>S. aucheniae</i>	Porcentaje de Identidad (%)	Código (GenBank)	Muestra	Lugar/Autor
D (Muestra de sangre)	100	MG832004.1	Sangre de Llama	Argentina: Catamarca (Decker Franco <i>et al.</i> , 2018)
	99.64	KU527117.1	Quiste en músculo de llama	Jujuy Argentina (Regensburger <i>et al.</i> , 2015)
	99.64	KT382799.1	Quiste en músculo de Guanaco	Argentina (More <i>et al.</i> , 2016)
	98.81	MG832003.1	Sangre Llama	Bolivia (Oruro) (Decker Franco <i>et al.</i> , 2018)
	99.44	KU527117.1	Quiste en músculo de Alpaca	Victoria-Australia (Holmdahl <i>et al.</i> , 1998)
27 C (Muestra de sangre)	99.80	MG832004.1	Sangre de Llama	Argentina: Catamarca
	99.61	MG832003.1	Sangre Llama	Bolivia (Oruro)
	99.44	KT382799.1	Quiste en músculo de Guanaco	Argentina
	99.44	KU527117.1	Quiste en músculo de llama	Jujuy Argentina
	97.96	AF017123.1	Quiste en músculo de Alpaca	Victoria-Australia
31 C (Macroquiste)	100	MG832004.1	Sangre de Llama	Argentina: Catamarca
	99.81	MG832003.1	Sangre Llama	Bolivia (Oruro)
	99.63	KT382799.1	Quiste en músculo de Guanaco	Argentina
	99.63	KU527117.1	Quiste en músculo de llama	Jujuy Argentina
	98.17	AF017123.1	Quiste en músculo de Alpaca	Victoria-Australia

4.2. Discusión

En este estudio se demostró la detección del gen ARNr 18S de *S. aucheniae* a través de un fragmento del gen de aproximadamente 580 pb, mediante PCR semi-anidada en muestras de sangre de alpaca (Figura 3), similares resultados se obtuvieron en el trabajo realizado por Decker-Franco *et al.* (2018) donde se pudo detectar el parásito mediante la misma técnica molecular pero en sangre de llamas originarias de los países de Argentina y Bolivia, aunque en este caso se reportó un fragmento de aproximadamente 550 pb. Con ambos estudios se demuestra que la técnica molecular de PCR anidada es de utilidad para diagnosticar *S. aucheniae* en camélidos sudamericanos vivos. Nuestros resultados también concuerdan con los de Martin *et al.* (2016) quienes diseñaron la primera PCR semi-anidada para la detección de este gen en *S. aucheniae* en sangre de llamas; ellos obtuvieron, a diferencia de nosotros, un amplicón de 450 pb además que en esta investigación se observó varias bandas en la misma muestra, debido a que los primers utilizados no eran tan específicos para amplificar la región específica de este gen.

Con respecto a la sensibilidad analítica la técnica de PCR semi-anidada que se ha implementado pudo amplificar el gen ARNr 18S en concentraciones muy bajas de ADN del parásito, siendo un picogramo el límite de detección (Figura 4); estos resultados se asemejan también a los de Decker-Franco *et al.* (2018) quienes demostraron que esta técnica tiene un límite de detección de hasta un parásito por mL de sangre, lo cual permite decir que la técnica tiene una precisión aceptable. Cabe resaltar que el rendimiento analítico a límites de concentración bajos suele ser de gran interés en las pruebas moleculares para enfermedades infecciosas, porque define la capacidad de diagnóstico del ensayo (Burd, 2010). Otros autores han determinado la sensibilidad analítica en el diagnóstico de *S. tenella* y *S. arieticanis*, que infectan a ovinos, mediante PCR anidada

que también detectó el gen ARNr 18S hasta con una concentración de 10 pg de ADN de cada parásito (Heckerroth y Tenter, 1999); ese resultado aún sigue siendo alto como límite de detección en comparación con concentración de un picogramo evaluada en este trabajo.

La especificidad de la técnica fue alta, ya que se obtuvo un valor de 80 % con los resultados en este estudio, donde la mayor cantidad de alpacas que no albergaban macroquistes en su musculatura esquelética dieron resultado negativo a *S. aucheniae* mediante la PCR semi-anidada que evaluamos. Resultados semejantes se consiguieron en el trabajo de Moré *et al.* (2013) donde se obtuvo una especificidad de 95.5% de la técnica PCR multiplex para el diagnóstico de varias especies de *Sarcocystis* que infectan a ganado bovino; de igual manera, en otro estudio se reportó una especificidad alta de 75 % de la PCR semi-anidada en la detección de *S. aucheniae* en llamas de Argentina (Decker-Franco *et al.*, 2018). Nuestro resultado y el de los demás estudios demuestran que una prueba molecular puede detectar con buena precisión los animales que no poseen el parásito.

Un dato importante de resaltar en este trabajo es que tres alpacas provenientes de la provincia de Huancavelica dieron positivas por PCR semi-anidada, pero fueron negativas al parásito en la necropsia, pese a que estos animales provienen de una zona donde se reporta altas prevalencias de sarcocistosis (Gomez y Mallqui, 2018). Aunque no se tienen datos de las condiciones en que fueron criadas estas tres alpacas, es probable que estas sean criadas en malas condiciones sanitarias y en presencia del hospedador definitivo (perros) y bajo pastoreo intensivo, factores que aumentan el riesgo de infección por *Sarcocystis* (Alva *et al.*, 1981); por lo tanto, la positividad de la prueba podría deberse

a que estos animales estarían en una fase aguda de la infección. Además, de acuerdo con algunos estudios, el método de necropsia no sería el método adecuado para confirmar la fase aguda de la infección por *S. aucheniae*, así también lo afirman Decker-Franco *et al.* (2018) quienes confirmaron la presencia del parásito en sangre de llamas en las cuales no se encontró macroquistes en músculo esquelético, concluyendo que la PCR semi-anidada sería útil para determinar la presencia del parásito en sangre durante las primeras etapas de infección.

En relación a las muestras de sangre de alpacas de Cajamarca, estas fueron negativas tanto a la PCR como a la necropsia, esto sería atribuido al correcto manejo sanitario que tienen estos animales en el área restringida a su crianza, de donde se colectaron las muestras, sin la presencia de otros animales. Aunque no hay datos actualizados de este parásito en la región, es importante mencionar que hace aproximadamente 25 años hubo un reporte de macroquistes de *S. aucheniae* en carne de alpacas (Cabrera, 1997), lo cual podría indicar la existencia del parásito en Cajamarca; así también, en un estudio reciente, se ha confirmado la presencia de ooquistes de *Sarcocystis spp.* en heces de perros que habitan las mismas zonas alpaqueras (Ydrogo, 2018), por lo que sería de gran relevancia confirmar la presencia de este parásito en el huésped definitivo mediante algún método molecular como el que hemos probado en esta investigación.

En la tabla 2 se observa que 32 % de los animales analizados provenientes de Huancavelica fueron positivos a *S. aucheniae* mediante la PCR semi-anidada desarrollada. Estas alpacas positivas podrían haber sido criadas en condiciones sanitarias

que favorecen la infección, como lo teoriza un estudio previo en Argentina donde se observó que el pastoreo itinerante y/o la exposición a perros pastores son los factores de riesgo más importantes asociados a la seroprevalencia de sarcocistosis (Romero *et al.*, 2017). La infección por *S. aucheniae* también está asociada a prácticas inadecuadas y de riego, como la alimentación al perro con carne cruda infectada de quistes, ya que esto mantiene el ciclo de vida del parásito a través de la contaminación de los pastos y el agua con ooquistes o esporoquistes infectivos presentes en las heces del perro (Guerrero, 1987).

Por otro lado, el 68% de alpacas fueron negativos a *S. aucheniae*, esto podría ser coherente con una forma de crianza en la que las condiciones sanitarias no permiten la infección parasitaria, dado que, si bien las muestras de estudio todas provienen de Huancavelica, pero no todas de la misma zona de crianza. Otra posibilidad es que existan componentes genéticos en algunas alpacas que determinen una mayor resistencia en la invasión de los parásitos, esto se especula porque ya se ha realizado estudios donde se ha identificado que en el genoma de las ovejas existen regiones genómicas significativas que están asociadas con la resistencia a parásitos (Al Kalaldehy *et al.*, 2019). Asimismo, es posible que el parásito no se encuentre circulante en la sangre del animal, sino que puede estar presente en el músculo esquelético del animal en su forma de macroquistes.

Se comprobó que las secuencias del gen ARNr 18S amplificado de ADN genómico de muestras de sangre pertenecían a *S. aucheniae* ya que se obtuvieron porcentajes máximos de identidad con las secuencias de ARNr 18S depositadas en el GenBank y provenientes de muestras de sangre de llamas originarias de Argentina y Bolivia; así

también, se observó un porcentaje de identidad alto entre la secuencia del gen aislado de macroquiste en este trabajo y las secuencias del mismo gen provenientes de macroquistes de llama, alpaca y guanaco. Estos resultados pueden indicar que la variación genética observada en la secuencia del ARNr 18S no estaría relacionada con la especie del hospedero ni con el origen geográfico de los aislados (Decker Franco *et al.*,2018), sin embargo, es necesario realizar más estudios con otros marcadores moleculares para confirmar lo expuesto y obtener más información sobre la diversidad genética del parásito.

Esta investigación también ha buscado determinar la repetibilidad de la PCR desarrollada y los resultados demuestran que las réplicas de la aplicación del ensayo en cada muestra durante tres días no han variado (figura 5), lo que indica la solidez de la técnica, es decir, su capacidad no se ve afectada por pequeños cambios en los procedimientos de prueba que pueden ocurrir con el tiempo dentro de un solo laboratorio (Waugh y Clark, 2021).

Finalmente, en este trabajo se confirma que la técnica PCR semi-anidada es de utilidad para diagnosticar la sarcocistosis aguda, es decir, cuando el parásito está circulando en sangre y no cuando está enquistado en el tejido animal; esto coincide con otra investigación donde se demostró que este método molecular de diagnóstico no predice de forma confiable la presencia de macroquistes debido a que no se pudo encontrar a *S. aucheniae* en un número considerable de llamas que albergaban quistes Decker-Franco *et. al* (2018). La PCR semi-anidada en comparación con las técnicas serológicas es más específica al amplificar la región del gen ARNr 18S de *S. aucheniae*

con el fin de diagnosticar el parásito, en cambio los métodos serológicos como los ELISA que se han desarrollado en otros estudios han presentado reacciones cruzadas con las especies de *S. mansoni* y *S. aucheniae* (Sam, 1988) y con otras especies de *Sarcocystis* (More *et al.*, 2008) por lo que no sería una prueba precisa para detectar este parásito. Por otro lado, la PCR anidada al igual que la PCR semi-anidada también han sido de importancia para detectar otras especies de *Sarcocystis* en sangre de oveja, ya que ambas muestran una especificidad y sensibilidad analítica que les hace mejores como técnicas de diagnóstico en la etapa inicial del parásito (Heckerroth y Tenter, 1999; Decker Franco *et al.*, 2018), sin embargo, no son adecuadas para diagnosticar la fase crónica de la sarcocistosis. Se ha identificado otras especies de *Sarcocystis* con PCR multiplex y PCR convencional, en muestras de órganos y músculo de los hospederos, pero aún no han sido implementadas para determinar el parásito en sus primeras etapas evolutivas en comparación a la PCR semi-anidada utilizada en este trabajo (Barghash, 2022; Pestechian *et al.*, 2021; Jiang, *et al.*, 2021).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

En este estudio se estableció la sensibilidad analítica y especificidad de la técnica PCR semi-anidada la cual fue utilizada para amplificar el gen ARNr 18S de *S. aucheniae* y lograr diagnosticar el parásito en muestras de sangre de alpaca. Con esta técnica se obtuvo que 32 % de los animales evaluados estuvieron infectados por el parásito, el mismo que estaría en la fase aguda de infección, es decir, cuando está circulante en sangre.

Se logró optimizar el protocolo de la técnica PCR semi-anidada utilizando ADN de macroquistes del parásito, que luego fue utilizado para el diagnóstico de *S. aucheniae* en sangre de alpacas de la provincia de Huancavelica

La sensibilidad analítica de la técnica PCR semi-anidada fue hasta de un picogrammo de ADN del parásito para amplificar el gen ARNr 18S de *S. aucheniae*, lo que indica que la técnica tiene un buen límite de detección. Por otra parte, la especificidad de la técnica de PCR semi-anidada fue alta, con un valor de 80%.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda aplicar la técnica PCR semi-anidada para diagnosticar el parásito en alpacas cinco a seis meses de edad ya que son animales que podrían tener un primer contacto con los ooquistes infectantes presentes en las pasturas de lugares con alta prevalencia. Cabe resaltar que este diagnóstico molecular también serviría para descubrir focos infectivos del parásito en las diferentes zonas alpaqueras del Perú y estudiar a profundidad la sarcocistosis.

Se sugiere desarrollar una PCR semi-anidada en ADN extraído de muestras de heces de perros o de otros animales carnívoros que pueden albergar el parásito, con el fin de identificar a *S. aucheniae* con un análisis molecular ya que hasta ahora solo se ha determinado la presencia de ooquistes del hospedador definitivo mediante observación microscópica. Incluso la técnica molecular serviría para comprobar si otros animales silvestres de Cajamarca se comportan como hospederos definitivos quienes podrían estar diseminando el parásito en diferentes regiones del Perú.

Se sugiere determinar la reproducibilidad de la técnica PCR semi-anidada después de optimizarla para demostrar si existe variabilidad al realizar el mismo método molecular en múltiples laboratorios y por distintos analistas.

LISTA DE REFERENCIAS

- Al Kalaldehy, M. et al. (2019) “Detection of genomic regions underlying resistance to gastrointestinal parasites in Australian sheep,” *Genetics Selection Evolution*, 51(1), pp. 2–18. doi:10.1186/s12711-019-0479-1.
- Aguirre, W. (2004). *Proyecto apoyo a la sostenibilidad de la crianza de camélidos sudamericanos en la región cusco*. Disponible en: <https://docplayer.es/3777381-Proyecto-apoyo-a-la-sostenibilidad-de-la-crianza-de-camelidos-sudamericanos-en-la-region-cusco.html> [Consultado 08-05-2022].
- Alva, J., Bazalar, H., Guerrero, C. y Nuñez., A. (1981). Observaciones del ciclo de vida del *Sarcocystis aucheniae* de alpacas (*Lama pacos*). V Congreso Peruano Microbiología y Parasitología, Asociación peruana de Microbiología y Parasitología. Arequipa, Perú.
- Alves, M. et al. (2009) “Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review,” *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), pp. 1–11. doi:10.1590/S1517-83822009000100001.
- Anderson, S. et al. (1981) “Sequence and organization of human mitochondrial genome,” *Macmillan Journals*, 290, pp. 457–465. doi:10.1038/290457a0
- Attardi, G. (1988) *Biogenesis of mitochondria*. Available at: www.annualreviews.org.
- Barghash, S.M. (2022) “*Sarcocystis* species: a possible threat to cattle health and food safety in south sinai governorate, Egypt,” *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 52(1), pp. 71–78.
- Bravo, S., Cruz, J., (2015). “Estudios de exactitud diagnóstica: Herramientas para su Interpretación. *Rev. Chil. Radiol. año 21*, pp 158–164.

- Beldomenico, P.M. *et al.* (2003) “Internal parasites of free-ranging guanacos from Patagonia,” *Veterinary Parasitology*, 118(1–2), pp. 71–77. doi: 10.1016/J.VETPAR.2003.09.008.
- Burd, E. M. (2010) “Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases “. *Clinical microbiology reviews*, 23(3), pp. 550–576.
- Butler, J.M., (2012). DNA Extraction Methods. *Adv. Top. Forensic DNA Typing* 29–47. at: <http://cmr.asm.org/content/23/3/550#ref-list-1>
- Carletti, T. *et al.* (2013) “Molecular identification of *Sarcocystis aucheniae* as the macrocyst-forming parasite of llamas,” *Veterinary Parasitology*, 198(3–4), pp. 396–400. doi: 10.1016/J.VETPAR.2013.09.007.
- Carr, J., Williams, D.G. and Hayden, R.T. (2010) “Molecular Detection of Multiple Respiratory Viruses “. First Edit, *Molecular Diagnostics*. First Edit. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-369428-7.00024-0.
- Cao, Y., Zheng, Y. and Fang, B. (2004) “Optimization of polymerase chain reaction-amplified conditions using the uniform design method,” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(8), pp. 910–913. doi:10.1002/jctb.1078
- Carrigo, J.A. *et al.* (2013) “*Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR)*,” *Eurosurveillance*, 18(4), pp. 1–8. doi:10.2807/ese.18.04.20382-en.
- Castro, E. *et al.* (2004) *Evaluación de la edad como factor de riesgo de seropositividad a Sarcocystis spp. en alpacas*. Available at: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S160991172004000100012&script=sci_arttext.
- Chávez, A. *et al.* (2008) *Sarcocistiosis y la eficiencia productiva de la alpaca*, *Rev Inv Vet Perú*.

- Cordero del Campillo, M., Rojas, F., Fernández, M., Sánchez, M., Rodríguez S., López, I. (1999). *Parasitología veterinaria*. Madrid: Mc Graw-Hill, pp. 968.
- Cornejo, R. *et al.* (2007) “*Relación entre el tamaño de los macroquistes de Sarcocystis aucheniae y su viabilidad en Canis familiaris,*” *Rev Inv Vet Perú*, 18(1), pp. 76–83. Available at: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S160991172007000100010 (Accessed: May 14, 2022).
- Cornejo, R. *et al.* (2012) “*Relación entre el tamaño de los macroquistes de Sarcocystis aucheniae y su viabilidad en Canis familiaris.*” *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 18(1), pp. 76–83. doi:10.15381/rivep.v18i1.1280.
- Decker, C. (2015) *Sarcocystiosis en camélidos Sudamericanos domésticos: Una propuesta para su prevención.* Available at: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/52659/Documento_completo.pdf?sequence=3 (Accessed: March 29, 2022).
- Decker Franco, C. *et al.* (2018) “*Detection of Sarcocystis aucheniae in blood of llama using a duplex semi-nested PCR assay and its association with cyst infestation,*” *Heliyon*, 4(11), p. e00928. doi: 10.1016/J.HELIYON. 2018.E00928.
- Dubey JP. (1989). *Sarcocystosis of animals and man*. Boca Raton CRC Press.215p.
- Elkins, K.M., (2013). *DNA Extraction. Forensic DNA Biol.* 39–52.
- Dubey, J.P. *et al.* (2016) *Sarcocystosis of domestic animals and humans*. 2nd Editio, *Wildlife Disease Association*. 2nd Editio. Edited by T. and F. Group: doi:10.1136/inpract.7.5.158.
- Fayer, R., Esposito, D.H. and Dubey, J.P. (2015) “*Human infections with Sarcocystis species,*” *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), pp. 295–311. doi:10.1128/CMR.00113-14.

- Fayet-Lebaron, Kiss, T.E. and Jády, B.E. (2010) “Box H/ACA Small Ribonucleoproteins,” *Molecular Cell*, 37(5), pp. 597–606. doi:10.1016/j.molcel.2010.01.032.
- Fonseca, Rute. *et al.* (2008) “The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome,” *BioMed Central*, 9, pp. 1–22. doi:10.1186/1471-2164-9-119.
- Gabor, M. *et al.* (2010) *Chronic myositis in an Australian alpaca (Llama pacos) associated with Sarcocystis spp*, *J Vet Diagn Invest*.
- Gajadhar, A.A. *et al.* (2015) “Foodborne apicomplexan protozoa: Coccidia. Coccidia.,” in *Foodborne Parasites in the Food Supply Web: Occurrence and Control*. Elsevier Inc., pp. 101–147. doi:10.1016/B978-1-78242-332-4.00006-0.
- Guerrero, C. (1987). *Enfermedades parasitarias de las alpacas*. En: La alpaca, enfermedades infecciosas y parasitarias. Vol. De Divulgación. IVITA UNMSM. Lima, Perú. 8, pp, 41-42.
- Gomez, E.G. and Mallqui, S.D. (2018). *Mapa parasitológico del lugar de procedencia de alpacas y llamas infestadas con Lamanema chavezii y Sarcocystis aucheniae beneficiadas en el matadero municipal de Huancavelica*. Available at: <https://docplayer.es/218289179-Universida-nacional-de-huancavelica.html> (Accessed: June 6, 2022).
- Heckerroth, A.R. and Tenter, A.M. (1999) *Development and validation of species-specific nested PCRs for diagnosis of acute sarcocystiosis in sheep*. doi:10.1016/s0020-7519(99)00111-3.
- Jiang, N. *et al.* (2021) “First Report of *Sarcocystis Masoni* in a Captive Alpaca (Vicugna Pacos) From China,” *Frontiers in Veterinary Science*, 8. doi:10.3389/fvets.2021.759252
- Holmdahl, O.J.M. *et al.* (1999) “Evolution of Ruminant *Sarcocystis* (Sporozoa)

- Parasites Based on Small Subunit rDNA Sequences,” *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11(1), pp. 27–37. doi:10.1006/MPEV.1998.0556.
- Leguía, G. and Santiago, B. (2018) “Prevalencia de *Sarcocystis* en alpacas (*Lama pacos*) y en perros pastores de una ganadería de la sierra central del Perú,” 15(1), pp. 59–62. Available at: Texto%20del%20art%C3%ADculo-3686-1-10-20181014.pdf (Accessed: April 15, 2022).
- Leguía, G., 1991. The epidemiology and economic impact of llama parasites. *Parasitol. Today* 7, 54–56.
- Leguía, G., E. Casas. (1999). Enfermedades parasitarias y atlas parasitológico de camélidos sudamericanos. Lima: La Mar, pp. 30.
- Leguía, G y Clavo, N. (1989). Sarcocistiosis o triquina. Boletín Técnico N 7-CICCS UNMSM CI IVITA Agosto-Lima-Perú. p 5-19.
- Leuckart, R. (1879). “Die Parasiten des Menschen”, 2nd ed. G. F. Winter, Leipzig, Germany, viii, pp. 336.
- Levine, N.D. (1986) *The Taxonomy of Sarcocystis (Protozoa, Apicomplexa) Species*, Source: *The Journal of Parasitology*.
- Marchiondo, A., Cruthers, L. and Fourie, J. (2019) “Protozoa,” in *Parasiticide Screening*. Elsevier, pp. 379–540. doi:10.1016/B978-0-12-813890-8.00005-5.
- Marmiroli, N. and Maestri, E. (2007) *Polymerase chain reaction (PCR), Food Toxicants Analysis*. Woodhead Publishing Limited. doi:10.1016/B978-044452843-8/50007-9.
- Martin, M. *et al.* (2016) “Detección molecular de *Sarcocystis aucheniae* en sangre de llamas de Argentina,” *Revista Argentina de Microbiología*, 48(3), pp. 200–205. doi: 10.1016/j.ram.2016.03.009.

- Medrano, G., Hung, A. y Rubio, N. (2006) “Detección molecular temprana de *Sarcocystis* en el animal vivo y su estudio filogenético basado en el análisis del gen SSU rRNA en alpacas en Perú,” *Mosaico Cient.*, 3(2), pp. 5–9.
- Moré, G. *et al.* (2008) “Seroprevalence of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* sp. in llamas (*Lama glama*) from Jujuy, Argentina,” *Veterinary Parasitology*, 155(1–2), pp. 158–160. doi:10.1016/j.vetpar.2008.04.003.
- More, G. *et al.* (2013) “Development of a multiplex real time PCR to differentiate *Sarcocystis* spp. affecting cattle,” *Veterinary Parasitology*, 197(1–2), pp. 85–94. doi:10.1016/j.vetpar.2013.04.024.
- More, G. *et al.* (2016) “*Sarcocystis masoni*, n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae), and redescription of *Sarcocystis aucheniae* from llama (*Lama glama*), guanaco (*Lama guanicoe*) and alpaca (*Vicugna pacos*),” *Parasitology*, 143(5), pp. 617–626. doi:10.1017/S003118201600007X.
- Mullens, B. A., & Murillo, A. C. (2017). Parasites in Laying Hen Housing Systems. *Egg Innovations and Strategies for Improvements*, 597–606. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800879-9.00055-X>
- Panek, J. *et al.* (2013) “An evolutionary conserved pattern of 18S rRNA sequence complementarity to mRNA 5' UTRs and its implications for eukaryotic gene translation regulation,” *Nucleic Acids Research*, 41(16), pp. 7625–7634. doi:10.1093/nar/gkt548.
- Perera, C.L. and Acevedo, A.M. (2018) “Nuevas tendencias en el diagnóstico de enfermedades virales en los animales New trends in the diagnosis of animal viral diseases,” *Revista de Salud Animal*, 40(3), pp. 1–10.
- la Perle, K.M.D. *et al.* (1999) *Dalmeny Disease in an Alpaca (Lama pacos): Sarcocystosis, Eosinophilic Myositis and Abortion*, *J. Comp. Path.*

doi:10.1053/jcpa.1999.0321.

Pestechian, N. et al. (2021) “Molecular and Microscopic Investigation of *Sarcocystis* Species Isolated from Sheep Muscles in Iran,” *Journal of Food Quality*, 2021.

doi:10.1155/2021/5562517.

Pirger, Z., Rácz, B. and Kiss, T. (2009) “Dopamine-induced programmed cell death is associated with cytochrome c release and caspase-3 activation in snail salivary gland cells,” *Biology of the Cell*, 101(2), pp. 105–116. doi:10.1042/bc20070168.

Poche, F. (1913). *Das System der Protozoa*. *Archiv für Protistenkunde*, 30, pp. 125-321.

Quispe, E.P. et al. (2012) “Estudio de la carcasa de alpacas (*Vicugna pacos*) en relación al peso y clasificación cárnica,” *Rev Inv Vet Perú*, 23(1), pp. 43–51.

Raggi, L.A., Macniven, V., Ferrando, G. (1995). *Ganancia de peso nacimiento-posdestete en crías de alpaca bajo diferente manejo alimentario materno*. IX Congreso Nacional de Medicina Veterinaria, Chillán, Chile.

Regensburger, C. et al. (2015) “Morphological and molecular characteristics of *Sarcocystis aucheniae* isolated from meat of guanaco (*Lama guanicoe*),” *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 2(4), pp. 118–121.

Romero, S. et al. (2017) “Seropositivity to *Sarcocystis* infection of llamas correlates with breeding practices,” *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 10, pp. 65–70. doi: 10.1016/J.VPRSR.2017.08.006.

Rooney, A.L. et al. (2014) “*Sarcocystis* spp. in llamas (*Lama glama*) in Southern Bolivia: A cross sectional study of the prevalence, risk factors and loss in income caused by carcass downgrades,” *Preventive Veterinary Medicine*, 116(3), pp. 296–304. doi: 10.1016/j.prevetmed.2013.11.014.

Rougemont, M. et al. (2004) “Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR

- assays,” *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), pp. 5636–5643. doi:10.1128/JCM.42.12.5636-5643.2004.
- Saeed, M.A. *et al.* (2018) “Sarcocystosis in South American camelids: The state of play revisited,” *Parasites and Vectors*, 11(1), pp. 1–11. doi:10.1186/s13071-018-2748-
- Saini, A.K. and Kumar, V. (2021) “Ribosome structure,” *Emerging Concepts in Ribosome Structure, Biogenesis, and Function*, pp. 15–31. doi:10.1016/B978-0-12-816364-1.00007-X.
- Sam R. (1988). *Sarcocystis aucheniae: caracterización parcial de componentes antigénicos y patología clínica experimental en alpacas*. Tesis de doctorado en ciencias biológicas. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. Lima
- Savini, G., Robertson, I.D. and Dunsmore, J.D. (1996) *Viability of the sporocysts of Sarcocystis cruzi after exposure to different temperatures and relative humidities, Veterinary Parasitology*.
- Singh, B. (1997) “Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections,” *International Journal for Parasitology*, 27(10), pp. 1135–1145. doi:10.1016/S0020-7519(97)00111-2.
- Sorof, M. and Cheng, Q. (2015) *Recent application of biotechniques for the improvement of mango research, Applied Plant Genomics and Biotechnology*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/B978-0-08-100068-7.00012-4.
- Sreejith, K.R. *et al.* (2018) “Digital polymerase chain reaction technology-recent advances and future perspectives,” *Lab on a Chip*. Royal Society of Chemistry, pp. 3717–3732. doi:10.1039/c8lc00990b.
- Taanman, J.W. (1999) “The mitochondrial genome: Structure, transcription, translation and replication,” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1410(2), pp. 103–123. doi:10.1016/S0005-2728(98)00161-3.

- Tamay de Dios, L., Ibarra, C. and Velasquillo, C. (2010) “Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real,” in *Learning in the Disciplines: ICLS 2010 Conference Proceedings - 9th International Conference of the Learning Sciences*, pp. 65–72.
- Torres-Machorro *et al.* (2010) “Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: Witnesses of phylogeny?” *FEMS Microbiology Reviews*, 34(1), pp. 59–86. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00196. x.
- Urquhart, G., Armour, J., Duncan J., Jenmings, F. (2001). *Parasitología Veterinaria*. 2^a ed. Zaragoza: Acribia, pp 355.
- Vargas, C.A. (2018). Sarcocistosis (Arrocillo, Falsa triquina, Falso cisticercos, Sarcosporidiosis). *Revisión literaria*, pp. 56-67.
- Valderrama PA. (1999). Relación de la sarcocystiosis macroscópica en carne de alpaca con la presencia de lesiones bucales. Puno-Perú, pp 45
- Vilca, M., 1991. Producción, tecnología e higiene de la carne. Fernandez-Baca (Ed.), Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe, pp. 387-412.
- Villegas, V.E., Sánchez, M.C. and Chuairé, L. (2009) “Reacción en cadena de la polimerasa y diagnóstico molecular,” *Colombia Medica*, pp. 347–352.
- Viscarra, R. *et al.* (2003) *Validation of a Serological Test for Sarcocystiosis in Llamas found in the Bolivian*. Available at: www.sciquest.org.nz.
- Wallace, D.C. (1999) *Mitochondrial Diseases in Man and Mouse*. Available at: www.sciencemag.org.
- Waugh, C., Clark, G. (2021). Factors affecting test reproducibility among laboratories. *Rev Sci Tech* 40, 131–143.
- Wheeler, J.C. (1991). *Origen, evolución y status actual. Avances y perspectivas del*

conocimiento de los camélidos. Edición Fernandez-Baca, sudamericanos. Oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe, pp. 11-48.

White, S. 1998. *Sarcocystis*: A parasite Endemic to Andean Alpacas. The Alpaca registry Journal, 3(1).

Ydrogo, Milena. (2017). Frecuencia de *Sarcocystis spp.* en perros (*Canis lupus familiaris*) criados en tres empresas alpaqueras de Cajamarca, 2017. Tesis de Pregrado, Universidad Nacional de Cajamarca.

Zacarías *et al.* (2013) “Técnicas de aislamiento y purificación de ooquistes de *Sarcocystis aucheniae* a partir de intestino delgado de perros experimentalmente infectados,” *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 24(3), pp. 396–403. doi:10.15381/rivep.v24i3.2590.

APÉNDICES

Apéndice N° 1. Población de alpacas en el Camal de la provincia de Huancavelica.



Apéndice N ° 2. Recolección de muestras de Sangre de alpaca.



Apéndice N° 3. Muestras de sangre de alpaca colectadas en tubos Vacutainer con EDTA.



Apéndice N ° 4. Alpacas adultas de la zona Granja Porcón- Cajamarca



Apéndice N ° 5. Toma de muestra de sangre de alpacas de la Granja Porcón-Cajamarca.



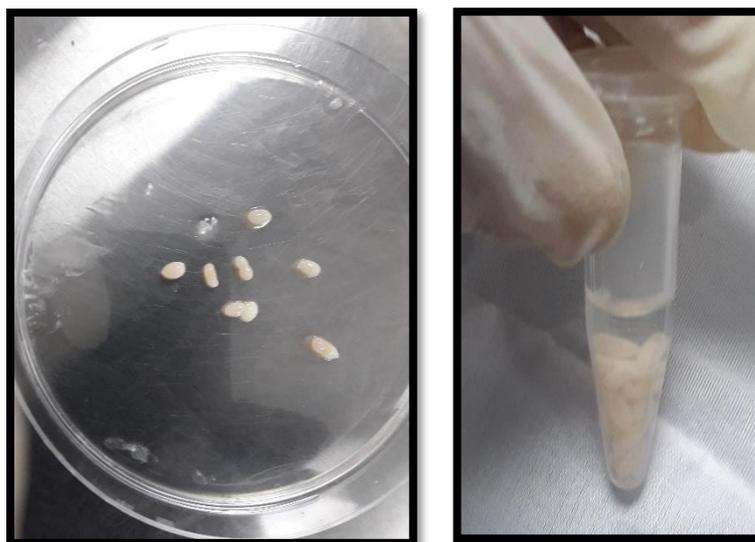
Apéndice N ° 6. Carcasas de alpacas inspeccionadas en el Camal Municipal de Huancavelica.



Apéndice N ° 7. Carne de alpaca infectada con macroquistes de *S. aucheniae*.



Apéndice N ° 8. Macroquistes de *S. aucheniae* aislados de carne de alpaca.



Apéndice N ° 9. Protocolo de extracción de ADN de sangre de alpaca.

PROCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE SANGRE DE ALPACA

1

Descongelación a T°. A. y mezclar la muestra de sangre suavemente.



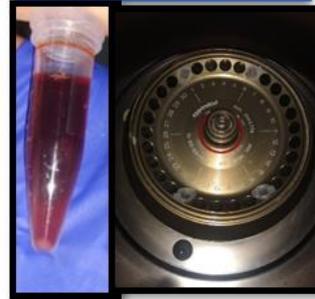
2

Mezclar 300 µL de sangre + 900 µL de solución de lisis celular. Incubar a T°. A por 10 min.



3

Centrifugar a 16000 g x 1 min. Ver pellet blanco. Decantar. Luego Vortex máxima velocidad.



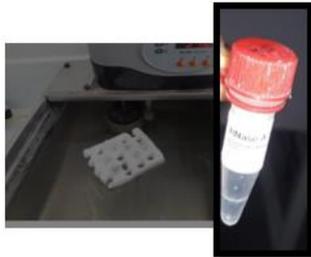
4

Adicionar 300 µL de sol de lisis de núcleo y 5 µL de proteinasa K. Incubar a 37 ° C. Adicionar 100 µL de solución de lisis de núcleo e incubar 1 hora más.



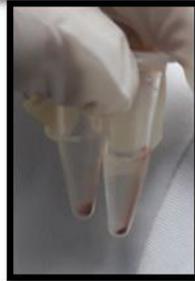
5

Agregar 1 µL de ARNasa. Incubar a 37 ° C x 15 min.



6

Adicionar 100 µL de Solución de proteínas. Mover vigorosamente. Centrifugar 16000g x 4 min. Ver pastilla marrón.



7

Pasar el sobrenadante a un tubo con 300 µL de isopropanol. Mover y ver hebras de ADN.



8

Centrifugar a 16000 g x 5 min. Decantar y luego lavar la pastilla con etanol. Centrifugar a 16000g x 4min

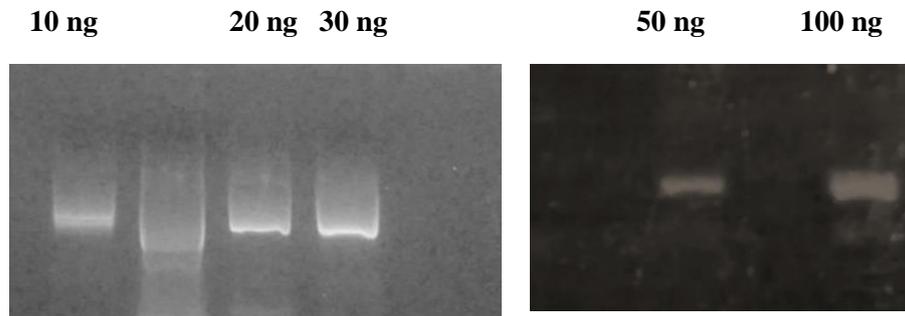


9

Decantar. Dejar secar el ADN por 15 min. Agregar 100 µL de solución de rehidratación.



Apéndice N° 10. Observación de bandas del gen ARNr 18S de *Sarcocystis aucheniae* a diferentes concentraciones de ADN aislado de macroquistes.



Apéndice N° 11. Cromatograma de secuencia ARNr 18S de *S. aucheniae* aislado de ADN extraído de sangre de alpaca (Código 27S).

File: 27S_18S-F2Forward2.ab1 Run Ended: 2022/5/3 22:2:36 Signal G:1543 A:2126 C:3060 T:3371
 Sample: 27S_18S-F2Forward2 Lane: 1 Base spacing: 13.957085 574 bases in 6853 scans Page 1 of 1

