



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Veterinarias

Trabajo de tesis realizado como requisito para obtener el título de

DOCTORA EN CIENCIAS VETERINARIAS

IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE *SARCOCYSTIS*

SPP. EN SUINOS DE ARGENTINA

AUTORA: LIC. MARÍA ELISA HELMAN

DIRECTOR: Dr. Gastón Andrés Moré

CO-DIRECTORA: Dra. Andrea Dellarupe

Lugar de trabajo: Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA), Departamento de Epizootiología y

Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

MIEMBROS DEL JURADO:

Dr. Luis Fernando Pita Gondim (Universidade Federal de Bahia-Brasil)

Dra. Mabel Ribicich (FCV-UBA)

Dra. Mariana Machuca (FCV-UNLP)

2023

A mi mamá y a mi papá

A mis hermanas y a mi sobrino, Lucca.

A mi amigo Juampi, que descansa en paz.

A mi mejor compañía: Pistacho, Cajú & Sambayón.

Al chico de la máquina de hielo, H.



ENVERS ET CONTRE TOUT

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por adopción, mis amigos.

A mis hermanas, mis grandes porristas.

A Mario.

A mis directores: Gastón y Andrea que, a pesar de las dificultades que hemos tenido, logramos construir un equipo, haciendo de esta tesis una instancia de verdadero aprendizaje. Gracias por orientarme a la hora de tomar decisiones, por impulsarme y guiarme estos 6 años.

A Cecilia Venturini y Juan Manuel Unzaga por permitirme realizar mi tesis doctoral en el LAINPA.

A CONICET por becarme para poder realizar la carrera de doctorado.

A la UNLP, sin educación pública no hay futuro.

A Selva e Isidoro.

A mi gran amiga y sostén, Marianucha.

A mi co-equiper del sucucho, Kevin.

A todo el equipo del LAINPA.

A mi compañero, Hernán.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS VINCULADAS AL TRABAJO DE TESIS

PUBLICACIONES CON REFERATO

- **Helman E***, Dellarupe A*, Cifuentes S, Chang Reissig E, Moré G. (2023). Identification of *Sarcocystis* spp. in wild boars (*Sus scrofa*) from Argentina. Parasitology Research, 122(2):471-478. DOI: 10.1007/s00436-022-07743-w.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- **XXII Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico.** Identificación de *Sarcocystis* spp. en Jabalíes (*Sus scrofa*) del Noroeste Patagónico. **Helman E**, Chang Reissig E, Dellarupe A, Venturini MC, Moré G; noviembre de 2018. Asistencia y poster.
- **XXXII Jornadas Argentinas de Mastozoología.** Diagnóstico e identificación de *Sarcocystis* spp. en jabalíes (*Sus scrofa*) en la Reserva Natural Bahía de Samborombón. **Helman, E.**, Barandiaran S, Dellarupe A, Venturini MC, Rojas P, Castresana G, Carpinetti B, Marfil MJ, Moré G; noviembre de 2019. Poster y resumen.
- **X Jornada de Jóvenes Investigadores.** FCV (UBA). Identificación y diferenciación de *Sarcocystis* spp. en suinos de Argentina. **Helman E**, Dellarupe A, Moré G; junio del 2021. Asistencia y poster.

- **Ciclo de Seminarios del Departamento de Microbiología, Inmunología, Biotecnología y Genética.** FFyB (UBA). Identificación y diferenciación de *Sarcocystis* spp. en suinos de Argentina; julio del 2021. Exposición virtual.
- **IX Congreso Argentino de Parasitología. Asociación Argentina de Parasitología.** Diagnóstico de *Sarcocystis* spp. en jabalíes (*Sus scrofa*) de Argentina. **Helman E**, Dellarupe A, Moré G; junio del 2022. Asistencia y poster.
- **6th International Meeting on Apicomplexan Parasites in Farm Animals. ApicoWplexa 2022.** Diagnosis of *Sarcocystis* spp. in pigs and wild boars from Argentina". **Helman E**, Dellarupe A, Moré G; octubre del 2022. Póster.
- **XXI Jornadas de Actualización Porcina 2022.** Diagnóstico de *Sarcocystis* spp. en cerdos de Argentina. **Helman E**, Dellarupe A, Moré G; noviembre del 2022. Asistencia y poster.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS VINCULADAS DE MODO INDIRECTO AL TRABAJO DE TESIS

PUBLICACIONES CON REFERATO

- Bernstein M, Pardini L, Campero LM, **Helman E**, Unzaga JM, Venturini MC, Moré G (2020). Evaluation of biological behavior of *Toxoplasma gondii* atypical isolates# 14 and# 163. *Experimental parasitology*, 211, 107860. DOI: 10.1016/j.exppara.2020.107860.
- Reissig EC, **Helman E**, Moré G (2020). *Sarcocystis* spp. infection in South American deer huemul (*Hippocamelus bisulcus*) and pudu (*Pudu puda*) from Patagonian National Parks, Argentina. *Parasitology Research*, 119(11), 3915-3922. DOI: 10.1007/s00436-020-06889-9.
- López Arias L, De la Fournière S, **Helman E**, Consiglio E, Etchemendy S, Farber M (2022). Enteroparasitosis en una población infantil del municipio de Hurlingham, Buenos Aires. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 82(6). ISSN: 0025-7680.
- Servián A*, **Helman E***, Iglesias MDR, Panti-May JA, Zonta ML, Navone, GT (2022). Prevalence of Human Intestinal *Entamoeba* spp. in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis, 1990–2022. *Pathogens*, 11(11). DOI: 10.3390/pathogens11111365.
- Berra Y, Moré G, **Helman E**, Argibay HD, Orozco MM (2023). Identification of a new *Sarcocystis* sp. in marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) from wetlands of

Argentina. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife 20:39-45.

DOI: 10.1016/j.ijppaw.2022.12.007.

- Canova V*, **Helman E**¹, Robles MR, Abba AM, Moré G (2023). First report of *Sarcocystis* spp. (Apicomplexa, Sarcocystidae) in *Lagostomus maximus* (Desmarest, 1917) (Rodentia, Chinchillidae) in Argentina. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife 20:180-186. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2023.03.001.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- **IX Congreso Argentino de Parasitología. Asociación Argentina de Parasitología.** Seroconversión de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* durante la gestación y lactancia en cabras naturalmente infectadas. Steffen KD, **Helman E**, Gos ML, Arias RO, Moré G; junio del 2022. Asistencia y poster.

- **IX Congreso Argentino de Parasitología. Asociación Argentina de Parasitología.** Identificación del primer genotipo clonal de *Toxoplasma gondii* y no clonal como predominantes en casos de toxoplasmosis congénita en Argentina. Bernstein M, Pardini L, Dellarupe A, Gos ML, **Helman E**, Schneider V, Medina M, Moré G, Unzaga JM, Venturini MC; junio del 2022. Asistencia y poster.

- **XI Jornadas de Jóvenes Investigadores.** FCV (UBA). Factores que influyen en la variación del título de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en caprinos. Steffen KD, **Helman E**, Gos ML, Arias RO, Moré G; junio del 2022. Asistencia y poster.

^{1*} Ambas autoras contribuyeron de forma equivalente en la realización del trabajo.

- **XXI Jornadas de Actualización Porcina 2022.** Presencia de *Cryptosporidium* spp. en cerdos de categorías lactancia y recientemente destetados de establecimientos intensivos de Argentina. De Felice, L, Cappuccio, J, Bonzo, E, **Helman, E**, Venturini, MC, Unzaga, JM; noviembre del 2022. Asistencia y poster.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	19
1.1. Historia del género <i>Sarcocystis</i>	20
1.2 Ubicación taxonómica	21
1.3 Morfología	22
1.4 Ciclo biológico de <i>Sarcocystis</i> spp	24
1.5 Patogenia y signología clínica	28
1.6 Métodos diagnósticos	34
1.7 Tratamiento y profilaxis	43
1.8 Epidemiología y pérdidas económicas	46
2. OBJETIVOS	54
3. HIPÓTESIS	55
4. MATERIALES & MÉTODOS	56
4.3 Examen microscópico en fresco	59
4.4 MET	60
4.5 Histopatología de muestras de cerdos	61
4.6 Extracción de ADN, PCR y secuenciación	61
4.7 Análisis estadístico	63
5. RESULTADOS	65
5.1 Examen microscópico	65
5.2 MET	67

5.3 Histopatología de muestras de cerdos	69
5.4 Estudios Moleculares	70
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	76
7. DISCUSIÓN	81
8. CONCLUSIONES.....	92
9. ANEXOS.....	93
10. BIBLIOGRAFÍA	101

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

csp: cantidad suficiente para completar volumen

cox I: subunidad I citocromo-oxidasa C mitocondrial

dpi: días post infección

ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

HD: hospedador definitivo

HI: hospedador intermediario

hpi: horas post infección

IFI: inmunofluorescencia indirecta

ITS 1: espaciador transcritto interno 1

LAINPA: Laboratorio de Inmunoparasitología

MEB: microscopía electrónica de barrido

MET: microscopía electrónica de transmisión

MLG: modelo lineal generalizado

MO: microscopía óptica

pb: pares de bases

pi: post infección

PBS: solución buffer de fosfatos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCR-RFLP: PCR con polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

qPCR: PCR en tiempo real

SNC: sistema nervioso central

18S ARNr: 18S ácido ribonucleico ribosomal

28S ARNr: 28S ácido ribonucleico ribosomal

TÍTULO

Identificación y diferenciación de *Sarcocystis* spp. en suinos de Argentina

PALABRAS CLAVE

Sarcocystis spp., suinos, Argentina, diagnóstico, microscopía, PCR.

RESUMEN

La sarcocystosis porcina es una infección parasitaria de amplia distribución mundial, causada por una o más especies de *Sarcocystis* (Phylum Apicomplexa), que afecta a los cerdos domésticos (*Sus scrofa domestica*) y jabalíes (*Sus scrofa*). *Sarcocystis miescheriana* y *S. suihominis* afectan a suinos como hospedadores intermediarios y tienen como hospedadores definitivos a los cánidos y a los humanos (y otros primates), respectivamente.

El objetivo de esta tesis doctoral fue la identificación y diferenciación de las especies de *Sarcocystis* presentes en cerdos domésticos y jabalíes de Argentina. Para ello, muestras de músculos (principalmente diafragma) de 561 cerdos y 240 jabalíes fueron analizadas por métodos de microscopía y biología molecular. Las muestras de cerdos se clasificaron según su sistema de cría como: intensiva (CI, n=295 animales mantenidos en confinamiento durante la mayor parte de su ciclo productivo) o semiextensiva (CSE, n=266 animales criados al aire libre, en producción familiar y/o de traspatio). Para el estudio de las muestras de jabalíes se establecieron tres regiones: Pampeana-Litoral (PL, n=56), Noroeste Patagónico (NOP, n=94) y Noreste Patagónico (NEP, n=90). A su vez, las 240

muestras de músculos recolectadas se procesaron como *pool de músculos* ($n=113$), *diafragma* ($n=76$) y *otros músculos* ($n=51$).

En todas las muestras, tanto las de cerdos como las de jabalíes, se realizó la observación directa de homogenatos en microscopio invertido, y se almacenaron alícuotas de éstos y quistes individualizados para estudios moleculares. Se recogieron quistes de 10 cerdos y de 11 jabalíes para analizarlos por MET. Todas las muestras de jabalíes y 202 muestras de cerdos aleatoriamente seleccionados ($n_{CI}=104$ y $n_{CSE}=98$) fueron analizadas por PCR del fragmento del gen *18S ARNr* de *Sarcocystis* spp. Además, las muestras que resultaron positivas se procesaron mediante una PCR específica de *S. sui hominis* dirigida al gen *cox I*.

El 24,8% (139/561) de las muestras de cerdos resultaron positivas por microscopía, siendo significativamente mayor en los cerdos de CSE (34,6%; 92/266) respecto de los cerdos de CI (15,9%; 47/295) (p valor < 0,05). De las 202 muestras analizadas por PCR del fragmento del *18S rRNA*, el 47,5% (96/202) de los homogenatos analizados resultaron positivos, pero ninguno para la PCR del gen *cox I*. Catorce y cuatro quistes individuales fueron positivos para las PCRs del *18S ARNr* y del *ITS1*, respectivamente, y secuenciados. Las secuencias de fragmentos del *18S ARNr* oscilaron entre 613 y 880 pb y mostraron 100% de identidad entre ellos y con las secuencias de *S. miescheriana* reportadas previamente, y las del *ITS1* (entre 415 a 560 pb) mostraron una identidad de 99% - 99.8% entre ellos y con secuencias de *S. miescheriana*. En cuanto al análisis histopatológico, de las 6 muestras analizadas sólo 2 presentaron 1 quiste cada una, y ninguna presentó lesiones. En todas las muestras porcinas analizadas por MET, la ultraestructura de la pared quística fue compatible con *S. miescheriana*.

El 48,3% (116/240) de las muestras de jabalíes fue positivo por microscopía directa y el 45,8% (110/240) por PCR del fragmento del *18S ARNr*. Dentro de éstas últimas, el 3,6% (4/110) resultaron positivas a la PCR de *cox I*. Sin embargo, la concentración de ADN obtenida en las muestras amplificadas resultó insuficiente para su posterior secuenciación. Las tasas de infección con *Sarcocystis* spp. en jabalíes de las regiones *PL* y *NOP* resultaron significativamente mayores a la reportada en *NEP*. No se observaron diferencias significativas en la tasa de infección entre los músculos analizados. Por otro lado, 17 quistes individuales fueron positivos por PCR para el fragmento de *18S ARNr*, cuyas secuencias mostraron una identidad del 99,75% al 100% entre sí y con las secuencias de *S. miescheriana*. La ultraestructura de la pared de los quistes por MET fue consistente con *S. miescheriana* en las 11 muestras; y en una de ellas se detectó también un quiste de *S. suihominis*.

La prevalencia de *Sarcocystis* spp. fue significativamente mayor en jabalíes que en cerdos, incluso que los de CSE (p valor < 0,05). En conclusión, el hallazgo de la especie zoonótica *S. suihominis* en una muestra de músculo de jabalí representa el primer reporte en América del Sur. Esto confirma un cierto riesgo de infección para los humanos, especialmente por el consumo de carne cruda y/o insuficientemente cocida. A la fecha, este es el primer estudio que analiza la tasa de infección con *Sarcocystis* spp. en suinos de Argentina, mediante técnicas moleculares y de microscopía.

TITLE

Identification and differentiation of *Sarcocystis* spp. in swines of Argentina.

KEY WORDS

Sarcocystis spp., swines, Argentina, diagnostic, microscopy, PCR.

ABSTRACT

Swine sarcocystosis is a parasitic infection with a worldwide distribution, caused by one or more species of *Sarcocystis* (Phylum Apicomplexa) which affects domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) and wild boars (*Sus scrofa*). *Sarcocystis miescheriana* and *S. suis* affect swine as intermediate host and have canids and humans (and other primates) as definitive host, respectively.

The objective of this doctoral thesis is the identification and differentiation of *Sarcocystis* species present in domestic pigs and wild boars from Argentina. Muscle samples (mainly diaphragm) from 561 pigs and 240 wild boars were analyzed by microscopy and molecular biology techniques. Pig samples were classified according to their farming system as: intensive (*IF*, $n=295$, animals kept in confinement during most of their productive cycle) or semi-extensive (*SEF*, $n=266$, animals raised outdoors, in family and/or backyard production). Regarding wild boar samples, three regions were established: Pampean-Litoral (*PL*, $n=56$), Northwestern Patagonian (*NWP*, $n=94$) and Northeastern Patagonian (*NEP*, $n=90$). In turn, the 240 muscle samples collected were processed as *muscle pool* ($n=113$), *diaphragm* ($n=76$) and *other muscles* ($n=51$).

All samples, both pigs and wild boars, underwent direct observation of homogenates using an inverted microscope, and homogenates aliquots and individualized cysts were stored for subsequent molecular studies. Cysts were collected from 10 pigs and 11 wild boars for transmission electron microscopy analysis. All wild boar samples and 202 randomly selected pig samples ($n_{IF}=104$ and $n_{SEF}=98$) were analyzed by PCR of the *18S rRNA* gene fragment. In addition, the samples which were positive have been also processed by means of a *S. suis* specific PCR directed to the *cox I* gene.

The 24.8% (139/561) of the pig samples were positive by direct microscopy, being significantly higher in *SEF* pigs (34.6%; 92/266) compared to *IF* pigs (15.9%; 47/295) (p value < 0.05). Of the 202 samples tested by PCR for the *18S rRNA* fragment, 47.5% (96/202) of the homogenates tested were positive, but none for *cox I* gene PCR. Fourteen and four individual cysts were positive for the *ITS1* and the *18S rRNA fragment* PCRs, respectively, and sequenced. Sequences obtained from the *18S rRNA* ranged between 613 and 880 bp and showed 100% identity between them and with previously reported *S. miescheriana* sequences, and the *ITS1* fragments were between 415 and 560 bp and showed 99% - 99.8% identity between them and with *S. miescheriana* sequences. Regarding the histopathological analysis, of the 6 samples analyzed only 2 presented 1 cyst each, and none presented lesions. In all porcine samples analyzed by TEM, the ultrastructure of the cystic wall was compatible with *S. miescheriana*.

The 48.3% (116/240) of wild boar samples was positive by microscopy and 45.8% (110/240) by PCR of the *18S rRNA* fragment, of which 3.6% (4/110) were positive for *cox I* PCR. However, the DNA concentration obtained in the amplified samples was insufficient

for subsequent sequencing. Infection rates with *Sarcocystis* spp. in wild boars from the *PL* and *NWP* regions were significantly higher than that reported in *NEP*. No significant differences were observed in the infection rate between the muscles analyzed. On the other hand, 17 individual cysts were positive by PCR for the *18S rRNA* fragment, whose sequences showed 99.75% to 100% identity with each other and with *S. miescheriana* sequences. The ultrastructure of the cyst wall by TEM was consistent with *S. miescheriana* in all 11 samples; and in one of them, a cyst of *S. suihominis* was also observed.

The prevalence of *Sarcocystis* spp. it was significantly higher in wild boars than in pigs (p value < 0.05) even than in *SEF* pigs (p value < 0.05). In conclusion, the finding of the zoonotic species, *S. suihominis*, in a wild boar muscle sample represents the first report in South America. This confirms a certain risk of infection for humans, especially from the consumption of raw and/or undercooked meat. To date, this is the first study to analyze the rate of infection with *Sarcocystis* spp. in swine from Argentina, through microscopic and molecular methods.

1. INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Sarcocystis* son parásitos intracelulares, clasificados como protozoos coccidios del *phylum* Apicomplexa, pertenecientes a la familia Sarcocystidae, filogenéticamente relacionados con *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii*. Las *Sarcocystis* spp. son definidas como “formadores de quistes musculares”, particularidad que da nombre al género (del griego *Sarcon* = músculo y *kistis* = quiste) (Dubey y col., 2016).

A nivel mundial, la sarcocistosis es una de las infecciones parasitarias más frecuentes en animales de sangre caliente y poiquilotermos. Estos protozoos presentan ciclos evolutivos indirectos obligados, facilitados por relaciones tróficas del tipo predador-presa, utilizando generalmente herbívoros (presa) como hospedador intermediario (HI) y carnívoros u omnívoros (predador) como hospedador definitivo (HD) (Dubey y col., 2016). En los HI se multiplican asexualmente, formando quistes musculares, mientras que en los HD se multiplican sexualmente en el intestino, eliminando con las heces esporocistos u ooquistes. Esto último, representa la fuente de infección para los HI, los cuales los ingieren con el alimento y/o el agua contaminada (Fayer, 2004).

En particular, la sarcocistosis porcina es una infección de amplia distribución mundial causada por *S. miescheriana* y/o *S. suihominis*, especies productoras de quistes musculares en los cerdos domésticos (*Sus scrofa domestica*) y jabalíes (*Sus scrofa*).

1.1 HISTORIA DEL GÉNERO *SARCOCYSTIS*

Friedrich Miescher, biólogo y médico suizo, fue quien en 1843 halló unas “fibrillas blanquecinas” en músculo estriado de ratón (*Mus musculus*), que recibieron luego el nombre de **túbulos de Miescher** (Fayer, 2004). Dentro de dichas fibrillas se observaban unos orgánulos que, en un principio, se consideraron esporas y fueron llamados **corpúsculos de Rainey** (Dubey y col., 1989a). En 1865 Kühn encontró estructuras similares en el músculo del cerdo y las llamó *Synchytrium miescheriana*. Sin embargo, ésta no sería la designación definitiva del género, dado que ya estaba en uso para otro organismo (Dubey y col., 1989b; Lindsay y col., 1995). Fue recién en 1882 que se introdujo el nombre de *Sarcocystis* y, luego, en 1899 Labbé propuso a *Sarcocystis miescheriana* como especie tipo del género (Dubey y col., 1989b). En las décadas siguientes, se nombraron muchas especies de *Sarcocystis* basándose en el hallazgo de quistes musculares en distintos animales, los cuales se denominaron en inglés como *sarcocysts*, cuya traducción literal sería sarcoquistes (Fayer y col., 2015).

Durante muchos años, la posición taxonómica de *Sarcocystis* fue incierta y ampliamente discutida. En 1882, Bütschli estableció a estos protozoarios dentro del orden Sarcosporidia, pero continuaron oscilando entre los grupos Cnidosporidia, Acnidosporidia y/o Sporozoa (Poulsen & Stensvold, 2014; Fayer y col., 2015). Esto se debió a que, en estudios donde se inocularon quistes de *Sarcocystis* spp. en cultivos de células, éstos desarrollaban hifas y micelios como resultado de la contaminación y, por lo tanto, se pensó que este protozoario era un tipo de organismo fúngico (Fayer y col., 2015).

Fue recién en 1967 cuando se estudiaron los quistes musculares mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), y se observó que las estructuras contenidas dentro de los sarcoquistes no eran esporas fúngicas, sino zoítos morfológicamente similares a los de otros protozoos Apicomplexa, como *T. gondii* o *Eimeria* spp. (Fayer y col., 2015). En 1972, se logró describir el ciclo biológico como heteroxeno o indirecto, cuando se inocularon sarcoquistes provenientes de músculos de aves en células de mamíferos cultivadas y se desarrollaron estadios sexuales y ooquistes (Fayer, 1970; 1972; Heydorn & Rommel, 1972). Posteriormente, se identificaron diferentes ciclos del tipo indirecto obligado, con estadios asexuales en los HI y sexuales en los HD (Fayer, 2004; Dubey y col., 2016).

Actualmente, se sabe que aquello que se denominaba como túbulos de Miescher corresponde a las últimas generaciones de merontes en músculos o quistes musculares, mientras que lo que se llamaba esporas son en realidad, los bradizoítos (o merozoítos de división lenta) (Dubey y col., 2016).

1.2 UBICACIÓN TAXONÓMICA

Sarcocystis spp. son protozoarios intracelulares del phylum Apicomplexa, del orden Eucoccida, que infectan a mamíferos, aves y reptiles, ampliamente distribuidos a nivel mundial (Dubey y col., 2016). En 1998, Odening actualizó la clasificación taxonómica de este género, incluyendo alrededor de 189 especies (Odening, 1998). Desde entonces, el número de especies descritas ha ido aumentando, superando las 250 especies reportadas, lo cual se asocia al creciente interés por *Sarcocystis* en la vida silvestre y en la salud pública (Dubey y col., 2016). Estos protozoarios pertenecen a:

Phylum: Apicomplexa (Levine, 1979)

Clase: Sporozoasida (Leuckart, 1879)

Orden: Eucoccidiorida (Leger and Duboseq, 1910)

Familia: Sarcocystidae (Poche, 1913)

Género: *Sarcocystis* (Lankester, 1882)

Especie tipo: *Sarcocystis miescheriana* (Kuhn, 1865; Labbe, 1899)

1.3 MORFOLOGÍA

Los zoítos de este género se caracterizan por presentar un complejo apical completo, propio del Phylum Apicomplexa. Los bradizoítos representan el estadio parasitario resultante de sucesivas divisiones asexuales lentas, presentes en quistes musculares. Sus dimensiones varían según las especies del género, pero la mayoría presentan forma de “banana”, pudiendo medir entre 15-17 μm de largo (Dubey y col., 2016).

De acuerdo a la especie, los quistes tabicados varían en tamaño y forma, en la mayoría de las especies, son fusiformes y microscópicos (*S. cruzi*, *S. neurona*, *S. miescheriana*, entre otras), mientras que algunas desarrollan quistes macroscópicos (*S. gigantea*, *S. hardangeri*, *S. aucheniae* y *S. hirsuta*, entre otras). A su vez, todos los quistes se ubican dentro de una vacuola parasitófora, que se transforma en la pared del quiste y es la interfaz de contacto con el citoplasma de la célula huésped, pudiéndose hallar más de un quiste por célula infectada (Regensburger y col., 2015; Dubey y col., 2016).

Los quistes de las distintas especies de *Sarcocystis* tienen una pared con características ultraestructurales propias, útiles para distinguirlas, otorgándole valor diagnóstico. Dicha

pared representa la interfaz de comunicación de los protozoos con el citoplasma de la célula hospedadora. Está formada por modificaciones de la membrana de la vacuola parasitófora, una capa densa de electrones y una capa granular, de donde pueden surgir tabiques ($>2 \mu\text{m}$ de espesor), que dividen al quiste en compartimentos, los cuales contienen a los zoítos (Dubey y col., 2016). Esta pared puede ser lisa, estriada, hirsuta o con protuberancias ramificadas que pueden contener gránulos diminutos, cuerpos densos en electrones y/o microtúbulos (Dubey y col., 2016). A su vez, los quistes pueden seguir aumentando de tamaño, pero la estructura de la pared se estabiliza una vez que se han formado los bradizoítos (Dubey y col., 2016).

Los ooquistes maduros presentan paredes delgadas y de fácil ruptura, tal que es poco frecuente observarlos en las heces de los HD. Es por esto que las estructuras infectantes que comúnmente se hallan en la materia fecal son los esporocistos (Dubey y col., 2016). Éstos tienen una pared formada por una capa externa, delgada y continua y una capa interna gruesa. Presentan una morfología oval y pueden medir entre 10 a 14 μm de largo. Durante el desenquistamiento en el tubo digestivo de los HI, las sales biliares y/o la tripsina actúan sobre esta pared, permitiendo la liberación de esporozoítos en la luz intestinal (Dubey y col., 2016). Éstos se caracterizan por poseer: un cuerpo cristalóide, un núcleo central o terminal y varios gránulos citoplasmáticos. El cuerpo cristalóide consta de gránulos electrodensos y transparentes (38 nm de diámetro) y, generalmente, se localiza en la mitad posterior del esporozoíto (Dubey y col., 2016). Cabe aclarar que tanto la estructura de los ooquistes como de los esporocistos carecen de valor taxonómico porque, en general, son estructuralmente similares entre las distintas especies.

En lo que respecta a las especies que afectan a suinos como HI, tanto *S. miescheriana* como *S. sui hominis* presentan quistes de paredes gruesas y estriadas ($\geq 3 \mu\text{m}$) (Fayer y col., 2015; Dubey y col., 2016). Los quistes maduros de ambas especies pueden llegar a medir $1500 \mu\text{m}$ de largo por $200 \mu\text{m}$ de ancho. En particular, la pared quística de *S. miescheriana* tiene un grosor de 3 a $6 \mu\text{m}$ y aparece radialmente estriada, con una membrana plegada formando vellosidades o protuberancias (vp) de hasta $5 \mu\text{m}$ de largo y $1,3 \mu\text{m}$ de ancho (MET tipo 10b, (Dubey y col., 2016). En cuanto a los quistes *S. sui hominis*, su pared tiene un grosor de 4 a $9 \mu\text{m}$ y es de apariencia hirsuta, con vp de hasta $13 \mu\text{m}$ de largo (MET tipo 31) (Dubey y col., 2016). Por otro lado, los bradizoítos de *S. miescheriana* miden $17,1 \times 3,8 \mu\text{m}$, mientras que los de *S. sui hominis* miden $15 \times 4,5 \mu\text{m}$ (Heydorn, 1977; Mehlhorn, 1978; Mehlhorn & Heydorn, 1978; Avapal y col., 2003).

1.4 CICLO BIOLÓGICO DE SARCOCYSTIS SPP.

Los bradizoítos de *Sarcocystis* spp. inducen la endocitosis e ingresan a las células del intestino delgado de los HDs, donde se rodean de la pared celular formando vesículas, denominadas **vacuolas parasitóforas**. Allí se diferencian en micro y macrogametocitos, etapa conocida como **gametogonia**. Posteriormente, ocurre la fusión de las gametas y producción de ooquistes inmaduros (Fayer y col., 2015; Dubey y col., 2016).

Todas las especies del género desarrollan la etapa de maduración de ooquistes o **esporogonia** en la lámina propia del intestino del HD. Los ooquistes maduros o esporulados están formados por dos esporocistos, cada uno de los cuales contiene cuatro esporozoítos y un cuerpo residual refráctil (Dubey y col., 2016; Rosenthal, 2021). La pared

de los ooquistes maduros es muy delgada y, generalmente se rompe liberando los esporocistos con las heces, entre 7 a 15 días pi, proceso que se mantiene durante varios meses (Dubey y col., 2016). Cuando los esporocistos son ingeridos por un HI susceptible a través de agua y/o alimentos contaminados, pasan al tracto gastrointestinal, donde su pared es degradada, tanto por la acción de los jugos gástricos como por las enzimas pancreáticas. De esta forma, los esporozoítos se liberan, migran a través del epitelio intestinal y se multiplican asexualmente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (7-15 dpi) (Dubey y col., 2016). En general, se suceden varias generaciones de multiplicación asexual, etapa denominada **esquizogonia** o **merogonia**, dando origen a esquizontes o merontes conteniendo numerosos merozoítos (Fayer y col., 2015; Dubey y col., 2016). Los merozoítos derivados de la primera generación invaden pequeños capilares y vasos sanguíneos, convirtiéndose así en merozoítos de segunda generación, los cuales se dirigen a células musculares (principalmente: músculo estriado, esquelético y/o cardíaco) (Rosenthal, 2021). Allí forman quistes tabicados que, inicialmente contienen células globosas denominadas **metroцитos**, luego sufren varias divisiones internas denominadas **endodiogonia**, generando así merozoítos con forma de “banana”, que se caracterizan por presentar una división asexual lenta, motivo por el cual reciben el nombre de **bradizoítos** (del griego: *brady* = lento, *zoite* = animal pequeño). Los quistes con bradizoítos son considerados maduros e infectantes para los HD (Dubey y col., 2016). Estos últimos adquieren la infección tras consumir músculos de HI que contengan quistes maduros, que al llegar al tracto gastrointestinal y por efecto enzimático liberan los bradizoítos, que ingresarán en células del epitelio intestinal y comenzarán la **gametogonia**

(Fayer y col., 2015; Dubey y col., 2016). Hasta el momento, no se ha evidenciado que la ruptura de quistes musculares en el HI pueda iniciar nuevas rondas de replicación asexual (Rosenthal, 2021). Las especies que afectan a suinos como HI presentan dos generaciones de reproducción asexual (merogonia) de características similares. La primera generación de esquizogonia ocurre en endotelio de arteriolas mesentéricas y, la segunda sucede en el endotelio de diversos órganos. Los merontes de primera generación se desarrollan en la primera semana pi, mientras que la segunda generación merogónica se desarrolla de 7-13 y de 7-20 dpi en *S. miescheriana* y en *S. suis* (Fig.1 y 2), respectivamente (Heydorn, 1977; Mehlhorn, 1978; Mehlhorn & Heydorn, 1978; Barrows y col., 1982a; 1982b). Los merozoítos de segunda generación penetran en células del músculo esquelético estriado y, en el caso de *S. miescheriana*, también en músculo cardíaco. En ambas especies, los primeros quistes musculares se observan aproximadamente en uno o dos meses pi.

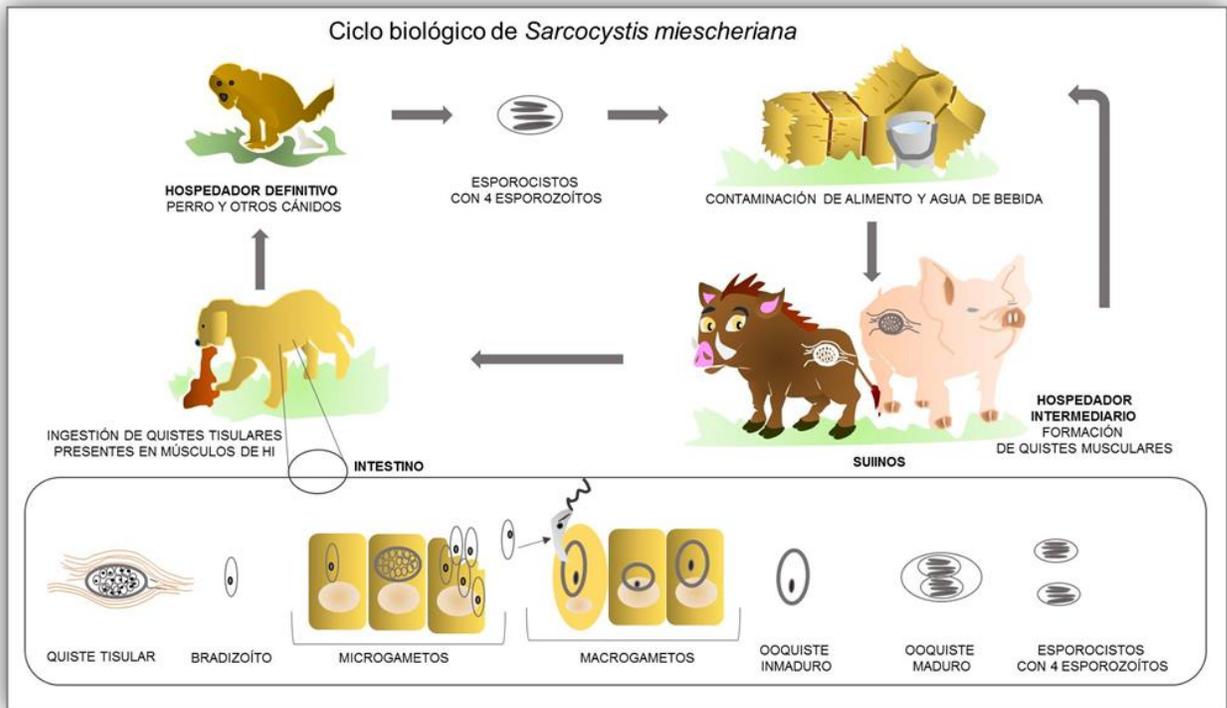


Figura 1. A. Ciclo biológico de *Sarcocystis miescheriana* (HI: suinos, HD: cánidos).

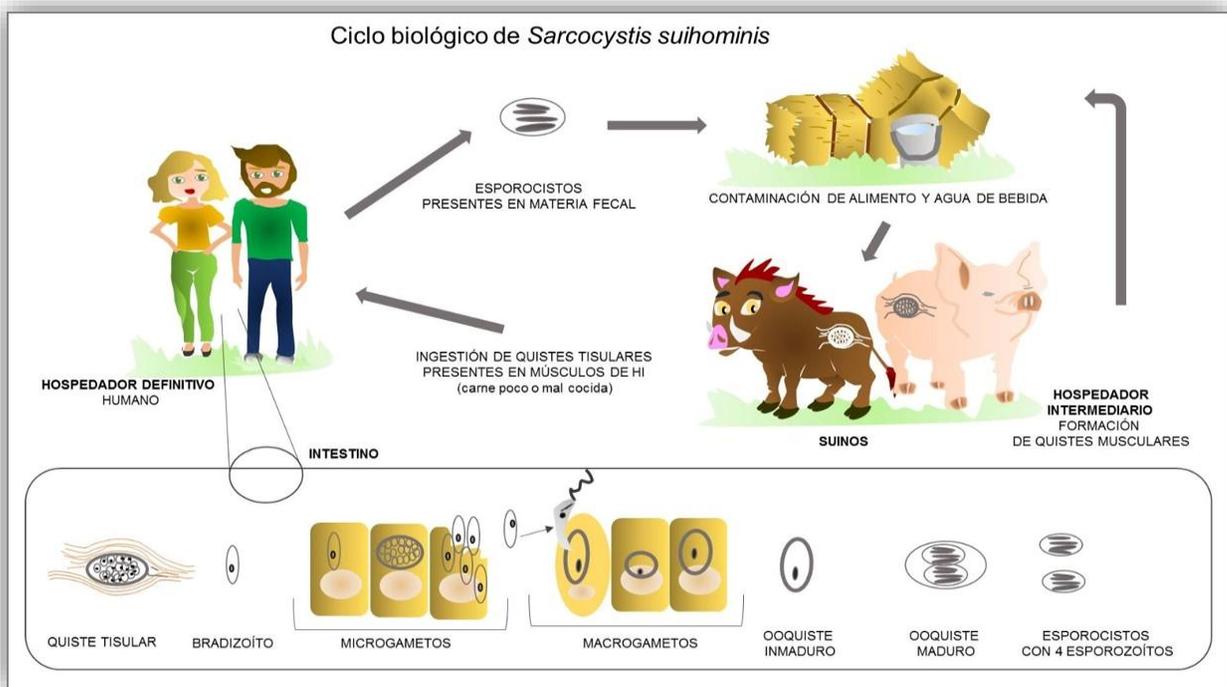


Figura 2. Ciclo biológico de *Sarcocystis suihominis*. (HI: suinos, HD: homínidos).

1.5 PATOGENIA Y SIGNOLOGÍA CLÍNICA

La signología y patogenicidad varían según la especie de *Sarcocystis* causal de la infección y del tipo de hospedador del que se trate. Sin embargo, la mayoría de las infecciones naturales permanecen asintomáticas tanto en HD como en HI (Dubey y col., 2016).

1.5.1 SARCOCYSTOSIS EN HI

A pesar de la alta prevalencia reportada en varios países (Pritt y col., 2008; Moré y col., 2011; Vangeel y col., 2013), estos parásitos rara vez causan síntomas clínicos (Dubey y col., 2016), ocasionando una miopatía subclínica (es decir, presencia de quistes musculares con o sin inflamación asociada, pero sin signos clínicos detectables). Sin embargo, se ha visto que aquellas especies que tienen a los cánidos como HD resultan ser las más patógenas para los HI (Dubey y col., 2016), donde la severidad del caso depende de varios factores como ser: la especie de *Sarcocystis* infectante, la cantidad de esporocistos ingeridos y el estado inmunológico del animal (gestación, lactancia, estrés) (Lindsay y col., 1995; Fayer, 2004; Reiner y col., 2007a; 2007b; Caspari y col., 2011).

Los bovinos son HI de varias *Sarcocystis* spp. dentro de las que se destacan *S. cruzi*, *S. hirsuta* y *S. hominis*, cuyos HDs son cánidos, félidos y humanos, respectivamente. *Sarcocystis cruzi*, la especie más patógena, presenta tropismo por el músculo cardíaco donde forma quistes microscópicos (Bottner y col., 1987; Dubey y col., 1989a; Moré y col., 2008; Dubey & Rosenthal, 2022). En general, cursa de manera crónica y asintomática; sin embargo, en infecciones experimentales con altas cargas ($>2 \times 10^5$ esporocistos) puede desarrollar: anorexia, diarrea, pérdida de peso, debilidad, contracciones musculares,

postración e incluso la muerte. Las hembras preñadas pueden sufrir mortalidad embrionaria, aborto o nacimiento de terneros débiles o muertos, y en terneros se vinculó la sarcocystosis con pérdidas en la ganancia diaria de peso (Dubey y col., 2016; Moré y col., 2010). Tanto *S. hominis*, cuya relevancia radica en su carácter zoonótico (Fayer, 2004; Rosenthal, 2021), como *S. hirsuta*, productora de quistes macroscópicos, se han reportado principalmente en músculo esofágico, lomo y diafragma (Dubey y col., 1989b; Moré y col., 2011). A la fecha, existe un sólo reporte de decomiso de 18 bovinos que contenían quistes de *S. hirsuta*, presentes en el diafragma, músculos de extremidades y del esófago (Dubey y col., 1990).

Por otro lado, la miositis eosinofílica (ME) en bovinos es una condición inflamatoria específica de los músculos estriados, producida por la acumulación de eosinófilos (Vangeel y col., 2013; Dubey & Rosenthal, 2022). Esta patología afecta a casi todos los músculos estriados (incluyendo músculos esqueléticos, del ojo, de la laringe y del corazón) y se ha encontrado asociada con estas tres especies de *Sarcocystis* previamente descritas (Imes & Migaki, 1967; Jensen y col., 1986; Saito y col., 1993; Vangeel y col., 2013). La ME suele detectarse post mortem cuando se inspecciona la carne, pudiendo ser motivo de decomiso en los mataderos (Jensen y col., 1986; Dubey & Rosenthal, 2022). Si bien la etiología de esta patología sigue siendo incierta, se ha considerado que *Sarcocystis* spp. son la causa de la ME, lo cual fue respaldado por el hallazgo de anticuerpos IgE específicos de *Sarcocystis* en las lesiones (Granstrom y col., 1990a).

Por otro lado, los camélidos sudamericanos actúan como HI de *S. aucheniae* y *S. masoni* formadores de quistes macroscópicos y microscópicos, respectivamente, siendo los cánidos

los HDs para ambas especies (Carletti y col., 2013; Lucas y col., 2019; Moré y col., 2016; Wu y col., 2022; Rodriguez y col., 2023). En general, la infección resulta asintomática, aunque existen algunos reportes de cuadros agudos con signología sistémica y aborto en alpacas y llamas (La Perle y col., 1999; Gabor y col., 2010). A nivel mundial, el principal problema radica en la presencia de quistes macroscópicos de *S. aucheniae* en carne de consumo (Regensburger y col., 2015; Moré y col., 2016). En consecuencia, se producen decomisos o depreciaciones que dificultan la comercialización (Leguia, 1991; Saeed y col., 2018). En el hombre, la ingesta de carne insuficientemente cocida y/o cruda infectada con quistes de *S. aucheniae*, produce un cuadro de intoxicación alimentaria, aparentemente debido a la **sarcocystina**, un conjunto de proteínas tóxicas presentes en dichos quistes (Leguia, 1991; Lucas Lopez, 2013).

Los equinos son HI de *S. fayeri* y *S. bertrami*, especies que utilizan a los cánidos como HD. En general la infección es asintomática. Por otro lado, actúan también como hospedadores aberrantes de *S. neurona* causal de la mieloencefalitis protozoaria equina (EPM, por su sigla en inglés), siendo ésta una enfermedad progresiva y debilitante que afecta el SNC de los caballos en América (Masri y col., 1992; MacKay, 1997; Dubey y col., 2001b). Dentro de sus HD se destacan: la comadreja o zarigüeya norteamericana (*Didelphis virginiana*) y la sudamericana (*D. albiventris*) y dentro de sus HI se encuentran: mapaches (*Procyon lotor*), armadillos (*Dasypus novemcinctus*), nutrias marinas (*Enhydra lutris*), zorrinos (*Conepatus* spp. y *Mephitis* spp.) y gatos (*Felis silvestris catus*) (Dubey y col., 2001b; Tanhauser y col., 2001). El caballo se infecta al ingerir alimentos y/o agua contaminados con esporocistos presentes en las heces de los HD, y la signología estaría

dada por la inflamación generada en relación a los estadíos asexuales de *S. neurona* en el cerebro y la médula espinal (Dubey y col., 2015; Reed y col., 2016). Los signos clínicos dependen de la localización de este protozooario dentro del SNC, pudiendo generar: debilidad, tropiezos frecuentes, mala posición de uno o varios miembros, atrofia de los músculos por denervación, ataxia, inclinación de la cabeza y/o asimetría facial. Algunos caballos afectados con EPM tienen una función anormal de las vías respiratorias superiores, cojera o incluso convulsiones (Dubey y col., 2015). Esta patología afecta negativamente a la producción equina debido a la muerte de los caballos, su pérdida o disminución en el rendimiento deportivo, e incluso los altos costos de la atención clínica, así como también su diagnóstico y tratamiento (Dubey y col., 2001b).

Sarcocystis nesbitti, se halló por primera vez en músculos de *Macacos rhesus* (Mandour, 1969), siendo los HI los primates -incluidos los humanos- y las serpientes como pitón reticulada (*Braghammerus reticulatus* syn. *Python reticulatus*) y la cobra monocular (*Naja kaouthia*) como sus HD (Dubey y col., 2016). Los primates se infectan tras ingerir esporocistos presentes en alimentos y/o agua contaminados con heces de serpientes. En ellos, las infecciones tienen una fase temprana de desarrollo en el endotelio vascular, presentando signos clínicos como fiebre, dolor de cabeza, y posteriormente mialgia y miositis, debido a la formación de quistes intramusculares (Fayer, 2004; Rosenthal, 2021). Notablemente, la mayoría de los casos de sarcocistosis muscular en humanos se han reportado en áreas tropicales habitadas por varias especies de serpientes de gran porte (Abubakar y col., 2013; Esposito y col., 2014; Lau y col., 2014; Shahari y col., 2016).

1.5.1.1 SARCOCYSTIS SPP. EN SUINOS

Hasta el momento, se han reportado 3 especies de *Sarcocystis* que afectan a los suinos como HI, las cuales tienen diferentes HD: los cánidos (*Canis lupus familiaris*, *C. lupus*, *C. aureus*, *Vulpes vulpes* y *V. lagopus*) y prociónidos (mapaches o *Procyon lotor*) actúan como HD de *S. miescheriana*, los primates humanos y no humanos (*Macaca mulatta*, *Macaca irus*, *Pan troglodytes* y *Papio cynocephalus*) de *S. sui hominis*, siendo ésta una especie zoonótica y los félidos de *S. porcifelis* (Meshkov, 1980; Dubey, 2015). Sin embargo, la validez de esta última especie está en discusión, ya que se desconoce su distribución, patogenicidad y demás características morfológicas, así como la ultraestructura de la pared y su tamaño (Avapal y col., 2004).

Por otro lado, se sabe que la tasa de infección con *Sarcocystis* spp. en cerdos domésticos es menor que en cerdos salvajes, lo cual se explicaría considerando a las condiciones de cría como un potencial factor de riesgo para la infección con dichos protozoarios (Dubey y col., 2016). A su vez, se considera a *S. miescheriana* como la especie más patógena, debido a que puede ocasionar pérdidas significativas en la producción de carne y signología clínica como: pérdida de peso, dermatitis, disnea, temblores musculares y dificultades locomotoras severas, aborto e incluso la muerte. Las anomalías clínicas se acompañaron de hallazgos en los resultados de laboratorio como anemia grave, leucopenia, trombocitopenia, y coagulación intravascular diseminada (Reiner y col., 2002; Caspari y col., 2011; Dubey y col., 2016). En este sentido, en infecciones experimentales con *S. miescheriana* en cerdos se observó que, al administrar dosis bajas (hasta 1×10^5

esporocistos), se manifestaban signos leves o subclínicos, mientras que las dosis altas ($> 3 \times 10^6$ esporocistos) pueden provocar la signología previamente enunciada (Prestwood y col., 1980; Barrows y col., 1982a; 1982b; Dauschies y col., 1988).

Asimismo, se encontró asociación entre el genotipo del HI y la susceptibilidad a la infección, habiéndose encontrado evidencias de genes que regulan la resistencia a *S. miescheriana*. En este sentido, se vio que cerdos de la raza Pietrain desarrollaron una enfermedad más grave que los de la raza Meishan (Reiner y col., 2002; 2007a; 2007b). Por otro lado, se ha encontrado que cerdos infectados de manera crónica por vía oral, con dosis bajas de esporocistos de *S. miescheriana* (1000 - 50000 esporocistos), se vuelven inmunes cuando se los desafía 80 dpi a dosis letales ($> 3 \times 10^6$ esporocistos) (Weber y col., 1983), sin embargo, este efecto inmunizante para *S. miescheriana*, no resultó protector contra esporocistos de *S. suihominis* (Dubey y col., 2016).

1.5.2 SARCOCYSTIS SPP. EN HD

Hasta el presente, se han descrito tres especies de *Sarcocystis* de interés en salud pública, que tienen a los primates -humanos incluidos- como HD: *S. suihominis*, *S. hominis* y *S. heydorni*, siendo suinos los HI para la primera, y bovinos para las dos últimas especies (Dubey, 2015; Rosenthal, 2021).

La patogenicidad de *S. suihominis* en infecciones humanas, es mayor que la reportada por *S. hominis* (Dubey y col., 1988; 2016). La mayoría de los casos de infección con *S. suihominis* son asintomáticos y autolimitantes y, por lo general, se resuelven dentro de las 36 horas desde su inicio a las 6 hs pi (Fayer, 2004; Abdel-Hafeez y col., 2015; Dubey, 2015;

Fayer y col., 2015). Sin embargo, casos sintomáticos reportados y/o aquellos provenientes de infecciones experimentales, informaron sintomatología gastrointestinal difusa (náuseas, vómitos, diarrea aguda o crónica y dolor abdominal) de mayor duración (Poulsen & Stensvold, 2014; Rosenthal, 2021).

El ganado bovino es considerablemente propenso a la infección por *Sarcocystis* spp. (>62%), desempeñando un papel fundamental en la diseminación de las especies zoonóticas (*S. hominis* y *S. heydorni*) (Shams y col., 2022), ya que el consumo de carne de res poco cocida y conteniendo quistes de *S. hominis* y/o *S. heydorni* tendría una frecuencia relativa alta (Yang y col., 2018; Imre y col., 2019; Rosenthal, 2021). La infección natural y/o experimental con *S. hominis* en humanos, demostró una leve sintomatología gastrointestinal (náuseas, dolor de estómago y diarrea), trastornos respiratorios e incluso taquicardia (Fayer, 2004; Fayer y col., 2015), que pueden durar entre 24-36 hpi y la eliminación de esporocistos ocurre entre 14 y 18 dpi (Dubey y col., 2016). En lo que respecta a *S. heydorni*, tanto su prevalencia a nivel mundial como su patogenicidad aún son poco conocidas (Hu y col., 2016; Rosenthal, 2021).

1.6 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

A lo largo de los años, se han utilizado diferentes métodos diagnósticos de sensibilidad y especificidad variable, tanto en HI como en HD (Dubey y col., 2016). En general, los más utilizados son los métodos directos (detección de los protozoos o moléculas de éstos). Por otro lado, los métodos indirectos (principalmente detección de anticuerpos por diferentes

métodos serológicos) también representan importantes herramientas para el diagnóstico de la sarcocystosis (Rosenthal, 2021).

1.6.1 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DIRECTOS

Dentro de estos métodos se destacan, en los HI: digestión artificial, histopatología, inmunohistoquímica, MO, MEB y MET; en los HD, técnicas coproparasitológicas y en ambos hospedadores, estudios moleculares basados en PCR.

1.6.1.1 EXAMEN EN FRESCO DE MÚSCULOS

En las especies de *Sarcocystis* que presentan quistes macroscópicos, la detección es mediante inspección directa de los músculos del HI, mientras que aquellas especies formadoras de quistes microscópicos se analizan mediante MO (Dubey y col., 2016).

En el caso particular del diagnóstico en suinos, el examen en fresco por MO permite determinar, de manera rápida, si una muestra es positiva a la presencia de *Sarcocystis* spp. Sin embargo, esta metodología no permite diferenciar especies, ya que los quistes tisulares de *S. miescheriana* y *S. suihominis* son similares, por lo que se requieren estudios complementarios para una correcta diferenciación de especie (Saito y col., 1998; Caspari y col., 2011).

1.6.1.2 DIGESTIÓN ARTIFICIAL

La digestión artificial de tejido es uno de los métodos más sensibles para detectar una infección por *Sarcocystis* spp. El procedimiento implica la incubación de músculos con

solución de HCl-pepsina, lo que produce la liberación de cientos o miles de bradizoítos (Box & McGuinness, 1978; Collins y col., 1980; Böttner y col., 1987) que luego son concentrados por centrifugación y observados por MO. Asimismo, los bradizoítos obtenidos pueden ser utilizados como antígenos. Sin embargo, al igual que la técnica anterior, tiene como desventaja que, al disolverse la pared del quiste por la digestión, resulta imposible distinguir especies, por lo que habría que aplicar métodos complementarios como los moleculares (Dubey y col., 2016).

1.6.1.3 HISTOPATOLOGÍA

Mediante estudios histológicos puede lograrse la diferenciación morfológica de *Sarcocystis* spp., y la observación de cambios patológicos asociados a la presencia de quistes. Sin embargo, el diagnóstico de aborto inducido por *Sarcocystis* spp. resulta problemático ya que el parásito no se suele encontrar en tejidos fetales, por lo que se recomienda el análisis de tejidos y suero de la madre y placenta (Dahlgren y col., 2007; Dubey y col., 2016). Por otro lado, si bien el examen histológico es necesario para estudiar la morfología del quiste, este método es el menos sensible, debido a que sólo se puede observar una submuestra de una pequeña cantidad de tejido (Saito y col., 1998; Caspari y col., 2011).

1.6.1.4 INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica con anticuerpos específicos es una herramienta muy útil para el diagnóstico de parásitos presentes en cortes histológicos (Dubey y col., 2016). Sin

embargo, la especificidad depende de la pureza de los reactivos, la variabilidad antigénica entre las especies de *Sarcocystis* utilizadas y los hospedadores utilizados para producir anticuerpos (Dubey y col., 2001a). Es por esto que las reacciones cruzadas entre especies de *Sarcocystis*, cuando se utilizan anticuerpos policlonales, puede ser un problema (Granstrom y col., 1990b; 1991). Si bien se han caracterizado anticuerpos monoclonales específicos contra unas pocas especies de *Sarcocystis*, éstos no están disponibles comercialmente para uso diagnóstico de rutina (Dubey y col., 2016).

1.6.1.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA: MET y MEB

La MET se trata de una técnica muy específica ya que permite la identificación de la ultraestructura de la pared de los quistes, haciendo posible la diferenciación a nivel de especie (Ludvik, 1960; Simpson & Forrester, 1973; Dubey y col., 2016). A la fecha, se han descrito por MET más de 42 tipos y numerosos subtipos de paredes quísticas (o MET *types*) (Dubey y col., 2016). Sin embargo, si bien esta técnica es enriquecedora a nivel descriptivo, su elevado costo y el tiempo que conlleva, hace que en general no forme parte del diagnóstico de rutina (Dubey y col., 2016).

Por otro lado, varias investigaciones que aplicaron MEB han demostrado que diferentes especies de *Sarcocystis* presentan configuraciones superficiales típicas (Böttner y col., 1987; Gjerde, 2009). Por lo tanto, se considera que esta técnica proporciona una imagen tridimensional de la estructura de la pared del quiste. De esta forma, se pueden revelar similitudes y diferencias morfológicas entre diferentes especies de *Sarcocystis*, que no son fácilmente discernibles mediante MO y/o MET (Srolte y col., 1996). Sin embargo, la MEB tiene un uso limitado debido al difícil acceso a parásitos intracelulares, a los costos y al tiempo que conlleva dicho procedimiento (Srolte y col., 1996).

La combinación de fotografías obtenidas de estudios por MO, así como las obtenidas por MET y/o MEB resultan sumamente útiles y enriquecedoras para comprender la morfología y la configuración de la superficie y de las protuberancias de la pared de los quistes de las especies de *Sarcocystis* (Srolte y col., 1996; Dubey y col., 2016).

1.6.1.6 EXAMEN COPROPARASITOLÓGICO

El examen coproparasitológico incluye diferentes técnicas de flotación, sedimentación-flotación combinadas y menos frecuentemente de sedimentación (Fayer, 2004; Tungtrongchitr y col., 2007; Dubey y col., 2016). Los métodos más utilizados son los de concentración por flotación en soluciones concentradas de azúcar o sales ($ZnSO_4$ o NaCl; densidad $\geq 1,20$) que permitan observar los típicos esporocistos ovales de 10 a 14 μm en la MO (Dubey y col., 2016). Los esporocistos de las diferentes especies tienen una morfología semejante, por lo que se requieren estudios moleculares o de infección experimental para diferenciar especies (Dubey y col., 2016). Notablemente, la tinción de Ziehl-Neelsen, comúnmente utilizada para la detección *Cryptosporidium* spp. en las heces, no es captada de manera uniforme por los ooquistes/esporocistos de *Sarcocystis*, por lo que éstos pueden pasar desapercibidos (Poulsen & Stensvold, 2014).

Uno de los métodos más sensibles es la detección de esporocistos/ooquistes en muestras de intestino colectadas durante la necropsia de animales sospechados como HDs. Para esto se utiliza el raspado de la mucosa como material para las técnicas de concentración antes mencionadas (Dubey y col., 2016).

1.6.1.7 ESTUDIOS MOLECULARES

Los estudios moleculares son actualmente esenciales para la identificación específica, tanto en HI como en HD. Previo a la implementación de la biología molecular, la identificación de las especies presentes en HI se basaba principalmente en diferencias morfológicas, propias de los quistes y en estudios de infecciones experimentales (Saito y

col., 1998; Claveria y col., 2001; Dubey y col., 2016). Sin embargo, durante los últimos 20 años, los métodos moleculares han dado lugar a diagnósticos más certeros, eficientes y confiables (Stojceki y col., 2012; Imre y col., 2017; Gazzonis y col., 2019; Huang y col., 2019; Chauhan y col., 2020; Prakas y col., 2020;).

Trabajos recientes sobre diagnóstico e identificación de *Sarcocystis* spp., han secuenciado y analizado cuatro loci, siendo éstos: *18S rRNA*, *28S rRNA*, *ITS1* y *cox I* (Moré y col., 2013; Gazzonis y col., 2019; Huang y col., 2019; Chauhan y col., 2020; Prakas y col., 2020).

El *18S rRNA* fue el primer locus secuenciado, siendo ampliamente utilizado en la identificación de numerosas especies de *Sarcocystis*, así como también en la reconstrucción de sus relaciones filogenéticas (Xiang y col., 2009; Kia y col., 2011; Moré y col., 2013; Huang y col., 2019; Chauhan y col., 2020). Sin embargo, hay que considerar que el poder discriminatorio de este gen a la hora de diferenciar linajes entre especies estrechamente relacionadas no es muy eficiente, debido a su naturaleza altamente conservada (Gazzonis y col., 2019; Huang y col., 2019; Prakas y col., 2020; Rosenthal, 2021).

Por esta razón, para realizar un diagnóstico preciso sería conveniente el uso de más de un marcador genético (Robertson y col., 2019; Rosenthal, 2021). Esto resulta muy útil e interesante, sobre todo cuando algunas especies exhiben una variación de secuencia intraespecífica relativamente baja en una región dada, así como también para delimitar diferencias genéticas entre especies estrechamente emparentadas que comparten hospedador (Gjerde, 2013; Gazzonis y col., 2019; Huang y col., 2019; Prakas y col., 2020).

Por esto, la elección del locus empleado para la identificación de especies de *Sarcocystis* depende del huésped en cuestión (Robertson y col., 2019; Prakas y col., 2020). Por ejemplo, *cox I* es el más apropiado para diferenciar especies de *Sarcocystis* que emplean a rumiantes como HI (Gjerde, 2013; Prakas y col., 2021); en cambio, las especies de *Sarcocystis* que tienen a las aves como HI se puede diferenciar claramente utilizando los marcadores *ITS1* y *28S rRNA*, siendo el primero el que presenta mayor variabilidad (Dubey y col., 2016; Prakas y col., 2018). En lo que respecta a suinos, tanto *ITS1* como *cox I* se han convertido en los marcadores moleculares más fiables, capaces de detectar diferencias moleculares entre *S. miescheriana* y *S. suihominis* (Caspari y col., 2011; Gjerde, 2013; Prakas y col., 2020), en comparación con los resultados obtenidos a partir del *18S RNA* y *28S rRNA* (Gazzonis y col., 2019; Huang y col., 2019).

A su vez, estudios filogenéticos realizados en los últimos años han revelado que, tanto *S. miescheriana* como *S. suihominis*, son especies “hermanas” o estrechamente emparentadas (Gazzonis y col., 2019; Huang y col., 2019; Prakas y col., 2020). En los últimos años han aumentado el número de secuencias disponibles para estas especies en *Genbank*: existen 53 y 22 secuencias del *18s rRNA*, para *S. miescheriana* y *S. suihominis*, respectivamente y 86 y 3 secuencias de *cox I*, para *S. miescheriana* y *S. suihominis*, respectivamente.

Por otro lado, la PCR-RFLP ha permitido una clara comprensión del polimorfismo genético de este género. En este sentido, esta herramienta ha permitido dilucidar, sugerir e identificar *Sarcocystis* spp. en distintos hospedadores (Yang y col., 2002; Elsheikha, 2005;

Xiang y col., 2009). Por tal motivo, representa una prueba útil para evidenciar patrones no convencionales de variación de secuencias (Calero-Bernal y col., 2016; Imre y col., 2019; Rosenthal, 2021).

Sin embargo, muchas de estas técnicas tienen dificultades para la identificación de coinfecciones en muestras de músculos y la mayoría de los *primers* utilizados son sólo género-específicos, resultando en secuenciaciones o patrones de RFLP superpuestos (Rosenthal, 2021). Para solventar este problema, se ha propuesto la amplificación y secuenciación de quistes musculares individualizados (Moré y col., 2013). La utilización de *primers* especie específicos también ha sido propuesta, sin embargo, dada la pluralidad de especies potenciales, en particular en HDs, su utilización no está ampliamente difundida.

En los últimos años, se realizaron distintos estudios y desarrollos de técnica de qPCR (o *real time* PCR), que al utilizar diferentes curvas de *melting* o sondas específicas permiten la identificación de las especies de *Sarcocystis* incluso en coinfecciones (Moré y col., 2013; Rubiola y col., 2020). Más aún, se ha convertido en una técnica efectiva para determinar prevalencias, siendo esto relevante para el reporte de especies zoonóticas (Rubiola y col., 2020). Aun así, este método requiere mejoras en su puesta a punto y una correcta validación para optimizar el diagnóstico (Kaur y col., 2016).

A los fines epidemiológicos y de investigación, se planteó la necesidad de distinguir los esporocistos y/u ooquistes de *Sarcocystis* spp. presentes en los distintos HDs sin mediar infecciones experimentales (Xiang y col., 2009). Por lo tanto, se validaron una serie de técnicas moleculares que permitieron el diagnóstico a partir de muestras de materia fecal

y/o raspado de mucosa intestinal de los HD (Xiang y col., 2009; Imre y col., 2017; Prakas y col., 2023), sin embargo, la baja cantidad esporocistos y/u ooquistes excretados en las infecciones naturales y la abundancia de potenciales inhibidores en las heces hacen que este enfoque sea técnicamente desafiante (Xiang y col., 2009).

Estas técnicas, por lo tanto, aportan ventajas en la identificación de *Sarcocystis* spp. frente a los estudios de microscopía tradicionales, aunque todavía se requiere más trabajo para evaluar y aumentar la especificidad y sensibilidad de dichos métodos.

1.6.2 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS INDIRECTOS

La sarcocistosis en los HIs se puede diagnosticar mediante varios métodos serológicos, siendo la prueba de IFI y ELISA los más utilizados (Tadros & Laarman, 1982; Uggla & Buxton, 1990; Dubey & Schares, 2006; Moré y col., 2010). Por otro lado, también se ha puesto a punto la técnica de western blot para evaluar, de manera indirecta, la presencia de *S. neurona* en caballos con signología de EPM.

En cuanto a las técnicas de IFI y ELISA con antígeno total, sólo son aplicables para el diagnóstico de anticuerpos género específicos, ya que se evidencian reacciones cruzadas entre especies heterólogas (Tadros & Laarman, 1982; Moré y col., 2008; Poulsen & Stensvold, 2014). A su vez, debido a que los antígenos se suelen obtener de quistes musculares y consisten en bradizoítos o el lisado de éstos, los métodos de preparación de antígenos varían mucho de un lote a otro, motivo por el cual se considera que falta una estandarización eficiente de estas pruebas (Dubey y col., 2016). Por otro lado, si bien se

han detectado anticuerpos contra *Sarcocystis* spp. en distintos HIs, los títulos no siempre se correlacionan con el estado clínico del animal en cuestión (Moré, 2008; 2009; 2010; Dubey y col., 2016). Se desconocen los antígenos inmunodominantes (IDAs) de cada especie de *Sarcocystis* que infectan a suinos (Moré y col., 2014; Dubey y col., 2016).

En 1993, se desarrolló un western blot para detectar anticuerpos contra antígenos específicos de *S. neurona* (10, 5, 13 y 27 kD aproximadamente) en suero y líquido cefalorraquídeo de caballos, con sospecha de tener EPM (Granstrom y col., 1993). Trabajos posteriores indicaron que proteínas inmunodominantes de 17 y 29 kD aproximadamente, son específicas de *S. neurona*, lo que sugiere un criterio diferente para decretar como positiva una muestra (Lapointe y col., 1998; Rossano y col., 2000). Esta técnica debe realizarse en conjunto con una minuciosa evaluación clínica y determinaciones de laboratorio, para el correcto diagnóstico diferencial de otras enfermedades neurológicas en caballos (Daft y col., 2002).

1.7 TRATAMIENTO Y PROFILAXIS

Hasta ahora, no se conoce un tratamiento específico y eficiente que esté dirigido tanto a la infección muscular en HI como entérica en HD (Rosenthal, 2021). En lo que respecta a humanos, no hay reportes de estudios sobre tratamiento y profilaxis. Por otro lado, se han probado distintos fármacos que se utilizan principalmente como anticoccidianos en aves de corral y han presentado resultados prometedores en bovinos, ovinos y caprinos infectados experimentalmente (Fayer & Johnson, 1975; Leek & Fayer, 1980; 1983; Fayer & Dubey, 1984; Fayer, 2004). Entre ellos, podemos mencionar:

- Amprolio: administrado de 0 a 30 dpi, previno la enfermedad aguda e incluso la muerte en bovinos infectados con *S. cruzi* (dosis sugerida: 100 mg/kg de peso corporal);
- Salinomicina: administrada de 1 a 30 dpi, previno muertes en ovejas infectadas con *S. tenella* (dosis sugerida: 1 o 2 mg/kg de peso corporal);
- Halofuginona: previno la sarcocistosis aguda en cabras infectadas con *S. capracanis* y en ovejas infectadas con *S. tenella* (dosis sugerida: 0,22 mg/kg de peso corporal). A su vez, se encontró que, al triplicar la dosis, esta droga evita la muerte en dichos animales cuando cursan una sarcocistosis severa (dosis sugerida: 0,67 mg/kg de peso corporal) (Voigt & Heydorn, 1981).

Se ha probado que la mayoría de los anticoccidiales afectan al estadio de merozoítos. En este sentido se vio que, de las 4 fases de infecciones examinadas -migración de esporozoítos (2 a 10 dpi), primer merogonia (11 a 17 dpi), segunda merogonia (18 a 27 dpi) y formación de quistes (28 a 50 dpi)-, los anticoccidiales fueron más efectivos en la etapa de la primer merogonia (Dubey y col., 2016).

A su vez, los resultados obtenidos a la fecha indican que los tratamientos aplicados contra una especie particular de *Sarcocystis* no necesariamente son extrapolables a otras especies del género (p. ej: el amprolio fue efectivo contra *S. cruzi*, pero no contra *S. muris*) (Dubey y col., 2016). Asimismo, no existe una vacuna comercial que sirva para proteger al ganado contra la sarcocistosis clínica (Dubey y col., 2016). En este sentido, la prevención es el principal método de control; por lo que, para poder interrumpir el ciclo biológico, se deberían tener en cuenta las siguientes indicaciones:

- El ganado muerto debe ser enterrado y/o incinerado, para evitar que los posibles depredadores puedan tener acceso a ellos.
- La carne y/o las vísceras crudas nunca deben darse a los carnívoros domesticados.
- En humanos, para prevenir la infección entérica con cualquiera de las especies zoonóticas, se recomienda evitar la ingesta de carne de res y cerdo cruda o poco cocida:
 - La congelación entre -4 y -20°C durante 24-48 h, respectivamente, elimina el potencial infeccioso de los quistes presentes en la carne (Gestrich & Heydorn, 1974; Gorman y col., 1984; Noh y col., 1988; Saleque y col., 1990).
 - De acuerdo a las pautas generales de cocción de la carne, establecidas por el CDC: la exposición al calor ($\geq 55^{\circ}\text{C}$ durante 20 min) inactiva a los quistes (Koudela & Steinhauser, 1984; Saleque y col., 1990) (<https://www.cdc.gov/foodsafety/es/keep-food-safe-es.html>).
- Para prevenir la infección en los HI, se recomienda evitar que las deyecciones de los HD tomen contacto con el ambiente, agua y/o alimento de los primeros (Rosenthal, 2021)
- Se ha descrito que los esporocistos y ooquistes de *S. neurona* mueren cuando se calientan a 60°C durante 1 min, a 55°C durante 15 min o a 50°C durante una hora y/o cuando se congelan a -4°C y -20°C durante 48 y 24 horas, respectivamente (Dubey y col., 2002). Asimismo, los desinfectantes de uso común (p.ej.: 1% de yodo, 12% de fenol, 2% de clorhexidina) no eliminan los esporocistos de *S. neurona*, pero sí lo hace el hidróxido de sodio al 5,25% (Dubey y col., 2002).

1.8 EPIDEMIOLOGÍA Y PÉRDIDAS ECONÓMICAS

Las limitaciones de las distintas técnicas empleadas dificultan el diagnóstico de la enfermedad clínica, afectando el análisis epidemiológico de las infecciones agudas por *Sarcocystis*. En consecuencia, la infección en HI es generalmente diagnosticada en su fase crónica (presencia de quistes) (Dubey y col., 2016). A nivel general la infección con *Sarcocystis* spp. en diferentes HI es una de las parasitosis más frecuentes pudiendo llegar hasta el 100% de los animales analizados.

Los estudios reportados a la fecha son difíciles de comparar entre sí, ya que presentan grandes diferencias respecto a los métodos diagnósticos empleados, el tipo y número de muestras, el tejido muscular analizado y la edad del animal (Poulsen and Stensvold, 2014). A su vez, muy pocos trabajos realizaron la identificación o diferenciación a nivel de especie.

La sarcocystosis puede generar pérdidas económicas por diferentes circunstancias. Por un lado, la Comunidad Económica Europea emitió la resolución (EC) N° 852/2004 (CEE, 2004), donde sugiere la inspección de carnes en busca de especies zoonóticas de *Sarcocystis*, lo que ha generado decomisos y depreciaciones, sobre todo de carnes bovinas exportadas desde Argentina y Brasil (Moré y col., 2013). Por otra parte, la presencia de quistes macroscópicos en carne de camélidos sudamericanos (*S. aucheniae*), de bovinos (*S. hirsuta*) y de ovinos (*S. gigantea*) se traduce en importantes pérdidas económicas para el sector ganadero y para las industrias dedicadas a la elaboración de productos derivados

de la carne (Moré y col., 2013; Dubey y col., 2016). Es decir, no sólo genera la disminución de la producción, sino una pérdida de su valor comercial, debido al decomiso de la carcasa por el rechazo de la carne en los mercados (Moré y col., 2013; 2016; Dubey & Rosenthal, 2022).

Asimismo, si bien se sabe que se generan pérdidas económicas causadas por una menor ganancia diaria de peso, menor producción de leche y lana, problemas reproductivos, enfermedades clínicas, entre otros, no hay valores en dólares actualizados y disponibles (Dubey y col., 2016).

1.8.1 SARCOCYSTIS SPP. EN SUINOS

La sarcocistosis porcina está ampliamente distribuida a nivel mundial, con prevalencias muy diversas. Distintas instituciones de seguridad alimentaria (entre ellas, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y el SENASA, en Argentina) fomentan el seguimiento y la caracterización de especies zoonóticas de *Sarcocystis* en animales y alimentos (Taylor y col., 2010; Rosenthal, 2020; 2021). A la fecha, se dispone de los siguientes reportes en cerdos domésticos (**Tabla 1**):

Tabla 1. Diagnóstico de *Sarcocystis* spp. en cerdos domésticos a nivel mundial

PAÍS	AÑO	MÉTODO DIAGNÓSTICO	ESPECIE DIAGNÓSTICADA	TASA DE INFECCIÓN	REFERENCIA
Argentina	1980	Examen en fresco de músculos y MO	<i>Sarcocystis</i> spp.	57,6% (n _{total} =26)	Bertero y col. (1980)
Brasil	2022	IFI	<i>Sarcocystis</i> spp.	37% (n _{total} =53)	Espindola y col. (2022)
		PCR del fragmento del <i>18S ARNr</i>		67.9% (n _{total} =53)	
China	2012	MET	<i>S. miescheriana</i>	Única especie hallada en las 3 muestras analizadas	Yan y col. (2012)
		PCR del fragmento del <i>18S ARNr</i>			
		Examen en fresco de músculos y MO			
	2019	Examen en fresco de músculos y MO	<i>Sarcocystis</i> spp.	37% (n _{total} =76)	Huang y col. (2019)
PCR de los fragmentos del <i>18S ARNr</i> , <i>28S ARNr</i> , <i>ITS1</i> y <i>cox I</i>		<i>S. miescheriana</i>	33% (n _{total} =76)		
PCR de los fragmentos del <i>18S ARNr</i> , <i>28S ARNr</i> , <i>ITS1</i> y <i>cox I</i>		<i>S. sui hominis</i>	17% (n _{total} =76)		
Egipto	2015	Examen en fresco de músculos y MO	<i>Sarcocystis</i> spp.	68% (n _{total} =100)	Abdel-Hafezz y col. (2015)
España	1988	Digestión Enzimática	<i>Sarcocystis</i> spp.	43% (n _{total} =100)	Pereira & Bermejo (1988)
Filipinas	2001	MET	<i>S. miescheriana</i>	27% (n _{total} =33)	Claveria y col. (2001)
India	2004	Digestión Enzimática	<i>Sarcocystis</i> spp.	60% (n _{total} =229)	Avapal y col. (2004)
		Examen en fresco de músculos y MO		73% (n _{total} =229)	
	2015	Examen en fresco de músculos y MO	<i>Sarcocystis</i> spp.	58% (n _{total} =250)	Kaur y col. (2016)
		Digestión Enzimática	<i>Sarcocystis</i> spp.	67% (n _{total} =250)	
		PCR del fragmento del <i>18S ARNr</i> - Secuenciación	<i>S. miescheriana</i> <i>S. sui hominis</i>	73% (n _{total} =250)	
		qPCR	No pudieron diferenciar <i>S. miescheriana</i> y <i>S. sui hominis</i>	76% (n _{total} =250)	
	2020	Examen en fresco de músculos y MO	<i>Sarcocystis</i> spp.	51% (n _{total} =57)	Chauhan y col. (2020)
		Digestión Enzimática		82% (n _{total} =57)	
PCR del fragmento del <i>18S ARNr</i> - Clonado y Secuenciación		<i>S. sui hominis</i>	Especie zoonótica hallada en las 5 muestras analizadas		
Japón	1998	Examen en fresco de músculos y MO	<i>S. sui hominis</i>	Especie zoonótica hallada en 5 de las 600 muestras analizadas	Saito y col. (1998)
		MET			
Lituania	2019	Examen en fresco de músculos y MO	<i>Sarcocystis</i> spp.	40% (n _{total} =73)	Januskevicius y col. (2019)

PAÍS	AÑO	MÉTODO DIAGNÓSTICO	ESPECIE DIAGNÓSTICADA	TASA DE INFECCIÓN	REFERENCIA
Malasia	2017	Digestión Enzimática	<i>Sarcocystis</i> spp.	58% (n _{total} =50)	Zainalabidin y col. (2017)
Rumania	2017	Examen en fresco de músculos y MO	<i>Sarcocystis</i> spp.	23% (n _{total} =64)	Imre y col. (2017)
		PCR – RFLP y Secuenciación del fragmento del <i>18S ARNr</i>	<i>S. miescheriana</i>	Única especie hallada en las 15 muestras positivas al MO	
Suiza	2015	Histopatología – PCR del <i>SSU ARNr</i> – Secuenciación	<i>S. miescheriana</i>	1er reporte de sarcocistosis aguda y fatal (infección natural)	Caspari y col. (2015)
USA	1993	Digestión Enzimática	<i>S. miescheriana</i>	18% (n _{total} =893)	Dubey y col. (1993)
	2015	Histopatología	<i>Sarcocystis</i> spp.	25% (n _{total} =1006)	Calero-Bernal y col. (2015)
		Digestión Enzimática		49% (n _{total} =147)	
PCR del fragmento del <i>18S ARNr</i>	<i>S. miescheriana</i>	100% (n _{total} =44)			
Uruguay	1991	Digestión Enzimática	<i>Sarcocystis</i> spp.	57% (n _{total} =269)	Freyre (1991)

En lo que respecta a jabalíes, existen pocos estudios a nivel mundial sobre la detección de *Sarcocystis* spp. Sin embargo, la mayoría de los casos reveló una prevalencia mayor que la reportada en los cerdos domésticos (Dubey y col., 2016). Los reportes disponibles a la fecha informan tasas de infección que van desde el 32 al 97% y en la mayoría de ellos no se realizó la identificación específica (**Tabla 2**).

Tabla 2. Diagnóstico de *Sarcocystis* spp. en jabalíes a nivel mundial

PAÍS	AÑO	MÉTODO DIAGNÓSTICO	ESPECIE DIAGNOSTICADA	TASA DE INFECCIÓN	REFERENCIA
España	2015	PCR del fragmento del <i>18S ARNr</i>	<i>Sarcocystis</i> spp.	32% (n _{total} =8)	Calero-Bernal y col. (2015)
		Examen en fresco de músculos y MO		73% (n _{total} =910)	
Italia	2019	Histología	<i>Sarcocystis</i> spp.	32% (n _{total} =100)	Gazzonis y col. (2019)
		PCR del fragmento del <i>18S ARNr</i> – Secuenciación	<i>S. miescheriana</i> <i>S. suihominis</i>	97% (n _{total} =100)	
Letonia	2020	Examen en fresco de músculos y MO	<i>S. miescheriana</i>	87% (n _{total} =140)	Prakas y col. (2020)
		PCR del fragmento del <i>18S rRNA</i> , <i>ITS1</i> y <i>cox I</i> .		Única especie hallada en 23 quistes aislados por MO	
Portugal	2015	PCR del fragmento del <i>18S ARNr</i> – Secuenciación	<i>S. miescheriana</i> <i>S. suihominis</i>	74% (n _{total} =103)	Coelho y col. (2015)
Rumania	2017	Examen en fresco de músculos y MO Digestión Enzimática Histopatología	<i>Sarcocystis</i> spp.	60% (n _{total} =101)	Imre y col. (2017)
		PCR – RFLP y Secuenciación del fragmento del <i>18S ARNr</i>	<i>S. miescheriana</i>	Única especie hallada en las 61 muestras positivas al MO	

1.8.2 SARCOCYSTIS SPP. EN HUMANOS

Tal como se mencionó previamente, en humanos, los factores de riesgo asociados a la infección intestinal por *Sarcocystis* spp. incluyen la ingesta de carne de res y suinos cruda o poco cocida, lo que conlleva a la eliminación de heces con ooquistes, que pueden infectar al HI susceptible y mantener el ciclo de vida de este protozoario. Las infecciones entéricas naturales por *S. hominis* y *S. suihominis* se describen generalmente como asintomáticas (Poulsen & Stensvold, 2014) aunque se estima que sólo el 10% de las personas infectadas presentan sintomatología (Yu, 1991). En lo que respecta a infecciones experimentales, éstas se han asociado con gastroenteritis y eosinofilia (Chen y col., 1999; Pena y col., 2001; Fayer, 2004).

Se ha estimado que la prevalencia de la infección intestinal por *Sarcocystis* spp. en humanos va entre el 1,1 % y el 10,4 % en Europa, entre el 0,4 % y el 23,2 % en Asia y es del 0,5% en Australia (Fayer, 2004; Rosenthal, 2021). De todas maneras, como se mencionó anteriormente, se debe tener precaución al comparar las cifras reportadas, debido a las diferencias en los enfoques diagnósticos y al sesgo de población.

A su vez, son escasos los reportes realizados sobre la prevalencia de la infección por *S. suihominis*, en comparación con lo que se sabe de la infección por *S. hominis* (Rosenthal, 2021). En este sentido, los datos epidemiológicos disponibles sobre la especie zoonótica transmitida por suinos, se basan en informes de casos esporádicos y brotes ocasionales, principalmente descritos en el Sudeste Asiático (India, Tíbet, Camboya y Tailandia) (Yu, 1991; Banerjee y col., 1994; Wilairatana y col., 1996; Khieu y col., 2017).

En este trabajo de tesis se propone identificar y caracterizar las especies de *Sarcocystis* presentes en músculos de suinos de Argentina. Para lograr esto se propone la utilización de un enfoque morfológico mediante estudios microscópicos, sumado a la caracterización de especies mediante estudios moleculares.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer las tasas de infección con las diferentes especies de *Sarcocystis* en músculos de cerdos domésticos y jabalíes de Argentina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A- Identificar y diferenciar morfológica y molecularmente *Sarcocystis* spp. presentes en músculos de suinos de Argentina.

B- Identificar y comparar las tasas de infección con *Sarcocystis* spp. en músculos de jabalíes y cerdos domésticos de cría intensiva y semi extensiva.

C- Determinar la tasa de infección con la especie zoonótica *Sarcocystis suis hominis* en suinos de Argentina mediante técnicas de diagnóstico molecular.

2.2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO SECUNDARIO

D- Identificar los antígenos inmunodominantes de las diferentes especies de *Sarcocystis* que se detecten en suinos de Argentina.

3. HIPÓTESIS

A- Existen al menos 2 especies de *Sarcocystis* que afectan a suinos de Argentina con diferencias morfológicas y moleculares entre ellas.

B1- La tasa de infección con *Sarcocystis* spp. en músculos de suinos de Argentina es menor al 50%.

B2- La tasa de infección con *Sarcocystis* spp. es significativamente mayor en jabalíes y cerdos domésticos de cría semiextensiva respecto de los cerdos de cría intensiva

C- La tasa de infección con la especie *Sarcocystis suis hominis* en músculos de suinos de Argentina es menor al 5%.

D- *Sarcocystis suis hominis* presenta antígenos inmunodominantes diferentes de las demás especies de *Sarcocystis* que afectan suinos, que generan respuestas serológicas diferenciales.

4. MATERIALES & MÉTODOS

4.1 MUESTRAS DE CERDOS

Se recolectaron 561 muestras de músculos de cerdos, provenientes de laboratorios privados, del Laboratorio Central del Ministerio de Agroindustria, así como también de carnicerías y pequeños productores de la provincia de Buenos Aires. Todas ellas fueron enviadas refrigeradas o congeladas al LAINPA (FCV-UNLP). Tanto el muestreo como su transporte, se realizaron bajo las normas nacionales y provinciales, con sus respectivos permisos estipulados por la Resolución 145/2003 (<https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-145-2003-83651/texto>).

Los cortes musculares analizados fueron: diafragma ($n=525$) otros músculos ($n=36$) que correspondieron a: bondiola ($n=5$), nalga ($n=5$), entraña ($n=4$), cuadril ($n=3$), bife ($n=2$), carré ($n=2$), cuarto trasero ($n=2$), miembro posterior ($n=2$), paleta ($n=2$), intercostales ($n=2$), bola de lomo ($n=1$), churrasco ($n=1$), masetero ($n=1$), matambre ($n=1$), cuadrada ($n=1$), pool de lengua y corazón ($n=1$) y solomillo ($n=1$). Las muestras procedieron de localidades de las provincias de: Buenos Aires ($n=522$), Río Negro ($n=26$), Santa Cruz ($n=10$) y Entre Ríos ($n=3$). Asimismo, fueron categorizadas según su sistema de cría en: *cría intensiva* (CI, $n=295$), que involucra animales mantenidos en confinamiento durante la mayor parte de su ciclo productivo y *cría semiextensiva* (CSE, $n=266$), que incluye animales provenientes de producción familiar y/o de traspatio.

4.2. MUESTRAS DE JABALÍES

Muestras de músculos de 240 jabalíes cazados en libertad fueron cedidas como parte de la colaboración interdisciplinaria con la Universidad Nacional de Río Negro, así como también fueron provistas por laboratorios privados y por el Laboratorio Central del Ministerio de Agroindustria. Todas ellas fueron enviadas freezadas al laboratorio (LAINPA, FCV-UNLP). Tanto el muestreo como su transporte se realizaron, con sus respectivos permisos, bajo las normativas nacionales y provinciales correspondientes a la Resolución 145/2003 (<https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-145-2003-83651/texto>).

Se establecieron tres regiones de estudio, de acuerdo a condiciones geoambientales similares (características del paisaje, vegetación, suelo, clima y fauna), siendo éstas: *Pampeana-Litoral (PL, n=56)*, que incluyó distritos de Buenos Aires, La Pampa, Entre Ríos y Corrientes; *Noroeste Patagónico (NOP, n=94)*, que abarcó localidades de las provincias de Neuquén y oeste de Río Negro; y *Noreste Patagónico (NEP, n=90)* que comprendió áreas del este de Río Negro y del sur de la provincia de Buenos Aires (**Fig. 3**).

De las 240 muestras de músculos de animales recolectadas, 113 se procesaron como *pool de músculos* (diafragma, lengua, masetero, intercostales, corazón y extremidades anteriores) y, los 127 restantes, se procesaron como homogenatos de músculos individuales, siendo 76 de *diafragma* y 51 de *otros músculos* (lengua, masetero, músculos intercostales, corazón y extremidades anteriores).

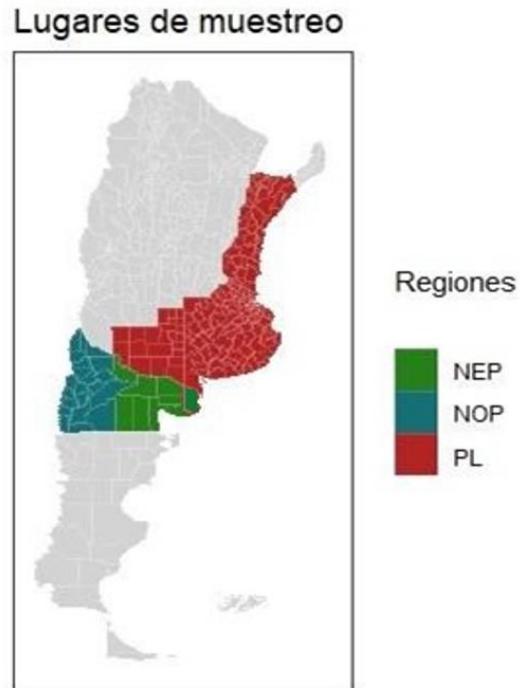


Figura 3. Áreas de muestreo y tasa de infección con *Sarcocystis* spp. en jabalíes en Argentina: Pampeana-Litoral (PL, n=56): incluyó localidades de las provincias de Buenos Aires, La Pampa, Entre Ríos y Corrientes; Noroeste patagónico (NOP, n= 94): incluye localidades de las provincias de Neuquén y oeste de Río Negro y Noreste Patagónico (NEP, n=90): incluye áreas del este de Río Negro y sur de la provincia de Buenos Aires.

4.3 EXÁMEN MICROSCÓPICO EN FRESCO

Todas las muestras fueron procesadas siguiendo la metodología previamente descrita por (Moré y col., 2011) con algunas modificaciones. Brevemente, se trituraron de 5 a 10 g de músculo en un mixer (Phillips, 600W) con 50 ml de PBS (pH 7,2), se filtraron y se centrifugaron. Se colocaron alícuotas de 3 ml aproximadamente de cada homogenato, en una placa de Petri, se diluyeron con PBS y se observaron en un microscopio invertido con un aumento de 40X (Nikon, TMZ) (**Fig. 4**). Se colectó una alícuota de cada homogenato en tubos *DNAsa free* de 1,5 ml y se conservaron a -20°C para posteriores estudios moleculares (PCR y secuenciación) (Ver Anexo para mayores detalles de soluciones y técnicas).

Aquellas muestras que presentaron al menos un quiste de *Sarcocystis* spp. (porción o completo) se consideraron como positivas. De ellas, se recolectaron quistes individualizados, que se guardaron en tubos *DNAsa free* de 1,5 ml y se conservaron a -20°C para posteriores estudios moleculares. A su vez, éstos fueron fotografiados con aumentos de 200X y 400X (microscopio Leica DM 2000).



Figura 4. Mesada de trabajo con el material dispuesto para el procesamiento de las muestras.

4.4 MET

A partir de la observación en fresco de muestras positivas a *Sarcocystis* spp. (cerdos: $n=10$ y jabalíes: $n=11$), se recolectaron al menos 10 quistes de cada una y se fijaron en glutaraldehído al 2% en PBS, durante 2 horas. Luego, se remitieron al Servicio Central de Microscopía Electrónica “*Shin-Ichi Itagaki*” (FCV-UNLP) para su posterior procesamiento. Se realizaron cortes semifinos y se tiñeron con azul de toluidina para la observación e identificación de los quistes en los tacos de resina. Posteriormente, se realizaron cortes ultrafinos, se montaron sobre una grilla y se observaron utilizando el microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL, Japón). Se fotografió la ultraestructura de la pared de los quistes, con el fin de identificar características y/o patrones propios de las diferentes especies de *Sarcocystis* (Dubey y col., 2016).

4.5 HISTOPATOLOGÍA EN MUESTRAS DE CERDOS

Seis muestras de músculos (diafragma) de cerdos de CSE, que presentaron quistes de *Sarcocystis* spp. en el examen microscópico en fresco, fueron seleccionadas para estudios histológicos, llevados a cabo por el servicio de Anatomía Patológica del Laboratorio de Patología Especial Veterinaria “Dr. Bernardo Epstein” (FCV-UNLP) (gentileza de la Dra. María Alejandra Quiroga). Las muestras fueron fijadas y conservadas en formol bufferado al 10%. El análisis histopatológico se realizó mediante procedimiento de rutina con la tinción con hematoxilina y eosina (H/E). Se realizaron cortes en sentido longitudinal y transversal de 4 µm de espesor, a fin de evaluar la aparición y severidad de lesiones histopatológicas causadas por *Sarcocystis* spp. (Prophet y col., 1995). No se procesaron muestras de músculos de jabalíes por este método, debido a que las mismas se recibieron congeladas, no resultando adecuadas para este estudio.

4.6 EXTRACCIÓN DE ADN, PCR y SECUENCIACIÓN

En cerdos, se realizó la extracción de ADN de 202 homogenatos seleccionados al azar (CSE-*n*=98; CI-*n*=104), utilizando un kit comercial (*Wizard® Genomic DNA Purification Kit*, Promega, EE. UU), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se amplificó por PCR un fragmento del gen *18S rRNA* de ~ 900 pb, correspondiente a *Sarcocystis* spp., utilizando los *primers SarcoFext* y *SarcoRext*, como se describió previamente (Moré y col., 2013). Además, tanto el ADN de los homogenatos que dieron positivos a la PCR del fragmento del *18S rRNA*, como los que dieron positivo a la microscopía óptica, se analizaron mediante una PCR específica para *S. suis*, dirigida a una región del gen *cox 1* de

~1020 pb, utilizando los *primers SF8* y *SR11*, como se describió previamente por Gazzonis y col. (2019). Por otro lado, se realizó la extracción de ADN de 14 quistes individuales, provenientes de 14 muestras, como se describió anteriormente. A todos ellos se les realizó la PCR del gen *18S rRNA*, y a 8 muestras de ADN seleccionadas aleatoriamente, se les realizó la PCR del marcador *ITS1* (*primers: SUF1* y *5.8SR2*) (Gjerde, 2014) (Ver Anexo para mayores detalles metodológicos).

En lo que respecta a las muestras de jabalíes, se les realizó extracción de ADN a todos los homogenatos ($n=240$) y a 17 quistes individuales, provenientes de 16 muestras, como se describe previamente. Se realizó la PCR del fragmento del gen *18S rRNA* como se describió previamente (Moré y col., 2013). Además, el ADN de los homogenatos y los quistes individuales que fueron positivos a dicha PCR, se procesaron mediante la PCR específica de *S. suis* que se mencionó precedentemente.

En todos los casos, cada rutina de extracción de ADN se realizó con una muestra de control del proceso (CE: control de extracción, utilizando únicamente las soluciones del kit) y todas las PCRs realizadas incluyeron un CE, un control sin ADN (o *NTC* por *non template control*) y un *control positivo* (CP: ADN de *S. miescheriana* para *18S rRNA*, ADN de *S. suis*, para *cox I* o ADN de *S. falcatula* para *ITS1*, según correspondiera).

Para realizar todas las PCRs, se utilizó un termociclador T18 (IVEMA, Argentina) y los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador de luz azul, previa electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñidos con SYBR™ Safe DNA Gel Stain (INVITROGEN™, EE.UU.).

Los amplificadores de los quistes individuales de cerdos y jabalíes con una concentración estimada en la electroforesis en gel de 40 ng/μl, se purificaron utilizando un kit comercial de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Wizard SV, Promega) (Ver Anexo para mayores detalles metodológicos). Seguidamente, se enviaron para su secuenciación con el método Sanger a Macrogen Inc., Corea del Sur (<http://www.macrogen.com>), junto con los *primers* utilizados en cada amplificación. Las secuencias obtenidas fueron alineadas y analizadas utilizando el *software Geneious* versión R9 (<https://www.geneious.com>). Las secuencias consenso obtenidas se compararon con otras reportadas en *GenBank* mediante la herramienta *online* BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las tasas de infección de *Sarcocystis* spp. en cerdos y jabalíes, se informaron como frecuencias y porcentajes considerando la detección por microscopía, PCR u ambos. Se ajustaron y validaron modelos de regresión logística (MLG, con distribución de Bernoulli) (Faraway, 2006; Ligges & Crawley, 2007). A su vez, en cerdos se evaluó la probabilidad de infección con *Sarcocystis* spp. según el tipo de cría y, en jabalíes, se estudió la probabilidad de infección según las regiones muestreadas y los músculos analizados. Se efectuaron comparaciones en la tasa de infección entre: cerdos domésticos vs. jabalíes, cerdos de *CSE* vs. cerdos de *CI*, cerdos *CSE* vs. jabalíes. Se descartó la interacción entre variables y se probaron tanto los efectos de los errores como la bondad de ajuste a los modelos propuestos (Prueba de Hosmer-Lemeshow, $p\text{-valor} > 0,05$). Se corroboró el cumplimiento de los supuestos de independencia y de aleatorización de las muestras. El grado de

significancia establecido fue de $p < 0,05$. Se calculó el índice *kappa* (κ) para evaluar la concordancia y reproducibilidad entre las dos técnicas diagnósticas aplicadas (PCR y MO). El análisis estadístico se realizó con el *software* R (R Core Team, 2020).

5. RESULTADOS

5.1 EXAMEN MICROSCÓPICO

El 31,8% (255/801) de todas las muestras analizadas (cerdos- $n=561$; jabalíes- $n=240$) resultaron positivas al análisis por MO. Todos los quistes observados fueron microscópicos. En la mayoría de las muestras se encontraron porciones de entre 150-300 μm , mientras que aquellos que estaban completos midieron hasta 600 μm (**Fig. 5A-6A**). Los bradizoítos presentaban forma de banana y medían entre 12-15 μm de largo (**Fig. 5B-6B**).

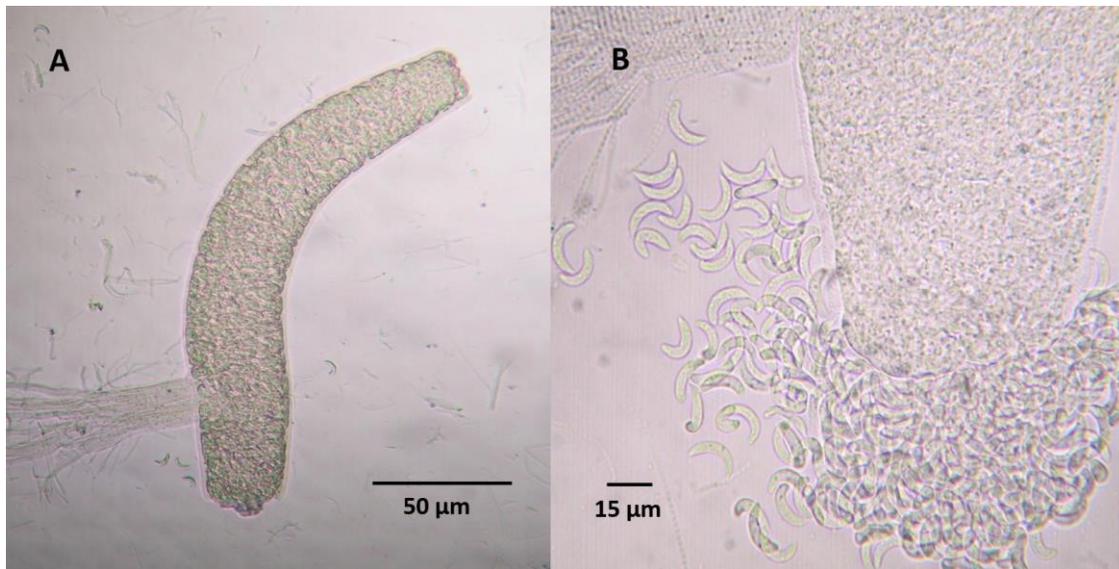


Figura 5. A) Porción de un quiste de *Sarcocystis* sp. presente en músculo de cerdo (200 X).

B) Bradizoítos liberados por compresión del quiste de *Sarcocystis* sp. de la figura 5A (400 X).

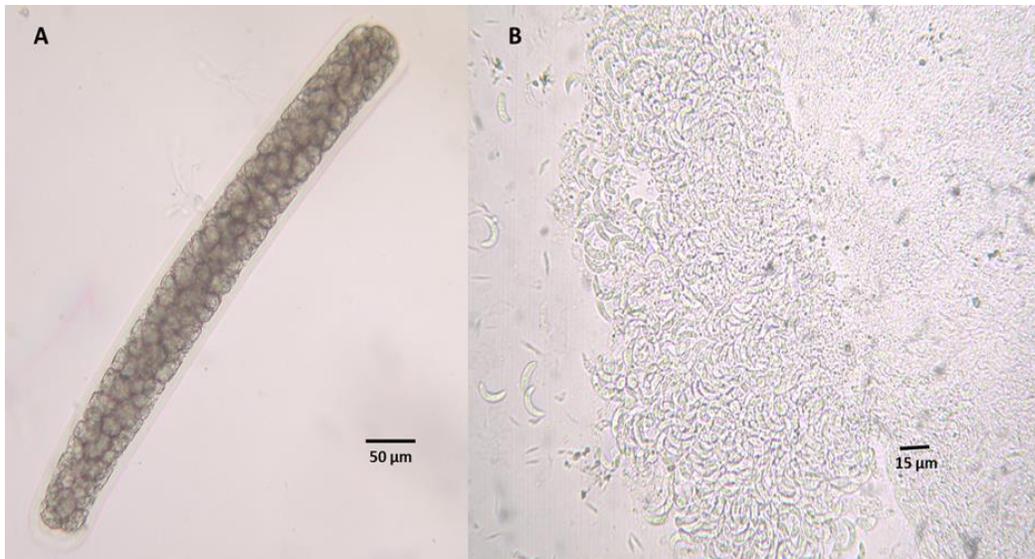


Figura 6. A) Porción de un quiste de *Sarcocystis* sp. presente en músculo de jabalí (200 X).
 B) Bradizoítos liberados por compresión del quiste de *Sarcocystis* sp. de la figura 6A (400 X).

5.1.1 EXAMEN MICROSCÓPICO EN MUESTRAS DE CERDOS

El 24,7% (139/561) de las muestras analizadas por MO fueron positivas (**Fig. 5A-B**). De ellas, el 15,9% (47/295) corresponde a *Cl*, mientras que el 34,6% (92/266) a *CSE*.

5.1.2 EXAMEN MICROSCÓPICO EN MUESTRAS DE JABALÍES

El 48,3% (116/240) de las muestras analizadas fueron positivas por examen microscópico directo (**Fig. 6A-B**); de las cuales el 46,8% (44/94) provenían de *NOP*, el 43,3% (39/90) de *NEP* y el 58,9% (33/56) de *PL*. A su vez, según los músculos analizados, las tasas de infección con *Sarcocystis* spp. fueron del: 43,4% (49/113) para el *pool*, 53,9% (41/76) para *diafragma* y 51% (26/51) para *otros músculos*.

5.2. MET

5.2.1 MET DE MUESTRAS DE CERDOS

Mediante MET se pudieron observar y fotografiar 2 quistes por muestra ($n=20$) (6 de cerdos *CSE* y 4 de cerdos *CI*). Todos los quistes presentaban una ultraestructura compatible con *S. miescheriana* o MET tipo 10 b, según (Dubey y col., 2016), con una pared de entre 3 a 5 μm de espesor y de apariencia radialmente estriada. Las protuberancias midieron hasta 5 μm de largo y 1 μm de ancho, próximas entre sí dando el aspecto de empalizada, y conteniendo finos microtúbulos (Fig. 7).

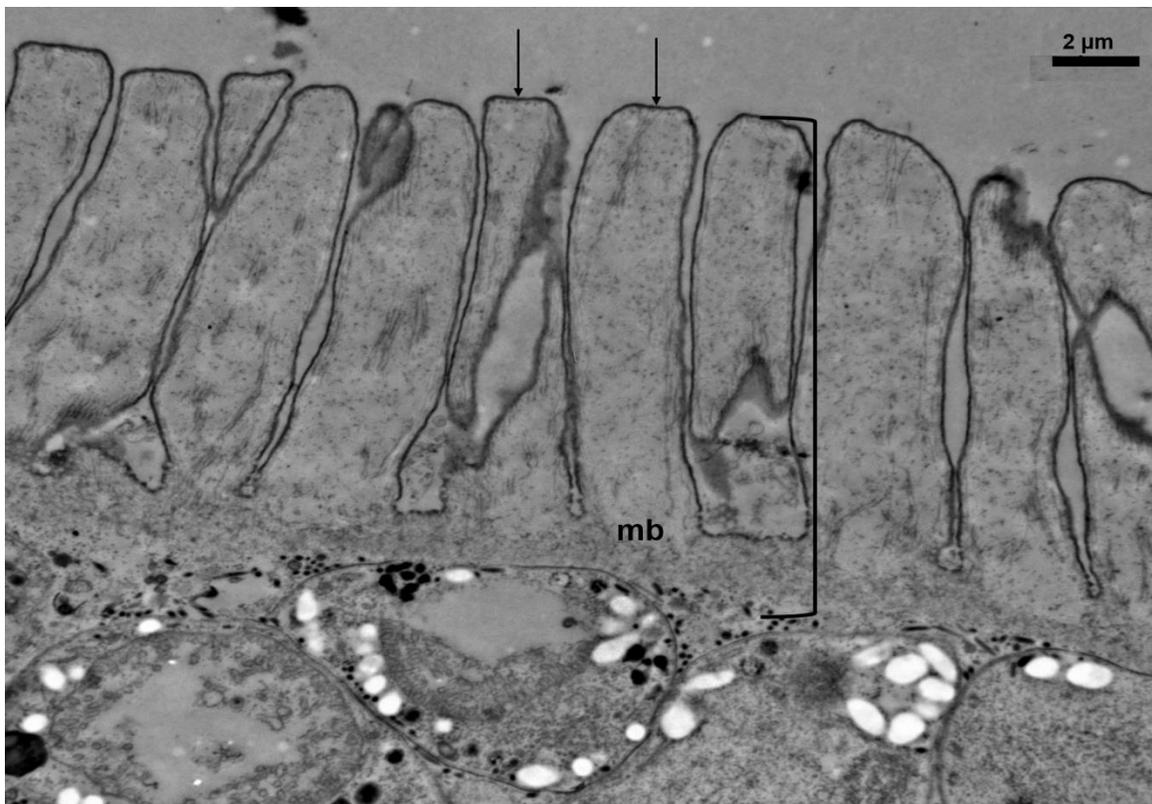


Figura 7. Corte longitudinal de la pared de un quiste de *S. miescheriana*, presente en músculo de cerdo (MET, 15000X): pared del quiste con capa basal (corchete), las protuberancias en empalizada (flechas) contienen microtúbulos (punta de flecha) y una fina capa de materia basal (mb).

5.2.2 MET DE MUESTRAS DE JABALÍES

De las 11 muestras enviadas a analizar por MET, se pudieron observar y fotografiar 2 quistes por muestra ($n=22$). Veintiuno de éstos presentaron una ultraestructura compatible con *S. miescheriana* o MET tipo 10 b (Dubey y col., 2016), mientras que 1 mostró una ultraestructura de pared compatible con *S. sui hominis* o MET tipo 31 (Dubey y col., 2016). En la **figura 8A** se observa una fotomicrografía de la pared de uno de los quistes de *S. miescheriana* observado en músculos de jabalíes. En cuanto al quiste observado de *S. sui hominis*, éste presentó una pared de 3 a 6 μm de espesor con protuberancias villares perpendiculares, que midieron hasta 13 μm de largo y 0,5 μm de ancho, dobladas sobre la superficie y con una capa gruesa de material basal (**Fig. 8B**).

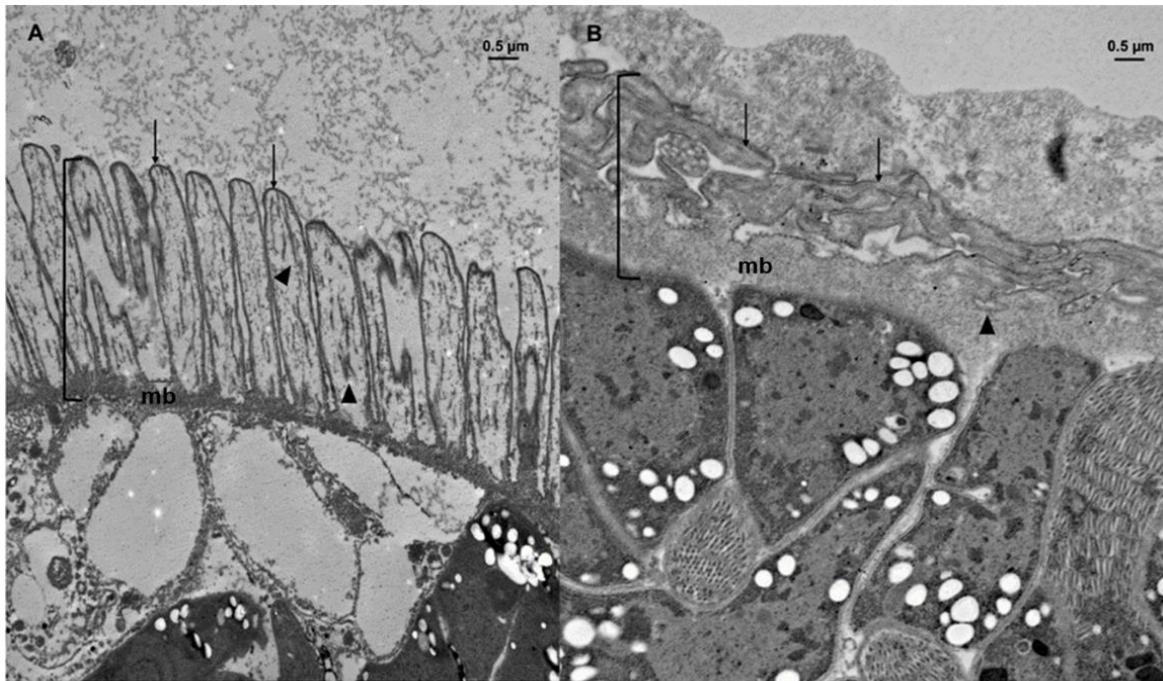


Figura 8. **A)** Corte longitudinal de la pared de un quiste de *S. miescheriana* de jabalí TEC 130 (MET, 15000 X) se muestra: la pared del quiste con capa basal (con corchetes), las protuberancias en empalizada (flechas) que contienen microtúbulos (punta de flecha) y una superficie fina de material basal (mb). **B)** Corte longitudinal de la pared de un quiste de *S. suihominis* de jabalí J15/9 (MET, 12000 X) se observa: la pared del quiste con capa basal (con corchetes), las protuberancias villares plegadas (flechas) dejando el aspecto de invaginación de la pared del quiste (punta de flecha). La pared del quiste presenta una capa gruesa de material basal (mb).

5.3 HISTOPATOLOGÍA DE MUESTRAS DE CERDOS

Se identificaron quistes de *Sarcocystis* spp. en 2 (1 quiste en cada una) de las 6 muestras de diafragma analizadas. A su vez, ninguna de ellas presentó lesiones, salvo una donde se reconoció un foco con un infiltrado intersticial de células inflamatorias mononucleares, en su mayoría linfocitos, cuya causa y origen no se pudo determinar. Asimismo, en 2

muestras se observaron acúmulos interfasciculares de bacterias, sin respuesta tisular asociada (contaminación bacteriana *post mortem*).

5.4. ESTUDIOS MOLECULARES

El 46,6% (206/442) de todas las muestras de suinos analizados (cerdos: 96/202; jabalíes: 110/240) resultaron positivas a la PCR del fragmento del *18S ARNr*.

5.4.1. PCR - SECUENCIACIÓN EN MUESTRAS DE CERDOS

El 47,5% (96/202) de los homogenatos analizados por PCR del fragmento *18S ARNr* de *Sarcocystis* spp. resultaron positivos. En cuanto al tipo de producción, resultaron positivos el 48,9% de los cerdos de CSE (48/98) y el 46,1% de los de CI (48/104). Asimismo, todas las muestras analizadas por la PCR específica de *S. sui hominis* fueron negativas ($n=235$, de las cuales 96 habían resultado positivas por PCR del fragmento *18S ARNr* y las 139 restantes que habían sido positivas por MO).

Los 14 quistes individuales recolectados de muestras provenientes de Buenos Aires fueron positivos para la PCR del fragmento de *18S rRNA* y sus respectivos amplificados fueron aptos para su posterior secuenciación. Todas las secuencias consenso obtenidas presentaron un rango de entre 613 a 880 pb y mostraron 100% de identidad entre ellas y con secuencias de *S. miescheriana* informadas previamente ([GU395554](#), [KT873760](#), [KT873747](#), [KT873788](#)).

Por otro lado, de los 8 quistes individuales analizados por la PCR del marcador *ITS1*, sólo 4 tuvieron amplificados con cantidad y calidad de ADN adecuada para su posterior secuenciación. Los fragmentos obtenidos presentaron un rango de entre 415 a 560 pb y

mostraron una identidad del 99,5% - 99,8% entre ellas y con secuencias reportadas previamente ([MH404234](#), [MH404241](#), [MH404242](#)), excepto una muestra (**TEC 36**) en la que fue del 99%, lo cual evidenció 4 polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs). Los resultados de la secuenciación, los porcentajes de identidad de BLAST, así como los números de acceso se presentan en las **Tablas 3 y 4**. Todas las secuencias de consenso fueron cargadas en el *GenBank*.

Tabla 3. Resultados de la secuenciación de fragmentos del gen *18S ARNr* de quistes de músculo de cerdos.

ID	Músculo	Tipo de cría	Pb	BLASTn	Números de acceso GenBank
TEC 9	Diafragma	CSE	880	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	OP796499
TEC 10	Diafragma	CSE	878	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	OP796500
TEC 36	Diafragma	CSE	818	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	OP796501
TEC 37	Diafragma	CSE	853	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	OP796502
TEC 38	Diafragma	CSE	855	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	OP796503
TEC 41	Diafragma	CSE	877	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	OP796504
TEC 107	Lomo	CI	813	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	OP796505
TEC 114	Diafragma	CI	725	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	OP796506
TEC 117	Diafragma	CI	820	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	OP796507
TEC 143	Diafragma	CSE	827	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	OP796508
TEC 181	Diafragma	CI	790	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	OP796509
TEC 182	Diafragma	CI	613	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	OP796510
TEC 234	Diafragma	CI	823	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	OP796511
TEC 374	Diafragma	CSE	801	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	OP796512

Referencias: CI=cría intensiva, CSE=cría semiextensiva; Pb=Pares de bases; (#) = Números de acceso de las secuencias más representativas obtenidas por alineación con BLAST: GU395554, KT873760, KT873747, KT873788.

Tabla 4. Resultados de la secuenciación de fragmentos del gen *ITS1* de quistes de músculo de cerdos.

ID	Músculo	Tipo de cría	Pb	BLASTn	Números de acceso GenBank
TEC 10	Diafragma	CI	560	99.5% <i>S. miescheriana</i> (#)	OP819849
TEC 36	Diafragma	CSE	469	99% <i>S. miescheriana</i> (#)	OP819850
TEC 114	Diafragma	CI	415	99.8% <i>S. miescheriana</i> (#)	OP819851
TEC 143	Diafragma	CSE	539	99.8% <i>S. miescheriana</i> (#)	OP819852

Referencias: CI=cría intensiva, CSE=cría semiextensiva; Pb=Pares de bases; (#) = Números de acceso de las secuencias más representativas obtenidas por alineación con BLAST MH404234, MH404241, MH404242.

5.4.2 PCR - SECUENCIACIÓN EN MUESTRAS DE JABALÍES

El 45,8% (110/240) de los homogenatos analizados resultaron positivos a la PCR del *18S ARNr*, de las cuales el 56,7% (51/90) provenían de *NOP*, el 33% (31/90) de *NEP* y el 50% (28/56) de *PL*. A su vez, según los músculos analizados, las tasas de infección con *Sarcocystis* spp. fueron del: 53,1% (60/113) para el *pool*, 43,4% (33/76) para *diafragma* y 33,3% (17/51) para *otros músculos*. A todos ellos, se les realizó también la PCR específica para *S. sui hominis*, de los cuales el 3,6% (4/110) fueron positivos débiles. Cabe aclarar que, para obtener mayor cantidad y calidad, estos últimos homogenatos fueron procesados por doble PCR, usando como molde los respectivos amplificadores. Luego, se enviaron para su secuenciación; sin embargo, los cromatogramas mostraron una calidad deficiente, por lo cual no se obtuvieron las respectivas secuencias consenso. Una de estas muestras es aquella donde se halló por MET el quiste de la especie zoonótica *S. sui hominis* (J15-9).

Un total de 17 quistes individuales resultaron positivos para la PCR del fragmento *18S ARNr*, y los amplificados obtenidos fueron de buena calidad, lo cual permitió su posterior secuenciación. Todos procedían de diferentes animales, excepto dos, que correspondían a la misma muestra (**J15-9**). Las secuencias parciales del gen *18S ARNr* obtenidas mostraron una identidad de entre el 99,75 - 100% con las secuencias de *S. miescheriana* previamente reportadas ([MH404232](#), [KT873760](#), [KX929091](#), [KT873751](#) y [MT066112](#), entre otras). Los resultados de la secuenciación y los porcentajes de identidad analizados con BLAST se presentan en la **Tabla 5**. Las 17 secuencias consenso mostraron una identidad del 100% entre ellas, excepto una (**TEC 105**) que fue del 99,75 %, presentando dos SNPs.

Tabla 5. Resultados de la secuenciación de fragmentos del gen *18S ARNr* de quistes de músculo de jabalí.

Muestra	Región	Músculo	Pb	BLASTn	Números de acceso GenBank
J 15-5	NOP	Pool	834	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	ON420292
J15-6	NOP	Pool	817	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	ON420293
J15-8	NOP	Pool	826	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	ON420294
J15-9 (quiste A)	NOP	Pool	832	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	ON420295
J15-9 (quiste B)	NOP	Pool	661	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	ON420296
TEC 72	NEP	Diafragma	825	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	ON420297
TEC 74	NEP	Diafragma	820	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	ON420298
TEC 87	NEP	Diafragma	827	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	ON420299
TEC 105	NEP	Diafragma	786	99,75% <i>S. miescheriana</i> (#)	ON420300
TEC 130	PL	Diafragma	799	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	ON420301
TEC 152	NEP	Diafragma	792	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	ON420302
TEC 160	PL	Diafragma	806	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	ON420303
TEC 193	NEP	Otros músculos	803	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	ON420304
TEC 219	PL	Diafragma	810	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	ON420305
TEC 354	PL	Otros músculos	878	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	ON420306
TEC 355	PL	Otros músculos	878	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	ON420307
TEC 361	PL	Otros músculos	881	100% <i>S. miescheriana</i> (#)	ON420308

Referencias: *PL*=Pampeana-Litoral, *NOP*=Noroeste Patagónico, *NEP*=Noreste Patagónico, *Pb*=Pares de bases; (#)= Números de acceso de las secuencias más representativas obtenidas por alineación con BLAST: MH404232, KT873760, KX929091, KT873751 y MT066112.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del análisis de las muestras por MO revelan que los jabalíes presentaron una tasa de infección con *Sarcocystis* spp. significativamente mayor que la obtenida en los cerdos (48,3% vs. 24,7%, respectivamente) ($p < 0,05$) (Fig. 8).

PROPORCIÓN DE INFECCIÓN CON *SARCOCYSTIS* SPP. EN SUINOS DE ARGENTINA

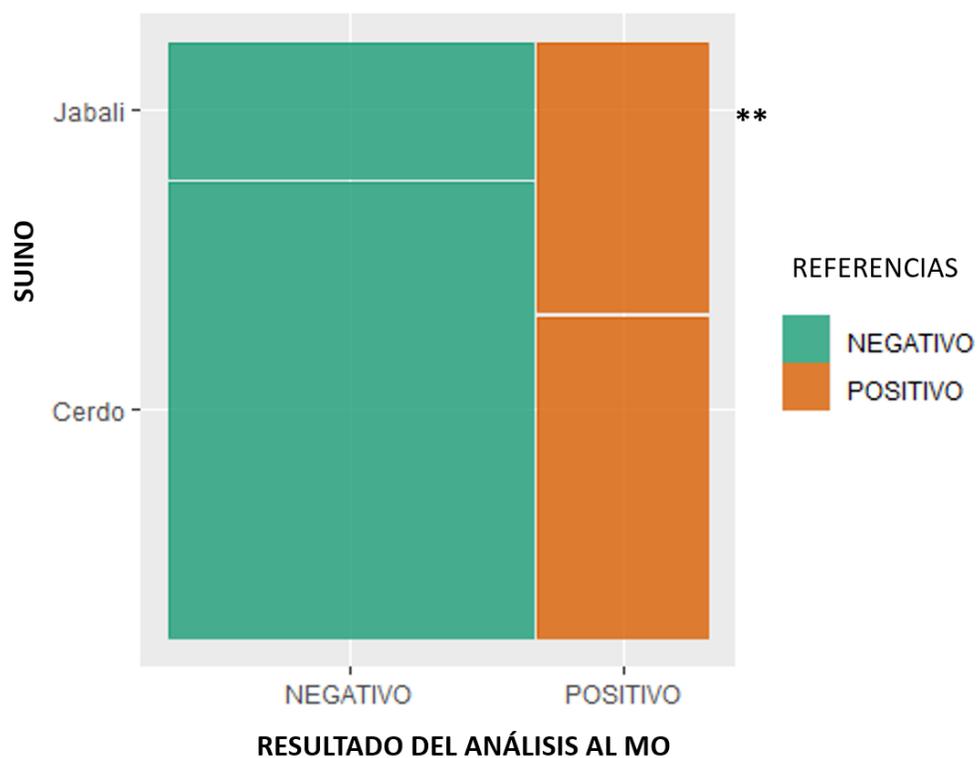


Figura 8. Proporción de muestras con quistes de *Sarcocystis* spp. por microscopía en suinos de Argentina. Asteriscos (**) indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

A partir de los resultados obtenidos por MO, los cerdos de cría CSE presentaron una tasa de infección con *Sarcocystis* spp. significativamente mayor que la obtenida en los de CI (34,6% vs. 15,9%, respectivamente) ($p < 0,05$) (Fig. 9). En lo que respecta al análisis por PCR del fragmento 18S rRNA, no se encontraron diferencias significativas entre los homogenatos de cerdos de CSE respecto de CI (49% vs. 46,1%, respectivamente) ($p > 0,05$). El índice kappa calculado de $\kappa = 0,62$ [IC95%: 0,51-0,74] reveló una concordancia moderada entre los resultados obtenidos por MO y por la PCR del fragmento de 18S ARNr.

PROPORCIÓN DE INFECCIÓN CON *SARCOCYSTIS* SPP. EN CERDOS SEGÚN EL TIPO DE CRÍA

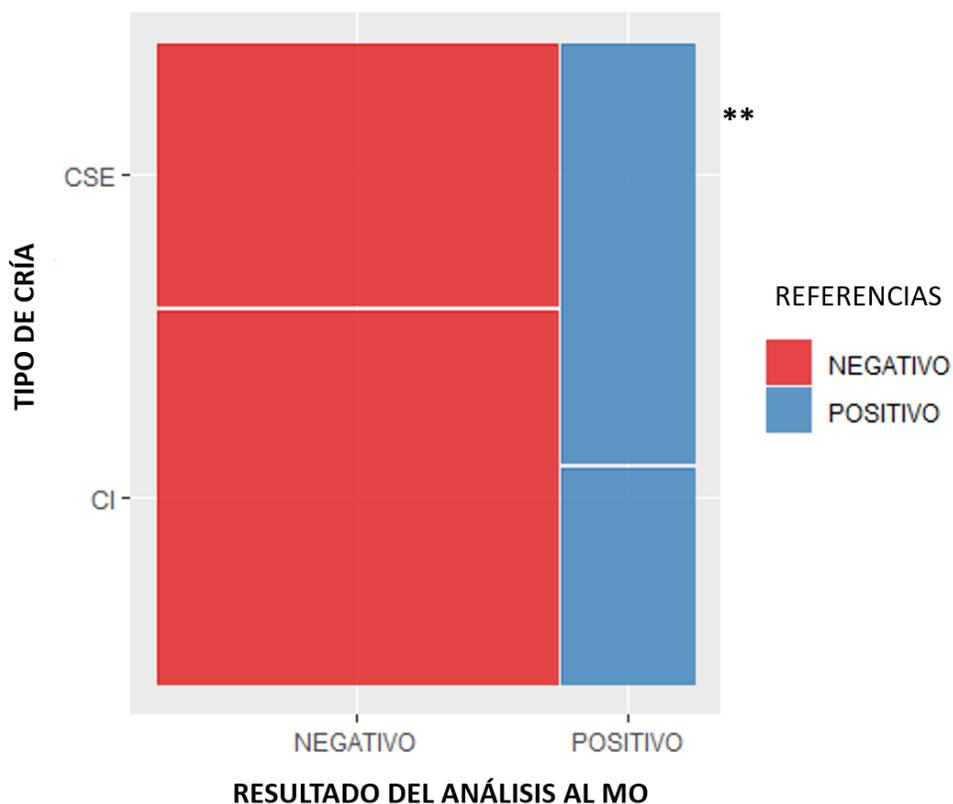


Figura 9. Proporción de muestras con quistes de *Sarcocystis* spp. en cerdos, según el tipo de cría. Asteriscos (**) indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

En cuanto a las muestras de jabalíes, el 61,3% (147/240) resultaron positivas al MO y/o a la PCR del fragmento del 18S ARNr. De ellas, el 63,8% (60/94) provenían de *NOP*, el 53,3% (48/90) de *NEP* y el 69,6% (39/56) de *PL*. A su vez, las tasas de infección obtenidas por ambos métodos diagnósticos, según los músculos estudiados fueron del: 61,9% (70/113) para el pool, 63,2% (48/76) para diafragma y 56,9% (29/51) para otros músculos.

Las tasas de infección con *Sarcocystis* spp. en jabalíes de las regiones *PL* y *NOP* resultaron significativamente mayores a la reportada en *NEP* ($p < 0,05$) (**Fig. 10**). No se observaron diferencias significativas en la tasa de infección entre los músculos analizados ($p > 0,05$) (**Fig. 11**).

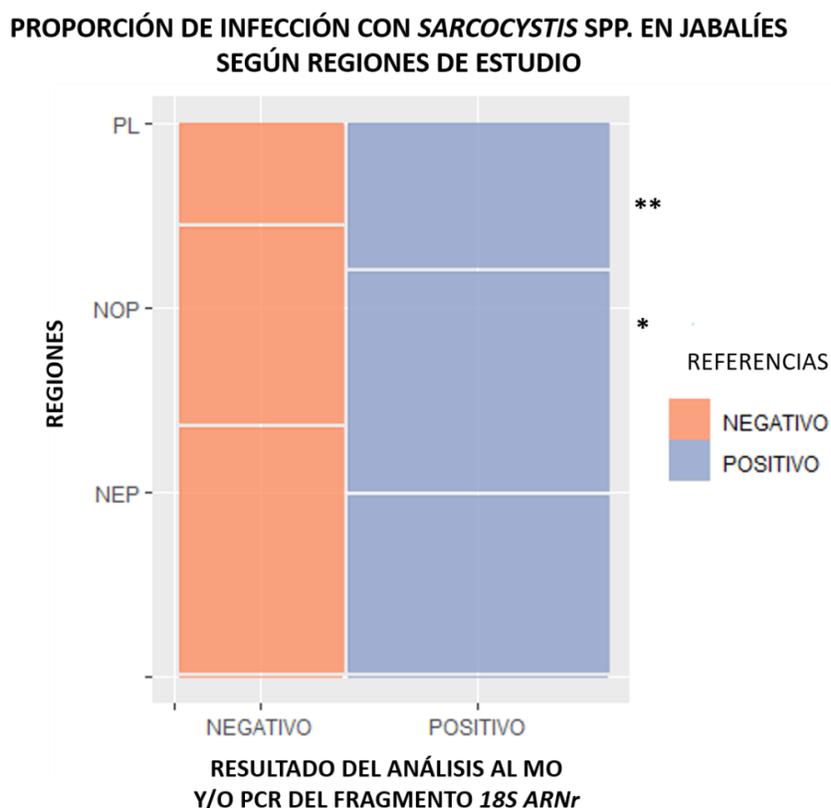


Figura 10. Presencia de *Sarcocystis* spp. en muestras de jabalíes, según la región de estudio. Asteriscos indican diferencias significativas (* indica: $p < 0,05$; ** indica: $p < 0,01$).

**PROPORCIÓN DE INFECCIÓN CON *SARCOCYSTIS* SPP. EN JABALÍES
SEGÚN MÚSCULOS ANALIZADOS**



Figura 11. Presencia de *Sarcocystis* spp en muestras de jabalíes, según músculos analizados.

6.4 COMPARACIÓN ENTRE CERDOS DE CRÍA SEMIEXTENSIVA VS. JABALÍES

El análisis de los resultados obtenidos por MO para jabalíes y cerdos de CSE, revelaron que los primeros presentaron una tasa de infección con *Sarcocystis* spp. significativamente mayor (48,3% vs. 34.6%, respectivamente) ($p < 0,05$) (Fig. 12).

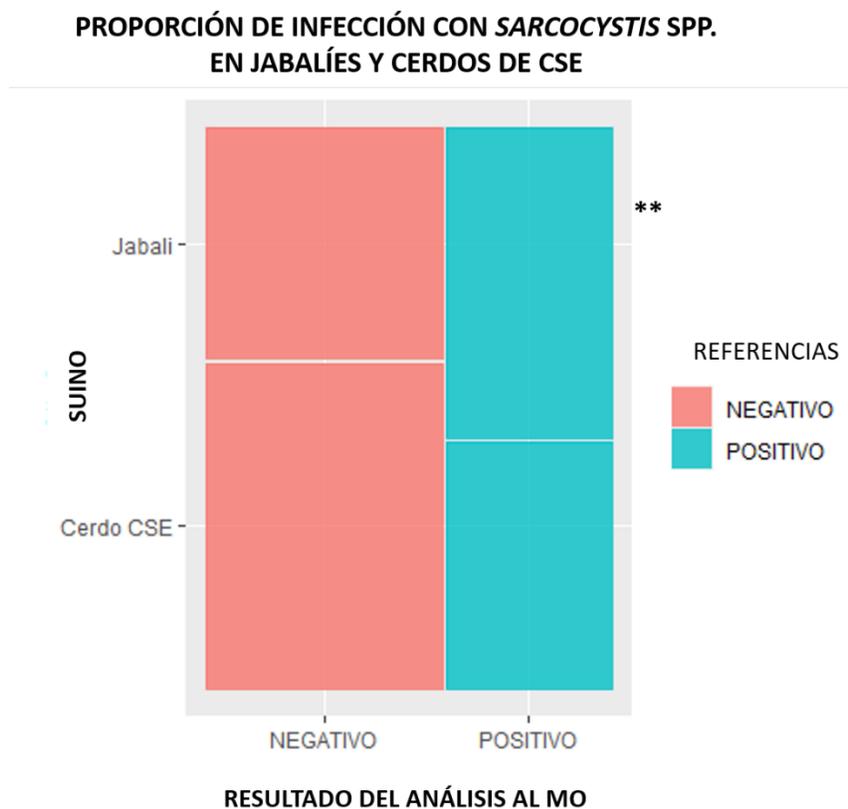


Figura 12. Proporción de muestras con quistes de *Sarcocystis* spp. en jabalíes y cerdos de CSE. Asteriscos (**) indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

7. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación proporciona tasas de infección con *Sarcocystis* spp., determinadas tanto por MO como por PCR, así como la identificación y diferenciación morfológica y molecular de dichos protozoarios en suinos de Argentina. Se recolectaron muestras de músculos de 801 suinos (cerdos- $n=561$; jabalíes- $n=240$), las cuales fueron analizadas por homogeneización y MO. Mediante ésta última técnica, el 31,8% (255/801) de todas las muestras analizadas resultaron positivas a la presencia de quistes de *Sarcocystis* spp. Los estudios publicados a nivel mundial que analicen infecciones con *Sarcocystis* spp., en ambos tipos de suinos en una misma región son escasos (Imre y col., 2017), y son inexistentes en el continente Americano. En el caso de los jabalíes, se analizó la prevalencia al MO y molecular mediante PCR; mientras que, en cerdos - por una cuestión de costos - se estableció la prevalencia mediante MO y se analizó solo una submuestra ($n=202$) mediante estudios de PCR.

Referido a las muestras de cerdos, la tasa de infección con *Sarcocystis* spp. por PCR del fragmento *18S ARNr* fue del 47,5% (96/202), siendo significativamente mayor a la obtenida por MO (24,7%; 139/561) ($p<0,05$). Resultados similares a este último, se reportaron en Rumania, donde un 23,4% de cerdos resultaron positivos (Imre y col., 2017). Sin embargo, prevalencias más elevadas se obtuvieron en China (36,8%) (Huang y col., 2019), Lituania (40,2%), (Januskevicius y col., 2019) y EE. UU. (49%) (Calero-Bernal y col., 2015), mientras que India registra la tasa de infección más alta obtenida hasta la fecha (58,4%), lo cual podría estar vinculado tanto la falta de inspección microscópica de la carne como a medidas higiénicas deficientes, lo cual fomenta que los cerdos tomen contacto con alimento y/o agua contaminados con esporocistos (Kaur y col., 2016).

En este sentido, lo antedicho podría asociarse con el tipo de cría o explotación, que podría actuar como predisponente en la infección (Braun, 2016; Perfumo y col., 2019). Los sistemas intensivos o de confinamiento se desarrollan en galpones, cubiertos o semicubiertos, con cierto control ambiental en su interior, mientras que los sistemas semiextensivos se desarrollan a campo, con distinto grado de intensificación, según los requerimientos de los animales (sombreaderos, comederos, bebederos) (Braun, 2016; Perfumo y col., 2019). Los primeros, se caracterizan por concentrar un mayor número de cerdos por unidad de superficie, lo que aumentaría el riesgo de infección y la diseminación de enfermedades contagiosas. Es por esto que, para evitar la contaminación ambiental y el desarrollo de patologías digestivas y/o respiratorias, dichos establecimientos realizan el manejo “todo-dentro, todo-fuera” (*all-in, all-out*), aplicando el llamado **vacío sanitario** (lavado y desinfección rigurosa de las instalaciones) (Perfumo y col., 2019). En lo que respecta a los sistemas al aire libre, se caracterizan por no presentar una regulación estricta, tanto en la limpieza como en el tratamiento de efluentes. En consecuencia, factores como la temperatura media diaria, la heliofanía, la humedad relativa, las precipitaciones, vegetación, el tipo de suelo y frecuencia de contacto con el mismo, y la interacción con otras especies, resultan factores contribuyentes para el desarrollo y la propagación de estadios infectivos de diversos agentes patógenos (Braun, 2016; Perfumo y col., 2019), entre los que podemos destacar a *Sarcocystis* spp. Teniendo en cuenta el tipo de cría, la tasa de infección obtenida por MO fue significativamente mayor en los cerdos de CSE (34,6%), respecto a lo obtenido en los cerdos de CI (15,9%) ($p < 0,05$). Esto refuerza la idea de que los cerdos en contacto con el suelo y ambientes contaminados con heces de otros animales (incluso humanos) tienen casi el doble de probabilidad de estar infectados con *Sarcocystis* spp. A su vez, esta notable diferencia en la tasa de infección según el tipo de cría va en consonancia con lo descrito en Brasil por Espindola y col. (2022) en cerdos rurales, quienes han señalado que: condiciones sanitarias precarias, alimentación a base de

desechos agrícolas o restos de comida y agua procedente de pozos, sumado al estrecho contacto con otros animales (principalmente cánidos) contribuyen a la continuidad del ciclo biológico de *Sarcocystis* spp. Asimismo, Singh y col. (2010) ha enfatizado que las prácticas de sacrificio no controladas pueden contribuir a la propagación de estadios infectivos de *Sarcocystis* spp. Por otro lado, estudios previos en cerdos adultos de vida libre demostraron que la edad también jugaría un factor crucial a la hora de estudiar la probabilidad de infección, debido a que se asocia a un mayor tiempo de exposición (Calero-Bernal y col. 2015; Imre y col. 2017). Desafortunadamente, en este trabajo, la edad de los cerdos estudiados no estuvo disponible en todos los casos, lo cual hubiera sido útil para poder realizar comparaciones.

En lo que respecta a los jabalíes, el 61,2% (147/240) de las muestras analizadas resultaron positivas a la infección por *Sarcocystis* spp. mediante MO y/o PCR. En concordancia con lo obtenido en este trabajo, se han informado prevalencias del 72,7%, 73,8% y 60,4% en España (Calero-Bernal y col., 2016), Portugal (Coelho y col., 2015), y Rumania (Imre y col., 2017), respectivamente. En Italia se informó una prevalencia más alta (97%), lo que podría estar relacionado con la aplicación de un método diagnóstico más sensible (Gazzonis y col., 2019). Por otro lado, la proporción de jabalíes infectados con *Sarcocystis* spp. en las regiones del *NOP* y *PL* fueron significativamente mayores a las obtenidas en el *NEP* ($p < 0,05$). Esto podría estar asociado a que, en las primeras dos regiones, las condiciones ambientales (p. ej.: mayor humedad) podrían mejorar la dispersión, la viabilidad y la infectividad de los esporocistos, así como la distribución natural de los cánidos (domésticos y silvestres), generando ambientes más propensos y favorables para el desarrollo del ciclo biológico de *Sarcocystis* spp. En cuanto a los diferentes músculos muestreados, no se observaron diferencias significativas en la infección con este protozooario, lo que podría sugerir la falta de un tropismo específico ($p > 0,05$). Sin embargo, para confirmar tal

hipótesis, sería importante muestrear y analizar diferentes músculos de un mismo animal infectado.

Teniendo en cuenta solo los resultados obtenidos por MO, la proporción de jabalíes infectados con *Sarcocystis* spp. resultó significativamente mayor que lo obtenido en cerdos, incluso con los de CSE (48,3% vs. 34,6%) ($p < 0,05$). Notablemente, al considerar sólo los jabalíes de la misma región donde se recolectaron los cerdos (PL) esta diferencia es aún mayor (69,6% vs. 34,6%, respectivamente) ($p < 0,05$). Esto demuestra que, en una misma región o ambiente, los jabalíes tienen un riesgo de infección mucho mayor que los cerdos domésticos. El acceso por parte de los jabalíes a fuentes de agua naturales, las cuales pueden estar contaminadas con materia fecal de cánidos y otros potenciales HD, podría ser el factor que explique las diferencias encontradas. En consonancia con lo obtenido en este trabajo, Imre y col. (2017) reportaron en Rumania una tasa de infección con *Sarcocystis* spp. significativamente mayor para jabalíes respecto de cerdos domésticos (60,4% vs. 23,4%, respectivamente) ($p < 0,05$).

Los quistes maduros de *S. miescheriana* y *S. sui hominis* difieren en la ultraestructura de la pared del quiste cuando son analizados por MET (Dubey y col., 2016). Al analizar por MET muestras tanto de cerdos como de jabalíes, se observó que todos los quistes tenían una ultraestructura compatible con *S. miescheriana*, y sólo un quiste de una muestra de jabalí (J15/9) mostró una ultraestructura compatible con *S. sui hominis* (Dubey y col., 2016). Este hallazgo se constituye como la primer descripción de *S. sui hominis* en el continente Americano. A su vez, esta muestra también contenía quistes de *S. miescheriana*; por lo tanto, se confirmó que ese animal estaba coinfectado. Estos resultados muestran la relevancia de realizar la identificación de quistes por MET como complemento a los estudios moleculares, lo que podría ayudar a lograr una adecuada

identificación de especies, basada en las características ultraestructurales de las paredes de los quistes (Dubey y col., 2016).

Si bien los métodos de diagnóstico convencionales -principalmente basados en el examen por MO - han sido ampliamente utilizados para la identificación de *Sarcocystis* spp., éstos tienen baja especificidad y sensibilidad variable (Abdel-Hafeez y col., 2015; Khieu y col., 2017). Por ello, actualmente los métodos moleculares han cobrado mayor relevancia a la hora de realizar un diagnóstico más específico. Sin embargo, se han registrado notables diferencias tanto en las prevalencias informadas como en los métodos empleados para el diagnóstico de especies de este género (Stojecki y col., 2012; Calero-Bernal y col., 2015; Imre y col., 2017; Huang y col., 2019).

En cuanto a las muestras de cerdos, la tasa de infección con *Sarcocystis* spp. determinada por la PCR del fragmento del *18S ARNr*, fue significativamente mayor que la obtenida por MO (47,5% vs. 24,7%, respectivamente) ($p < 0,05$). Asimismo, al comparar los resultados obtenidos por la PCR *18S ARNr* para *CI* y *CSE*, no se encontraron diferencias significativas, siendo para ambos grupos mayor que la detectada por MO. Esto coincide con el índice kappa obtenido ($k=0,62$), el cual refleja una concordancia intermedia entre ambas metodologías, pudiendo asociarse a una mayor sensibilidad de los métodos moleculares en el diagnóstico de *Sarcocystis* spp. Además, esta concordancia moderada también se debe a muestras en las que se observaron quistes por MO y que el homogenato de músculos resultó negativo por PCR. Esto podría atribuirse a que varias de las muestras presentaban un estado de descomposición avanzado al momento de su recepción. En consecuencia, si bien se observaron quistes a la MO –muchos de los cuales estaban deteriorados- el material genético pudo degradarse, resultando en “falsos negativos” en la PCR. En sumatoria, si consideramos los resultados de ambas técnicas aplicadas la prevalencia real de infección sería aún mayor a la detectada por cada técnica por separado. Resultados similares fueron reportados por

Kaur y col. (2016), donde se detectó una tasa de infección significativamente mayor por métodos moleculares que por MO (72% vs. 58,4%) ($p < 0,05$). Sin embargo, Huang y col. (2019) no encontraron diferencias significativas para la prevalencia de *S. miescheriana*, determinadas tanto por métodos moleculares como por MO (36,8% vs. 32,9%) ($p > 0,05$). Si bien las técnicas moleculares serían más sensibles, la realización de estudios microscópicos y moleculares en combinación permitirían obtener una prevalencia más ajustada a la realidad, en especial si se trabaja con muestras con potencial presencia de inhibidores y/o degradación del ADN.

En lo que refiere a muestras de cerdos de CSE, al considerar tanto la prevalencia obtenida por MO (34,6%) como por PCR (48,9%) y en consonancia con la literatura, destacamos que este tipo de cría sería un factor de riesgo para la infección por *Sarcocystis* spp. (Chauhan y col., 2020; Espindola y col., 2022). Por otra parte, se observó que todas las muestras positivas por MO y/o por PCR del fragmento *18S ARNr* resultaron negativas a la PCR de la especie zoonótica, *S. suis*, por lo que asumimos que la prevalencia (tanto microscópica como molecular) es representativa de *S. miescheriana*, siendo ésta la única especie encontrada en cerdos en este estudio. Resultados similares se reportaron en estudios previos donde la especie predominante encontrada fue *S. miescheriana* (Calero-Bernal y col., 2015; Imre y col., 2017; Huang y col., 2019).

En cuanto a los quistes individuales de cerdos, amplificados y secuenciados para el fragmento *18S ARNr* ($n=14$) e *ITS1* ($n=4$), mostraron entre un 99-100% de identidad con las secuencias de *S. miescheriana* reportadas previamente para ambos marcadores. Adicionalmente, las secuencias obtenidas en este estudio mostraron 100% de identidad entre ellas, evidenciando también una baja variabilidad intra-específica. Esto podría estar relacionado con los marcadores genéticos utilizados, principalmente el *18S ARNr* que tiene elevada conservación intra-especies, y a regiones hipervariables que permiten la diferenciación entre especies o grupos de especies (Moré y col.,

2013; Huang y col. 2019). Algo similar se obtuvo con el marcador *ITS1*, cuyas secuencias reportadas en este trabajo mostraron una alta identidad entre ellas y con otras secuencias de *S. miescheriana*, provenientes de otras regiones geográficas (Gondim y col., 2021). Estos resultados indicarían una alta conservación intra-específica de estos marcadores, no siendo útiles para la subtipificación /o detección de haplotipos o variantes regionales de *S. miescheriana*.

A diferencia de lo que se observó en los músculos de cerdos, en las muestras de jabalíes la prevalencia obtenida basada en la PCR del fragmento del *18S ARNr* fue ligeramente inferior a la observada por MO (45,8% vs. 48,3%, respectivamente), lo cual podría estar relacionado a que algunas muestras se encontraban con un cierto grado de descomposición, causando así la degradación del ADN y la consiguiente incapacidad para lograr amplificadores adecuados. En contraste con lo obtenido, otros estudios que utilizaron ambos métodos, han informado una prevalencia molecular mayor a la obtenida por microscopía óptica (Calero-Bernal y col. 2016; Imre y col. 2017; Gazzonis y col. 2019). Por otro lado, 4 de las 110 muestras positivas a la PCR del fragmento del *18S ARNr* fueron positivas débiles a la PCR específica de *S. sui hominis* (Gazzonis y col., 2019), incluida aquella muestra en la que se observó un quiste de *S. sui hominis* por MET (J15/9). Para aumentar la concentración de todas ellas, se realizó una segunda PCR con los mismos *primers* utilizados previamente (*SF8* y *SR11*) y los amplificadores obtenidos fueron purificados y se enviaron para su secuenciación. Desafortunadamente, la calidad de las secuencias obtenidas fue baja y no se pudieron lograr secuencias consensos adecuadas. Una posible explicación podría ser la baja proporción de quistes de *S. sui hominis* en las muestras que, conjuntamente con una sobrerrepresentación de *S. miescheriana*, dificultan su diagnóstico en términos de concentración de ADN. En consonancia con esto, los quistes amplificadores y secuenciados, así como la mayoría de los quistes observados por MET (salvo el de la muestra J15/9, que contenía un quiste de *S.*

suihominis), se identificaron como *S. miescheriana*, lo que sugiere una mayor carga de quistes de esta última especie. Por otro lado, pudimos observar que, a partir del control positivo proporcionado por el Dr. Luca Villa (WB9), se obtuvieron amplificadores adecuados y una secuencia de buena calidad, por lo que una posible explicación sería que los *primers* utilizados para el diagnóstico de *S. suihominis*, diseñados a partir de un aislamiento de Europa, tengan una complementariedad parcial con la secuencia génica de la variante sudamericana de esta especie. Por tal motivo, son necesarios nuevos estudios de mayor sensibilidad y especificidad que permitan identificar adecuadamente y secuenciar fragmentos génicos, genes o marcadores moleculares de *S. suihominis* de Sudamérica.

Es importante destacar que el músculo estudiado en la mayoría de las muestras, tanto de cerdos como de jabalíes - al igual que la mayoría de los estudios a nivel mundial - fue el diafragma, en el cual se detectó *S. suihominis* en un bajo porcentaje de jabalíes y fue nulo en cerdos. Considerando que algunas especies de *Sarcocystis* tienen tropismo por ciertos músculos, es posible sugerir que la especie zoonótica produzca quistes en otros músculos, distintos del previamente mencionado. Pensando en términos evolutivos, de adaptación y ciclo biológico, los músculos que sean frecuentemente consumidos crudos y/o poco cocidos por humanos podrían ser de predilección de esta especie y constituyen cortes a ser evaluados en futuros estudios. Por consiguiente, no es posible descartar totalmente la presencia de *S. suihominis* en cerdos o incluso, en una mayor prevalencia a la detectada en jabalíes en nuestro país.

En lo que respecta a las secuencias de los 17 quistes de jabalíes analizados, éstos mostraron una identidad del 99,8-100% entre ellas y con las secuencias de *S. miescheriana* previamente reportadas y sólo una muestra (TEC 105) presentó dos diferencias de una sola base. Las muestras fueron provenientes de 16 animales distribuidos en las 3 regiones de muestreo (6 de *NEP*, 6 de *PL*

y 5 de *NOP*), lo que nuevamente sugiere una escasa variación geográfica intra-específica, en el fragmento del *18S ARNr* secuenciado. Resultados similares fueron informados previamente por Calero Bernal y col. (2016) y Gazzonis y col. (2019), al analizar las secuencias obtenidas de este marcador para *S. miescheriana* en jabalíes en Europa. Como mencionamos anteriormente, dado que la mayoría de los animales estaban infectados con *S. miescheriana*, es posible que aquellos infectados con *S. sui hominis* alberguen ambas especies, lo que podría resultar en una secuenciación mixta, dificultando la identificación molecular adecuada a partir del ADN muscular, como sugirieron Gazzonis y col. (2019). Es posible suponer entonces que *S. miescheriana* está presente en la mayoría (o incluso en todos) los jabalíes infectados con *Sarcocystis* spp. de Argentina.

La prevalencia de *S. sui hominis* detectada en este estudio fue ligeramente superior a la reportada en España e Italia, donde en trabajos publicados, se identificó un solo jabalí como positivo (Calero-Bernal y col. 2016; Gazzonis y col., 2019). Según investigaciones realizadas durante la última década, la prevalencia encontrada para *S. sui hominis* en jabalíes fue baja, como ocurrió en Portugal, Rumania y EE. UU. (Calero-Bernal y col., 2015; Coelho y col., 2015; Imre y col., 2017). Por otro lado, la mayor prevalencia se ha informado en cerdos domésticos de la India (Dubey y col., 2016; Chauhan y col., 2020). Hasta el momento no había datos disponibles en Sudamérica, por lo que este sería el primer trabajo que informa la detección de la especie zoonótica, *S. sui hominis*, en jabalíes de nuestro país, confirmando su presencia en Sudamérica, lo que supone un riesgo, tanto para suinos como para humanos de esta región.

Los jabalíes son omnívoros que se alimentan de todo tipo de materia orgánica e inorgánica (Schley & Roper, 2003; Hafeez y col., 2011; Ballari & Barrios García, 2013). Esta capacidad de adaptarse a la ingesta de diversos alimentos les ha permitido establecer poblaciones en casi todos los lugares

donde han sido introducidos (Rosell y col. 2001). La disponibilidad alimentaria y fuentes de agua de bebida, no sólo influye en sus hábitos, sino también afecta la dinámica poblacional, la dispersión, la reproducción e incluso las interacciones con otras especies (Ballari & Barrios García, 2013). Sin embargo, los jabalíes parecen mostrar una preferencia de alimentación por materia vegetal por sobre la de origen animal y utilizan fuentes de agua naturales (Wilcox & Van Vuren, 2009). En este sentido, podríamos pensar que la probabilidad de adquirir la infección por ingesta de ooquistes y/o esporocistos en un determinado ambiente silvestre sería mayor a la de los cerdos, sobre todo los de *CI*, cuya alimentación se basa en productos balanceados. A partir de lo antepuesto, se puede explicar la tasa de infección con *Sarcocystis* spp. obtenida en jabalíes, la cual resultó significativamente mayor a lo observado en cerdos domésticos (48,3% vs. 24,7%) ($p < 0,05$). Por lo tanto, el conocimiento sobre el amplio abanico alimentario de estos suinos, resulta fundamental para la delimitación de planes de manejo y controles sanitarios, que permitan prevenir la continuidad y preservación de agentes patógenos, entre ellos *Sarcocystis* spp.

Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre con los jabalíes que, al ser vida silvestre, no es posible aplicar medidas de bioseguridad que permitan regularizar su status sanitario, en lo que respecta a cerdos – más aún, en los de *CI* - la aplicación de dichas normas reduciría considerablemente la transmisión de diferentes patógenos, entre los que se destaca *Sarcocystis* spp. (Amass & Clark, 1999). En un sentido más amplio, se define entonces bioseguridad como el conjunto de prácticas de manejo, protocolos y procedimientos destinados a la reducción del riesgo de entrada y/o diseminación de enfermedades en una población de animales (Perfumo y col., 2019). Es por esto que su aplicación se debe focalizar en: reducir el número y la carga de patógenos endémicos del establecimiento y disminuir al máximo su diseminación (interna y externamente), incluyendo fundamentalmente la transmisión de aquellos de naturaleza zoonótica (Perfumo y col., 2019). Si

bien en nuestro estudio no se detectó *S. suis* en cerdos, sí se detectó *S. miescheriana*. Esto indica que los animales ingirieron agua o alimento contaminados con esporocistos presentes en materia fecal de cánidos. Esta vía podría también incluir otros patógenos; por lo que la detección de *S. miescheriana* podría ser un indicador de contaminación fecal y deficiencias en la bioseguridad de los establecimientos. Entre las medidas a considerar se puede sugerir: poner en práctica la utilización de alimento balanceado previamente irradiado, con el fin de eliminar cualquier estadio infectivo, evitar el acceso de cánidos a los establecimientos, eliminar la materia fecal de cánidos en el caso de ser detectada en las inmediaciones y limpiar y desinfectar periódicamente tanto los tanques de agua como las tuberías (Román y col., 2006; Alarcón y col., 2021). Asimismo, para los cerdos de CSE sería recomendable evitar el uso y contacto con desechos como fuente de alimento, utilizar fuentes de agua segura y, en lo posible, adaptar las condiciones como se detalla anteriormente. Además, sería importante que se realizara en nuestro país, tal como hicieron en Lituania Baranauskaitė y col. (2023) el muestreo y análisis de cuerpos de agua que sean de fácil acceso a suinos, en busca de ooquistes/esporocistos de *Sarcocystis* spp., de manera de monitorear potenciales zonas de riesgo de infección. Por otra parte, sería importante que se llevaran a cabo capacitaciones y controles por parte de los organismos de vigilancia epidemiológica y sanitaria en estos aspectos, especialmente en nuestro país donde la carne de suinos es consumida frecuentemente como chacinado, lo que favorecería la propagación de esta y otras zoonosis (Rosenthal, 2021). Considerando lo antepuesto, enfatizamos que existe un sub-diagnóstico de esta enfermedad parasitaria transmitida por alimentos (EPTA). Finalmente, la identificación y diferenciación de *Sarcocystis* spp. en músculos de suinos permite conocer el estatus sanitario de la pía argentina, útil para orientar planes de control y promover prácticas de manejo en las explotaciones porcinas.

Por otro lado, cabe aclarar que no fue posible la realización del objetivo secundario propuesto, el cual planteaba la identificación de antígenos inmunodominantes de *Sarcocystis* spp. presentes en suinos de nuestro país. La causa de esto fue que, al momento de realizar la PCR del gen *cox 1*, específica para el diagnóstico de *S. sui hominis*, surgieron dificultades metodológicas en su puesta a punto, lo cual llevó mayor tiempo del contemplado; a esto se le sumaron las restricciones de acceso y uso del laboratorio, tras la pandemia de COVID19. Como se menciona precedentemente, no se detectó ninguna infección “pura” con *S. sui hominis*, lo que hubiera permitido aislar quistes de esta especie, para ser utilizados como antígenos en técnicas de inmunomarcación. La baja prevalencia de *S. sui hominis* encontrada en este estudio, plantea también un desafío para lograr una suficiente cantidad de parásitos puros o aislados en futuros estudios. En base a estos resultados, podrían proponerse análisis proteicos y antigénicos de quistes individualizados, que permitan analizar la potencial existencia de antígenos que generen respuestas serológicas específicas de *S. sui hominis*.

En conclusión, este es el primer estudio de identificación morfológica y molecular de *Sarcocystis* spp. en suinos de Argentina, analizando condiciones geográficas para jabalíes y, de cría para cerdos. A partir de los resultados obtenidos, se desprende que la infección por *S. miescheriana* es la más prevalente en Argentina y está más extendida que la causada por la especie zoonótica. Asimismo, este estudio detectó por primera vez *S. sui hominis* en suinos de Sudamérica. Sin embargo, futuros estudios son necesarios en nuestro país, enfocándose en la complementariedad de métodos diagnósticos y en la obtención de quistes o aislamientos de *S. sui hominis* para optimizar su diagnóstico. Por ello, sería importante analizar un mayor número de muestras, en particular proveniente de distintos cortes cárnicos, frecuentemente consumidos crudos por

humanos, aplicando métodos más sensibles como técnicas de PCR en tiempo real y/o utilizando otros marcadores moleculares.

8. CONCLUSIONES

A partir de lo antepuesto, se concluye que no existen evidencias suficientes para rechazar las hipótesis planteadas en esta investigación, lo cual implica que:

A- A la fecha, existen al menos 2 especies de *Sarcocystis* que afectan a suinos de Argentina con diferencias morfológicas y moleculares.

B1- La tasa de infección con *Sarcocystis* spp. en músculos de suinos de Argentina es menor al 50%. En particular, en este trabajo el 31,8% (255/801) de todas las muestras resultaron positivas por MO y el 46,6% (206/442) (cerdos: 96/202; jabalíes: 110/240) de ellas fueron positivas a la PCR del fragmento del *18S ARNr*.

B2- La tasa de infección con *Sarcocystis* spp. es significativamente mayor en jabalíes, respecto de lo hallado en cerdos domésticos. En función de los resultados obtenidos por MO, el 24,7% (139/561) de los cerdos resultaron positivos a la presencia de *Sarcocystis* spp. en contraposición al 48,3% (116/240) de los jabalíes ($p < 0,05$).

B2- La tasa de infección con *Sarcocystis* spp. es significativamente mayor en cerdos domésticos de CSE (34,6%; 92/266) respecto de los cerdos de CI (15,9%; 47/295) ($p < 0,05$).

B3- La tasa de infección con la especie zoonótica en músculos de suinos de Argentina es menor al 5%. En particular, el 3,6% (4/110) de las muestras de jabalíes fueron positivas débiles para *S. suis*, y esta especie no fue detectada en los músculos analizados de cerdos domésticos.

9. ANEXO

9.1 Solución buffer de fosfatos (PBS)

Solución madre (10X)

- Cloruro de sodio (NaCl) 40 g
- Cloruro de potasio (KCl) 1 g
- Di-sodio hidrogeno fosfato (Na_2HPO_4) 5,75 g
- Potasio di-hidrogeno fosfato (KH_2PO_4) 1 g
- Agua destilada 500 ml

Solución de trabajo (1X)

Utilizar la solución madre diluida 1:10 en agua destilada. El pH final será de 7,2.

9.2 Homogeneización y examen microscópico en fresco

- Picar entre 5 y 10 g. de músculo con 50 ml de buffer de fosfatos (PBS) en un homogeneizador (p. ej: mixer Philips 600 W);
- Filtrar, a través de colador, en un tubo de 50 ml;
- Centrifugar el filtrado a 500 x g durante 5 minutos (eliminar el sobrenadante);
- Recolectar 1 g. del sedimento (homogenato) en un microtubo de 1,5 ml (*DNAsa free*) y conservar a -20°C para posteriores estudios moleculares (PCR y secuenciación);
- Colocar homogenato en placas de Petri y observar en microscopio invertido (Nikon, 40X).

9.3 Técnica de tinción con hematoxilina y eosina

1- Desparafinado: 2 pasajes por xilol de 10 min cada uno (escurrir bien).

2- Hidratación:

- pasar por alcohol 100° 10 seg;
- pasar por alcohol 96° 10 seg;
- pasar por alcohol 70° 10 seg;
- pasar por agua destilada

3- Colorear con hematoxilina de Gill (30 seg a 3 min)

4- Lavado en agua corriente (realizar 2 o 3 cambios de agua corriente)

5- Enjuagar en agua destilada

6- Colorear con eosina (1 min)

7- Deshidratación:

- pasar por alcohol 96° 10 seg;
- pasar por alcohol 100° 10 seg;
- pasar por xilol 10 seg

8- Montaje: con bálsamo de Canadá

9.4 Extracción de ADN genómico: Kit comercial Wizard Genomic PROMEGA

- **Preparación de la muestra y lisis (muestras + 1 control de extracción)**

1. Tomar entre 25-50 µg de cada homogenato de músculos a extraer, luego de descongelarlo a temperatura ambiente.
2. Adicionar 600 µl de la solución de lisis nuclear + 20 µl de proteinasa-K (40 U/mg) por muestra a extraer.
3. Incubar overnight a 55 °C con regulares agitaciones.
4. Adicionar 200 µl de la solución de precipitación proteica. Agitar por 20 segundos y se enfriar en hielo por 5 min.
5. Centrifugar a 16,000 x g por 4 min.

- **Precipitación del ADN y rehidratación**

1. Transferir el sobrenadante a un microtubo de 1,5 ml conteniendo 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente.
2. Mezclar por inmersión
3. Centrifugar 16,000 x g por 1 min.
4. Descartar el sobrenadante y agregar 600 µl de etanol 70 %. Lavar el pellet por inversión del tubo.
5. Centrifugar a 16,000 x g por 1 min.
6. Descartar el etanol y dejar secar el pellet durante 15 min con la tapa del microtubo abierta.
7. Adicionar 100 µl de la solución de rehidratación de ADN a temperatura ambiente.

9.5 PCR diagn3stica para *Sarcocystis* spp. dirigida al fragmento del 18S ARNr

Realizar la amplificaci3n mediante PCR, de las muestras de ADN extraídas, utilizando los *primers* *SarcoFext* (GGTGATTCATAGTAACCGAACG) y *SarcoRext* (GATTTCATAAGGTGCAGGAG) específcos para el gen *18S ARNr* de *Sarcocystis* spp.

Procedimiento

1. Preparar el master mix (muestras + 1), con las siguientes concentraciones:

- H₂O ultrapura (csp: 25 μ l)
- 10X PCR buffer 1x
- BSA 20 mM
- MgCl₂ 0,75 mM
- *SarcoFext* 0,4 μ M
- *SarcoRext* 0,4 μ M
- dNTPs 200 μ M
- Taq-polimerasa (5 U/1 μ l) 1 U

2. Alicuotar el master mix (23 μ l/reacci3n) en tubos de 0,2 ml y agregar 2 μ l de ADN de las muestras extraídas a cada tubo.

4. Colocar los tubos en el termociclador y utilizar el siguiente programa: 94 $^{\circ}$ C/4 min, 40 ciclos de: 94 $^{\circ}$ C/40 seg, 59 $^{\circ}$ C/ 1 min, 72 $^{\circ}$ C/1 min y una extensi3n final a 72 $^{\circ}$ C/5 min.

5. Correr los productos amplificados (volumen total de 25 μ l) en geles de agarosa al 1,5 % mediante electroforesis (100 V, 120 mA durante 35 min), y visualizarlos utilizando SYBR[®] Safe DNA y transiluminador de luz azul (Invitrogen, USA).

9.6 PCR diagn3stica para *S. suis* dirigida al gen marcador *coxI*

Realizar la amplificaci3n de ADN mediante PCR utilizando los primers *SF8* (CTTGGAGCGGTATGGCTAAT) y *SR11* (GGAAGTGGGCAACAATGTAATA) espec3ficos para el gen de *coxI* de *S. suis*.

Procedimiento

1. Preparar el master mix (muestras + 1), con las siguientes concentraciones:

- H₂O ultrapura (csp: 25 μ l)
- 10X PCR buffer 1x
- BSA 20 mM
- MgCl₂ 0,75 mM
- *SF8* 0,4 μ M
- *SR11* 0,4 μ M
- dNTPs 200 μ M
- Taq-polimerasa (5 U/1 μ l) 1U

2. Alicuotar 22 μ l del PCR master mix en tubos de 0,2 ml y agregar 3 μ l de ADN de las muestras extra3das a cada tubo.

3. Colocar los tubos en el termociclador y utilizar el siguiente programa: 90°C/5 min; 45 ciclos de: 94°C/30 seg., 54°C/30 seg., 72°C/90 s y una extensi3n final a 72 °C/5 min.

4. Correr los productos amplificados (volumen total de 25ul) en geles de agarosa al 1,5 % mediante electroforesis (100 V, 120 mA durante 35 min), y visualizarlos utilizando SYBR® Safe DNA y transiluminador de luz azul (Invitrogen, USA).

9.7 PCR diagn3stica para dirigida a ITS1

Realizar la amplificaci3n mediante PCR utilizando los primers *SUF1* (GATTGAGTGTTCGGTGAATTATT) y *5.8SR2* (AAGGTGCCATTTGCGTTCAGAA) espec3ficos para el gen de *ITS1* de *Sarcocystis* spp.

Procedimiento

1. Preparar el PCR master mix (muestras + 1), con las siguientes concentraciones:

- H2O ultrapura
- 10X PCR buffer 1x
- BSA 20 mM
- MgCl₂ 25 mM
- *SUF1* 0,4 mM
- *5.8SR2* 0,4 mM
- dNTPs 200 μM
- Taq-polimerasa (5 U/1 μl) 1 U

2. Alicuotar 22 μl del PCR master mix en tubos de 0,2 ml y agregar 3 μl de las muestras de ADN extra3das a cada tubo.

3. Colocar los tubos en el termociclador y utilizar el siguiente programa: 95°C/15 min; 45 ciclos de: 94°C/30 seg., 55°C/30 seg., 72°C/90 seg. y una extensi3n final a 72 °C/5 min.

4. Correr los productos amplificados (volumen total de 25ul) en geles de agarosa al 1,5 % mediante electroforesis (100 V, 120 mA durante 35 min), y visualizarlos utilizando SYBR® Safe DNA y transiluminador de luz azul (Invitrogen, USA).

9.8 Purificación de productos de PCR (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System)

- Disolución de la banda de interés presente en el gel

1. Después de la electroforesis, extraer la parte del gel que contiene la banda de ADN y colocarla en un tubo de 1,5 ml *DNAsa free*.

2. Agregar 10 µl de solución de unión a la membrana por cada 10 mg de porción de gel.

Mezclar en vortex e incubar a 50–65 °C hasta que el gel se disuelva por completo.

- Procesamiento de los amplificadores de PCR

1. Agregar un volumen igual de solución de unión a membrana a cada amplificado.

- Unión de ADN

1. Insertar la mini columna SV en el tubo de recolección.

2. Transferir la mezcla de gel disuelto o el producto de PCR preparado a la mini columna.

Incubar a temperatura ambiente durante 1 min.

3. Centrifugar a 16.000 × g durante 1 min. Desechar el sobrenadante y reinsertar la mini columna en tubo colector.

- Lavado

4. Agregar 700 µl de solución de lavado de membrana (etanol agregado). Centrifugar a 16.000 × g durante 1 min. Desechar el sobrenadante y volver a insertar la mini columna en el tubo colector.

- Tubo

5. Repetir el paso 4 con 500 µl de solución de lavado de membrana. Centrifugar a 16.000 × g durante 5 min.

6. Vaciar el tubo de colector y volver a centrifugar la columna durante 1 min. con la tapa de la microcentrífuga abierta para permitir la evaporación de cualquier residuo de etanol.

- Elución

7. Transferir, con cuidado, la mini columna a un tubo de 1,5 ml *DNAsa free*.

8. Agregar 25 µl de agua libre de nucleasas a la mini columna. Incubar a temperatura ambiente durante 1 min. Centrifugar a 16.000 × g durante 1 min.

9. Desechar la mini columna y almacenar el ADN a 4 °C o -20 °C.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Hafeez EH, Kamal AM, Abdelgelil NH, Abdel-Fatah M. 2015. Parasites Transmitted to Human by Ingestion of Different Types of Meat, El-Minia City, El-Minia Governorate, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol.* 45, 671-680.
- Abubakar S, Teoh BT, Sam SS, Chang LY, Johari J, Hooi PS, Lakhbeer-Singh HK, Italiano CM, Omar, SF, Wong KT, Ramli N, Tan CT. 2013. Outbreak of human infection with *Sarcocystis nesbitti*, Malaysia, 2012. *Emerg Infect Dis.* 19, 1989-1991.
- Alarcon LV, Allepuz A, Mateu E. 2021. Biosecurity in pig farms: a review. *Porcine Health Manag.* 7(1): 1-5.
- Amass SF, Clark LK. 1999. Biosecurity considerations for pork production units. *Journal of Swine Health and Production.* 7(5).
- Avapal RS, Sharma JK, Juyal PD. 2003. Comparative morphology of *Sarcocystis sui hominis* and *S. miescheriana* in domestic pigs. *Indian J Anim. Sci.* 73, 392-393.
- Avapal RS, Sharma JK, Juyal PD. 2004. Pathological changes in *Sarcocystis* infection in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Vet J.* 168, 358-361.
- Ballari SA, Barrios-García MN. 2013. A review of wild boar *Sus scrofa* diet and factors affecting food selection in native and introduced ranges. *Mammal Review.* 44(2), 124–134.
- Banerjee PS, Bhatia BB, Pandit BA. 1994. *Sarcocystis sui hominis* infection in human beings in India. *J Vet Parasitol.* 8, 57-58.

- Baranauskaite A, Strazdaite-Žielienė Ž, Serviene E, Butkauskas D, Prakas P. 2022. Molecular Identification of Protozoan *Sarcocystis* in Different Types of Water Bodies in Lithuania. *Life (Basel)*. 13(1):51.
- Barrows PL, Prestwood AK, Adams DD, Dykstra MJ. 1982a. Development of *Sarcocystis suicanis* Erber, 1977 in the pig. *J Parasitol*. 68, 674-680.
- Barrows PL, Prestwood AK, Green CE. 1982b. Experimental *Sarcocystis suicanis* infections: disease in growing pigs. *Am J Vet Res*. 43, 1409-1412.
- Bertero S, Cursack R, Tossolini LE. 1980. Primeros muestreos sobre la frecuencia de quistes de *Sarcocystis* spp. en los mamíferos domésticos de consumo humano en la República Argentina. *Rev Med Vet*. 61(5):395-8.
- Bottner A, Charleston WA, Hopcroft D. 1987. The structure and identity of macroscopically visible *Sarcocystis* cysts in cattle. *Vet Parasitol*. 24, 35-45.
- Böttner A, Charleston WAG, Hopcroft DC. 1987. The structure and identity of macroscopically visible *Sarcocystis* cysts in cattle. *Vet Parasitol*. 24(1-2), 35-45.
- Box ED, McGuinness TB. 1978. *Sarcocystis* in Beef from Retail Outlets Demonstrated by Digestion Technique. *J Parasitol*. 64(1), 161.
- Braun R. 2016. Producción porcina: el complejo educativo-productivo de la actividad en Argentina. Santa Rosa. Universidad Nacional de La Pampa. 1^{era} Edición.
- Calero-Bernal R, Perez-Martin JE, Reina D, Serrano FJ, Frontera E, Fuentes I, Dubey JP. 2016. Detection of Zoonotic Protozoa *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis suihominis* in Wild Boars from Spain. *Zoonoses Public Health*. 63, 346-350.

- Carletti T, Martin M, Romero S, Morrison DA, Marcoppido G, Florin-Christensen M, Schnittger L. 2013. Molecular identification of *Sarcocystis aucheniae* as the macrocyst-forming parasite of llamas. *Vet Parasitol.* 198, 396-400.
- Caspari K, Grimm F, Kuhn N, Caspari NC, Basso W. 2011. First report of naturally acquired clinical sarcocystosis in a pig breeding stock. *Vet Parasitol.* 177, 175-178.
- Comunidad Económica Europea. 2004. Reglamento relativo a la higiene de los productos alimenticios.
- Chauhan RP, Kumari A, Nehra AK, Ram H, Garg R, Banerjee PS, Karikalan M, Sharma AK. 2020. Genetic characterization and phylogenetic analysis of *Sarcocystis sui hominis* infecting domestic pigs (*Sus scrofa*) in India. *Parasitol Res.* 119, 3347-3357.
- Chen X, Zuo Y, Zuo W. 1999. Observation on the clinical symptoms and sporocyst excretion in human volunteers experimentally infected with *Sarcocystis hominis*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 17, 25-27.
- Claveria FG, De La Pena C, Cruz-Flores MJ. 2001. *Sarcocystis miescheriana* infection in domestic pigs (*Sus scrofa*) in the Philippines. *J Parasitol.* 87, 938-939.
- Collins GH, Charleston WAG, Wiens BG. 1980. Studies on *Sarcocystis* species VI: a comparison of three methods for the detection of *Sarcocystis* species in muscle. *NZ Vet J.* 28(9).
- Daft B, Barr B, Gardner I, Deryck R, Bell W, Peyser K, Ardans A, Kinde H, Morrow J. 2002. Sensitivity and specificity of western blot testing of cerebrospinal fluid and serum for diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis in horses with and without neurologic abnormalities. *J Am Vet Med Assoc.* 221, 1007-1013.

- Dahlgren SS, Gjerde B, Skirnisson K, Gudmundsdottir B. 2007. Morphological and molecular identification of three species of *Sarcocystis* in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in Iceland. *Vet Parasitol.* 149(3-4), 191-198.
- Dauschies A, Schnieder T, Rommel M, Bickhardt K. 1988. The effects of *Sarcocystis miescheriana* infections on blood enzymes and weight gain of stress-sensitive and stress-insensitive pigs. *Vet Parasitol.* 27, 221-229.
- Dubey JP, Speer CA, Fayer R. 1989a. *Sarcocystosis of animals and man*, Boca Raton, Florida.
- Dubey JP, Calero-Bernal R, Rosenthal BM, Speer CA, Fayer R, 2016. *Sarcocystosis of animals and humans*. 2nd Edition.
- Dubey JP, Fayer R, Speer CA. 1988. Experimental *Sarcocystis hominis* infection in cattle: lesions and ultrastructure of sarcocysts. *J Parasitol.* 74, 875-879.
- Dubey JP, Garner MM, Stetter MD, Marsh AE, Barr BC. 2001a. Acute *Sarcocystis falcatula*-like infection in a carmine bee-eater (*Merops nubicus*) and immunohistochemical cross reactivity between *Sarcocystis falcatula* and *Sarcocystis neurona*. *J Parasitol.* 87, 824-832.
- Dubey JP, Howe DK, Furr M, Saville WJ, Marsh AE, Reed SM, Grigg ME. 2015. An update on *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Vet Parasitol.* 209, 1-42.
- Dubey JP, Lindsay DS, Saville WJ, Reed SM, Granstrom DE, Speer CA. 2001b. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Vet Parasitol.* 95, 89-131.

- Dubey JP, Rosenthal BM. 2022. Bovine sarcocystosis: *Sarcocystis* species, diagnosis, prevalence, economic and public health considerations, and association of *Sarcocystis* species with eosinophilic myositis in cattle. *Int J Parasitol.*
- Dubey JP, Saville WJ, Sreekumar C, Shen SK, Lindsay OS, Pena HF, Vianna MC, Gennari SM, Reed SM. 2002. Effects of high temperature and disinfectants on the viability of *Sarcocystis neurona* sporocysts. *J Parasitol.* 88, 1252-1254.
- Dubey JP, Schares G. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol.* 140, 1-34.
- Dubey JP, Speer CA, Charleston WA. 1989b. Ultrastructural differentiation between sarcocysts of *Sarcocystis hirsuta* and *Sarcocystis hominis*. *Vet Parasitol.* 34, 153-157.
- Dubey JP, Udtujan RM, Cannon L, Lindsay DS. 1990. Condemnation of beef because of *Sarcocystis hirsuta* infection. *J Am Vet Med Assoc.* 196, 1095-1096.
- Dubey JP. 2015. Foodborne and waterborne zoonotic sarcocystosis. *Food and Waterborne Parasitology.* 1, 2-11.
- Elsheikha HM, Murphy AJ, Mansfield LS. 2005. Phylogenetic congruence of *Sarcocystis neurona* Dubey et al., 1991 (Apicomplexa: Sarcocystidae) in the United States based on sequence analysis and restriction fragment length polymorphism (RFLP). *Syst. Parasitol.* 61, 191-202.
- Esposito DH, Stich A, Epelboin L, Malvy D, Han PV, Bottieau E, da Silva A, Zanger P, Slesak G, van Genderen PJ, Rosenthal BM, Cramer JP, Visser LG, Munoz J, Drew CP, Goldsmith CS, Steiner F, Wagner N, Grobusch MP, Plier DA, Tappe D, Sotir MJ, Brown C, Brunette GW, Fayer R, von Sonnenburg F, Neumayr A, Kozarsky PE. 2014. Acute muscular sarcocystosis:

an international investigation among ill travelers returning from Tioman Island, Malaysia, 2011-2012. Clin Infect Dis. 59, 1401-1410.

- Faraway JJ. 2006. Extending the Linear Model with R. Chapman & Hall/CRC. Boca Raton, FL.

- Fayer R. 1970. *Sarcocystis*: development in cultured avian and mammalian cells. Science. 168, 1104-1105.

- Fayer R, Dubey JP. 1984. Protective immunity against clinical sarcocystosis in cattle. Vet Parasitol. 15, 187-201.

- Fayer R, Esposito DH, Dubey JP. 2015. Human infections with *Sarcocystis* species. Clin Microbiol Rev. 28, 295-311.

- Fayer R, Johnson AJ. 1975. Effect of amprolium on acute sarcocystosis in experimentally infected calves. J Parasitol. 61, 932-936.

- Fayer R. 1972. Gametogony of *Sarcocystis* sp. in cell culture. Science. 175, 65-67.

- Fayer R. 2004. *Sarcocystis* spp. in human infections. Clin Microbiol Rev. 17, 894-902, table of contents.

- Gabor M, Gabor LJ, Srivastava M, Booth M, Reece R. 2010. Chronic myositis in an Australian alpaca (*Llama pacos*) associated with *Sarcocystis* spp. J Vet Diagn Invest. 22, 966-969.

- Gazzonis AL, Gjerde B, Villa L, Minazzi S, Zanzani SA, Riccaboni P, Sironi G, Manfredi MT. 2019. Prevalence and molecular characterisation of *Sarcocystis miescheriana* and *Sarcocystis suis hominis* in wild boars (*Sus scrofa*) in Italy. Parasitol Res. 118, 1271-1287.

- Gestrich R, Heydorn AO. 1974. Survival time of *Sarcocystis* cysts in meat of slaughter animals. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 87, 475-476.
- Gjerde B. 2009. Scanning Electron Microscopy of the sarcocysts of six species of *Sarcocystis* from reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). Act Pathol Microbiol Scand. Series B: Microbiology. 94B(1-6), 309–317.
- Gjerde B. 2013. Phylogenetic relationships among *Sarcocystis* species in cervids, cattle and sheep inferred from the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. Int J Parasitol. 43, 579-591.
- Gjerde B. 2014. Molecular characterisation of *Sarcocystis rileyi* from a common eider (*Somateria mollissima*) in Norway. Parasitol Res. 113, 3501-3509.
- Gondim L, Soares R, Moré G, De Jesus R, Llano H. 2021. *Sarcocystis neurona* and related *Sarcocystis* spp. shed by opossums (*Didelphis* spp.) in South America. Rev Bra Parasitol Vet.
- Gorman TR, Alcaíno HA, Muñoz H, Cunazza C. 1984. *Sarcocystis* sp. in guanaco (*Lama guanicoe*) and effect of temperature on its viability. Vet Parasitol. 15, 95-101.
- Granstrom DE, Dubey JP, Davis SW, Fayer R, Fox JC, Poonacha KB, Giles RC, Comer PF. 1993. Equine protozoal myeloencephalitis: antigen analysis of cultured *Sarcocystis neurona* merozoites. J Vet Diagn Invest. 5, 88-90.
- Granstrom DE, Giles RC, Tuttle PA, Williams NM, Poonacha KB, Petrites Murphy MB, Tramontin RR, Swerczek TW, Hong CB, Rezabek GB, Lyons ET, Drudge JH. 1991. Immunohistochemical diagnosis of protozoan parasites in lesions of equine protozoal myeloencephalitis. J Vet Diagn Invest. 3, 75-77.

- Granstrom DE, Ridley RK, Baoan Y, Gershwin LJ. 1990a. Immunodominant proteins of *Sarcocystis cruzi* bradyzoites isolated from cattle affected or nonaffected with eosinophilic myositis. Am J Vet Res. 51, 1151-1155.
- Granstrom DE, Ridley RK, Baoan Y, Gershwin LJ. 1990b. Immunodominant proteins of *Sarcocystis cruzi* bradyzoites isolated from cattle affected or nonaffected with eosinophilic myositis. Am J Vet Res. 51, 1151-1155.
- Hafeez S, Abbas M, Khan ZH, Rehman E. 2011. Preliminary analysis of the diet of wild boar (*Sus scrofa* L., 1758) in Islamabad, Pakistan. Turk J Zoo. 35:115–118.
- Heydorn AO. 1977. [Life-cycle of Sarcosporidia. IX. Developmental cyclus of *Sarcocystis suihominis* n. spec]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 90(11), 218–224.
- Heydorn AO, Rommel M. 1972. [The life cycle of Sarcosporidia. II. Dogs and cats as transmitters of bovine sarcosporidia]. Berliner und Muenchener Tieraerztliche Wochenschrift. 85, 121-123.
- Hu JJ, Wen T, Chen XW, Liu TT, Esch GW, Huang S. 2016. Prevalance, Morphology, and Molecular Characterization of *Sarcocystis heydorni* Sarcocysts from Cattle (*Bos Taurus*) in China. J Parasitol. 102, 545-548.
- Huang Z, Ye Y, Zhang H, Deng S, Tao J, Hu J, Yang Y. 2019. Morphological and molecular characterizations of *Sarcocystis miescheriana* and *Sarcocystis suihominis* in domestic pigs (*Sus scrofa*) in China. Parasitol Res. 118, 3491-3496.
- Imes GD, Migaki G. 1967. Eosinophilic myositis in cattle-pathology and incidence. Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc. 71, 111-122.

- Imre K, Darabus G, Tirziu E, Morariu S, Imre M, Plutzer J, Boldea MV, Morar A. 2019. *Sarcocystis* spp. in Romanian Slaughtered Cattle: Molecular Characterization and Epidemiological Significance of the Findings. Biomed Res Int.
- Imre K, Sala C, Morar A, Imre M, Ciontu C, Chisalita I, Dudu A, Matei M, Darabus G. 2017. Occurrence and first molecular characterization of *Sarcocystis* spp. in wild boars (*Sus scrofa*) and domestic pigs (*Sus scrofa domesticus*) in Romania: Public health significance of the isolates. Acta Trop. 167, 191-195.
- Januskevicius V, Januskeviciene G, Prakas P, Butkauskas D, Petkevičius S. 2019. Prevalence and intensity of *Sarcocystis* spp. infection in animals slaughtered for food in Lithuania. Vet med. 64(4), 149-157.
- Jensen R, Alexander AF, Dahlgren RR, Jolley WR, Marquardt WC, Flack DE, Bennett BW, Cox MF, Harris CW, Hoffmann GA. 1986. Eosinophilic myositis and muscular sarcocystosis in the carcasses of slaughtered cattle and lambs. Am J Vet Res. 47, 587-593.
- Kaur M, Singh BB, Sharma R, Gill JP. 2016. Pervasive Environmental Contamination with Human Feces Results in High Prevalence of Zoonotic *Sarcocystis* Infection in Pigs in the Punjab, India. J Parasitol. 102, 229-232.
- Khieu V, Marti H, Chhay S, Char MC, Muth S, Odermatt P. 2017. First report of human intestinal sarcocystosis in Cambodia. Parasitol Int. 66, 560-562.
- Kia EB, Mirhendi H, Rezaeian M, Zahabiun F, Sharbatkhori M. 2011. First molecular identification of *Sarcocystis miescheriana* (Protozoa, Apicomplexa) from wild boar (*Sus scrofa*) in Iran. Exp Parasitol. 127, 724-726.

- Koudela B, Steinhauser L. 1984. Evaluation of vitality of sarcocysts in beef by the DAPI fluorescence test. *Acta Vet. Brno.* 53, 193-197.
- La Perle KM, Silveria F, Anderson DE, Blomme EA. 1999. Dalmeny disease in an alpaca (*Lama pacos*): sarcocystosis, eosinophilic myositis and abortion. *J Comp Pathol.* 121, 287-293.
- Lapointe JM, Pdraig DJ, Marsh AE, Gulland FM, Barr BC, Naydan DK, King DP, Farman CA, Huntingdon KA, Lowenstine LJ. 1998. Meningoencephalitis due to a *Sarcocystis neurona*-like protozoan in pacific harbor seals (*Phoca vitulina richardsi*). *J Parasitol.* 84, 1184– 1189.
- Lau YL, Chang PY, Tan CT, Fong MY, Mahmud R, Wong KT. 2014. *Sarcocystis nesbitti* infection in human skeletal muscle: possible transmission from snakes. *Am J Trop Med Hyg.* 90, 361-364.
- Leek RG, Fayer R. 1980. Amprolium for prophylaxis of ovine *Sarcocystis*. *J Parasitol.* 66, 100-106.
- Leek RG, Fayer R. 1983. Experimental *Sarcocystis ovis* infection in lambs: salinomycin chemoprophylaxis and protective immunity. *J Parasitol.* 69, 271-276.
- Leguia G. 1991. The epidemiology and economic impact of llama parasites. *Parasitol T.* 7, 54-56.
- Ligges U, Crawley MJ. 2007. *The R Book.* Stat Papers.
- Lindsay DS, Blagburn B, Braund KG. 1995. *Sarcocystis* spp. and Sarcocystosis. *BasicAppl Myol.* 5, 249-254.

- Lucas JR, Barrios-Arpi M, Rodríguez J, Balcázar Nakamatsu S, Zarría J, Namiyama G, Taniwaki N, Gonzales-Viera O. 2019. Ultrastructural Description of *Sarcocystis* Sp. in Cardiac Muscle of Naturally Infected Alpacas (*Vicugna pacos*). Iran J Parasitol. 14, 174-179.
- Lucas Lopez J. 2013. Sarcocistosis como problema de salud pública. Per J Parasitol. 21, 20-31.
- Ludvik J. 1960. The electron microscopy of *Sarcocystis miescheriana* Kuhn 1865. J Protozool. 7(2), 128-135.
- MacKay RJ. 1997. Equine protozoal myeloencephalitis. Vet Clin North Am Equine Pract. 13, 79-96.
- Mandour AM. 1969. *Sarcocystis nesbitti* n. sp. from the rhesus monkey. J Protozool. 16, 353-354.
- Masri MD, Alda JL, Dubey JP. 1992. *Sarcocystis neurona*-associated ataxia in horses in Brazil. Vet Parasitol. 44, 311-314.
- Mehlhorn H, Heydorn AO. 1978. Light and electron microscopic studies of *Sarcocystis suihominis*. The development of cysts in experimentally infected pigs. Zentralbl Bakteriologie Orig A. 239, 124-139.
- Mehlhorn H, Heydorn AO. 1978. The Sarcosporidia (Protozoa, Sporozoa): Life cycle and fine structure. Adv Parasitol. 16, 43-92.
- Meshkov S. 1980. The jackal (*Canis aureus*) as a new host of *Sarcocystis* infecting swine. Vet Sb. 78, 20-21.

- Moré G, Bacigalupe D, Basso W, Rambeaud M, Venturini MC, Venturini L. 2010. Serologic profiles for *Sarcocystis* sp. and *Neospora caninum* and productive performance in naturally infected beef calves. *Parasitol Res.* 106, 689-693.
- Moré G, Bacigalupe D, Basso W, Rambeaud M, Beltrame F, Ramirez B, Venturini MC, Venturini L. 2009. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. *Vet Parasitol.* 160(1-2), 51-54.
- Moré G, Basso W, Bacigalupe D, Venturini MC, Venturini L. 2008. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. *Parasitol Res.* 102, 671-675.
- Moré G, Regensburger C, Abrahamovich P, Jurado S, Bacigalupe D, Marin JC, Rambeaud M, Venturini L, Venturini MC. 2011. Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. *Vet Parasitol.* 177, 162-165.
- Moré G, Regensburger C, Gos ML, Pardini L, Verma SK, Ctibor J, Serrano-Martinez ME, Dubey JP, Venturini MC. 2016. *Sarcocystis masoni*, n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae), and redescription of *Sarcocystis aucheniae* from llama (*Lama glama*), guanaco (*Lama guanicoe*) and alpaca (*Vicugna pacos*). *Parasitol.* 143, 617-626.
- Moré G, Schares S, Maksimov A, Conraths FJ, Venturini MC, Schares G. 2013. Development of a multiplex real time PCR to differentiate *Sarcocystis* spp. affecting cattle. *Vet Parasitol.* 197, 85-94.
- Moré G, Vissani A, Pardini L, Monina M, Muriel M, Howe D, Barrandeguy M, Venturini MC. 2014. Seroprevalence of *Sarcocystis neurona* and Its Association With Neurologic Disorders in Argentinean Horses. *Journal of Equine Vet Sci.* 34, 1051-1054.

- Noh JW, Jang DH, Kang YB, Jang H, Wee SH. 1988. Effects of temperature on viability of sarcocysts of *Sarcocystis cruzi* in cardiac muscle of cattle. Korean J Vet Publ Health. 12, 151-155.
- Odening K. 1998. The present state of species-systematics in *Sarcocystis* Lankester, 1882 (Protista, Sporozoa, Coccidia). Syst Parasitol. 41(3), 209-233.
- Pena HF, Ogassawara S, Sinhorini IL. 2001. Occurrence of cattle *Sarcocystis* species in raw kibbe from Arabian food establishments in the city of São Paulo, Brazil, and experimental transmission to humans. J Parasitol. 87, 1459-1465.
- Pereira A, Bermejo M. 1988. Prevalence of *Sarcocystis* cysts in pigs and sheep in Spain. Vet Parasitol. 27(3-4):353-5.
- Perfumo JC, Quiroga MA, Machuca MA. 2019. Compendio de clínica y sanidad de los cerdos: De la granja al laboratorio. EDULP, FCV - UNLP.
- Poulsen CS, Stensvold CR. 2014. Current status of epidemiology and diagnosis of human sarcocystosis. J Clin Microbiol. 52, 3524-3530.
- Prakas P, Kirillova V, Dzerkale A, Kirjusina M, Butkauskas D, Gavarane I, Rudaityte-Lukosiene E, Sulinskas G. 2020. First molecular characterization of *Sarcocystis miescheriana* in wild boars (*Sus scrofa*) from Latvia. Parasitol Res. 119, 3777-3783.
- Prakas P, Moskaliova D, Sneideris D, Juozaityte-Ngugu E, Maziliauskaite E, Svazas S, Butkauskas D. 2023. Molecular Identification of *Sarcocystis rileyi* and *Sarcocystis* sp. (Closely Related to *Sarcocystis wenzeli*) in Intestines of Mustelids from Lithuania. Animals (Basel) 13.

- Prakas P, Rudaitytė-Lukošienė E, Šneideris D, Butkauskas D. 2021. Invasive American mink (*Neovison vison*) as potential definitive host of *Sarcocystis elongata*, *S. entzerothi*, *S. japonica*, *S. truncata* and *S. silva* using different cervid species as intermediate hosts. *Parasitol Res.* 120, 2243-2250.
- Prakas P, Butkauskas D, Svazas S, Stanevicius V. 2018. Morphological and genetic characterisation of *Sarcocystis halioti* from the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*). *Parasitol Res.* 117, 3663-3667.
- Prestwood AK, Cahoon RW, McDaniel HT. 1980. *Sarcocystis* infections in Georgia swine. *Am J Vet Res.* 41, 1879-1881.
- Pritt B, Trainer T, Simmons-Arnold L, Evans M, Dunams D, Rosenthal BM. 2008. Detection of *Sarcocystis* parasites in retail beef: a regional survey combining histological and genetic detection methods. *J Food Prot.* 71, 2144-2147.
- Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin MD. 1995. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos (AFIP). Whashington DC.
- Reed SM, Furr M, Howe DK, Johnson AL, MacKay RJ, Marrw JK, Pusterla N, Witonsky S. 2016. Equine Protozoal Myeloencephalitis: An Updated Consensus Statement with a Focus on Parasite Biology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *J Vet Intern Med.* 30, 491-502.
- Regensburger CD, Gos ML, Ctibor J, Moré G. 2015. Morphological and Molecular Characteristics of *Sarcocystis aucheniae* Isolated from Meat of Guanaco (*Lama guanicoe*). *J Food Qual Haz Cont* 2.

- Reiner G, Eckert J, Peischl T, Bochert S, Jakel T, Mackenstedt U, Joachim A, Dauschies A, Geldermann H. 2002. Variation in clinical and parasitological traits in Pietrain and Meishan pigs infected with *Sarcocystis miescheriana*. *Vet Parasitol.* 106, 99-113.
- Reiner G, Hepp S, Hertrampf B, Kliemt D, Mackenstedt U, Dauschies A, Zahner H. 2007a. Genetic resistance to *Sarcocystis miescheriana* in pigs following experimental infection. *Vet Parasitol.* 145, 2-10.
- Reiner G, Kliemt D, Willems H, Berge T, Fischer R, Kohler F, Hepp S, Hertrampf B, Dauschies A, Geldermann H, Mackenstedt U, Zahner H. 2007b. Mapping of quantitative trait loci affecting resistance/susceptibility to *Sarcocystis miescheriana* in swine. *Genomics.* 89, 638-646.
- Robertson LJ, Clark CG, Debenham JJ, Dubey JP, Kváč M, Li J, Ponce-Gordo F, Ryan U, Schares G, Su C, Tsaousis AD. 2019. Are molecular tools clarifying or confusing our understanding of the public health threat from zoonotic enteric protozoa in wildlife? *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 9, 323-341.
- Rodriguez A, Quispe-Solano M, Rodriguez JL, Lucas JR. 2023. The occurrence of *Sarcocystis* spp. in the myocardium of alpacas (*Vicugna pacos*) with associated risk factors in the Peruvian Andes. *Trop Anim Health Prod.* 55, 66.
- Román A, Lukešová D, Novak P, Zizlavsky M. 2006. Biosecurity in Pig Breeding Herds *Agricultura Tropica et Subtropica.* 39: 120-123.
- Rosell C, Fernández-Llario P, Herrero J. 2001. El jabalí (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758). *Galemys.* 13: 1–25.
- Rosenthal BM. 2021. Zoonotic *Sarcocystis*. *Res Vet Sci.* 136, 151-157.

- Rosenthal BM. 2001. Defining and interpreting intraspecific molecular variation. *Vet Parasitol.* 101(3-4), 187–200.
- Rosenthal BM. 2020. In: *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases.* 10th Edition. Elsevier. 821-824.
- Rossano MG, Mansfield LS, Kaneene JB, Murphy AJ, Brown CM, Schott HC, Fox JC. 2000. Improvement of Western Blot Test Specificity for Detecting Equine Serum Antibodies to *Sarcocystis Neurona*. *J Vet Diag Inv.* 12(1), 28-32.
- Rubiola S, Civera T, Ferroglio E, Zanet S, Zaccaria T, Brossa S, Cipriani R, Chiesa F. 2020. Molecular differentiation of cattle *Sarcocystis* spp. by multiplex PCR targeting 18S and COI genes following identification of *Sarcocystis hominis* in human stool samples. *Food Waterborne Parasitol.* 18, e00074.
- Saeed MA, Rashid MH, Vaughan J, Jabbar A. 2018. Sarcocystosis in South American camelids: The state of play revisited. *Parasit Vectors.* 11, 146.
- Saito M, Mizusawa K, Itagaki H. 1993. Chronic *Sarcocystis* infections in slaughtered cattle. *J Vet Med Sci.* 55, 757-761.
- Saito M, Shibata Y, Ohno A, Kubo M, Shimura K, Itagaki H. 1998. *Sarcocystis sui hominis* detected for the first time from pigs in Japan. *J Vet Med Sci.* 60, 307-309.
- Saleque A, Juyal PD, Bhatia BB. 1990. Effect of temperature on the infectivity of *Sarcocystis meischeriana* cysts in pork. *Vet Parasitol.* 36, 343-346.
- Schley L, Roper T. 2003. Diet of wild boar *Sus scrofa* in Western Europe, with particular reference to consumption of agricultural crops. *Mammal Review.* 33. 43 - 56.

- Shahari S, Tengku-Idris TI, Fong MY, Lau YL. 2016. Molecular evidence of *Sarcocystis nesbitti* in water samples of Tioman Island, Malaysia. *Parasit Vectors*. 9, 598.
- Shams M, Shamsi L, Asghari A, Motazedian MH, Mohammadi-Ghalehbin B, Omidian M, Nazari N, Sadrebazzaz A. 2022. Molecular epidemiology, species distribution, and zoonotic importance of the neglected meat-borne pathogen *Sarcocystis* spp. in cattle (*Bos taurus*): a global systematic review and meta-analysis. *Acta parasitol*. 67, 1055-1072.
- Simpson CF, Forrester DJ. 1973. Electron microscopy of *Sarcocystis* sp.: cyst wall, micropore, rhoptries, and an unidentified body. *Int J Parasitol*. 3, 467-470.
- Singh BB, Sharma R, Sharma JK, Juyal PD. 2010. Parasitic zoonoses in India: an overview. *Rev Sci Tech*. 29(3) 629-37.
- Srolte M, Bockhardt I, Odening K. 1996. A comparative scanning electron microscopic study of the cyst wall in 11 *Sarcocystis* species of mammals. *J Zoo*. 239(4), 821–832.
- Stojceki K, Karamon J, Sroka J, Cencek T. 2012. Molecular diagnostics of *Sarcocystis* spp. infections. *Pol J Vet Sci*. 15, 589-596.
- Tadros W, Laarman JJ. 1982. Current concepts on the biology, evolution and taxonomy of tissue cyst-forming eimeriid coccidia. *Adv Parasitol*. 20, 293-468.
- Tanhauser SM, Cheadle MA, Massey ET, Mayer BA, Schroedter DE, Dame JB, Greiner EC, MacKay RJ. 2001. The nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) is naturally infected with *Sarcocystis neurona*. *Int J Parasitol*. 31, 325-329.
- Taylor M, Boes J, Boireau P, Boué F, Claes M, Cook A, Dorny P, Enemark H, Giessen J, Hunt K, Howell M, Kirjushina M, Nöckler K, Pozio E, Rossi P, Snow L, Theodoropoulos G,

Vieira-Pinto M, Zimmer IA. 2010. Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of *Sarcocystis* in animals and foodstuffs in the European Union. EFSA Supporting Publications. 7.

- R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- Rosell C, Fernández-Llario P, Herrero J. 2001. El jabalí (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758). Galemys. 13: 1–25.

- Tungtrongchitr A, Chiworaporn C, Praewanich R, Radomyos P, Boitano JJ. 2007. The potential usefulness of the modified Kato thick smear technique in the detection of intestinal sarcocystosis during field surveys. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 38(2), 232-238.

- Uggla A, Buxton D. 1990. Immune responses against *Toxoplasma* and *Sarcocystis* infections in ruminants: diagnosis and prospects for vaccination. Rev Sci Tech. 9(2), 441-462.

- Vangeel L, Houf K, Geldhof P, De Preter K, Vercruyse J, Ducatelle R, Chiers K. 2013. Different *Sarcocystis* spp. are present in bovine eosinophilic myositis. Vet Parasitol. 197, 543-548.

- Voigt WP, Heydorn AO. 1981. Chemotherapy of Sarcosporidiosis and theileriosis in domestic animals. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A Med Mikrobiol Infekt Parasitol. 250, 256-259.

- Weber M, Weyreter H, O'Donoghue PJ, Rommel M, Trautwein G. 1983. Persistence of acquired immunity to *Sarcocystis miescheriana* infection in growing pigs. *Vet Parasitol.* 13, 287-297.
- Wilairatana P, Radomyos P, Radomyos B, Phraevanich R, Plooksawasdi W, Chanthavanich P, Chaisin V, Looareesuwan S. 1996. Intestinal sarcocystosis in Thai laborers. *South Asian Trop Med Pub H.* 27, 43-46.
- Wilcox JT, Van Vuren DH. 2009. Wild pigs as predators in oak woodlands of California. *J Mamm.* 90:114–118
- Wu Z, Sun J, Hu J, Song J, Deng S, Zhu N, Yang Y, Tao J. 2022. Morphological and Molecular Characterization, and Demonstration of a Definitive Host, for *Sarcocystis masoni* from an Alpaca (*Vicugna pacos*) in China. *Biology (Basel).* 11.
- Xiang Z, Chen X, Yang L, He Y, Jiang R, Rosenthal BM, Luan P, Attwood SW, Zuo Y, Zhang YP, Yang Z. 2009. Non-invasive methods for identifying oocysts of *Sarcocystis* spp. from definitive hosts. *Parasitol Int.* 58, 293-296.
- Yang Y, Dong H, Su R, Wang Y, Wang R, Jiang Y, Tong Z. 2018. High prevalence of *Sarcocystis* spp. infections in cattle (*Bos taurus*) from central China. *Parasitol Int.* 67, 800-804.
- Yang ZQ, Li QQ, Zuo YQ, Chen XW, Chen JY, Nie L, Wei CW, Zen JS, Attwood SW, Zhang XZ, Zhang YP. 2002. Characterization of *Sarcocystis* species in domestic animals using a PCR-RFLP analysis of variation in the 18S rRNA gene: a cost-effective and simple technique for routine species identification. *Exp Parasitol.* 102(3-4), 212–217.

- Yu S. 1991. Field survey of *Sarcocystis* infection in the Tibet autonomous region. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. 13, 29-32.
- Zainalabidin FA, Noorazmi MS, Bakri WN, Sathaya G, Ismail MI. 2017. Prevalence of Muscular Sarcosporidiosis in Slaughtered Domestic Pigs in Perak, Peninsular Malaysia. Trop Life Sci Res. 28(1), 161-166.