

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias e Ingenierías Biológicas y Químicas

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia



**Estudios moleculares del curso de la infección en sangre de alpacas
(*Vicugna pacos*) por el protozoo *Sarcocystis aucheniae***

Tesis presentada por la Bachiller:

Neyra Paredes, Luisa Alejandra

ORCID: 0009-0003-1011-3308

para optar el Título Profesional de Médico Veterinario y Zootecnista

Asesor:

Dr. Reátegui Ordoñez, Juan Eduardo

ORCID: 0000-0001-6359-3999

Arequipa – Perú

2025

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 28 de Enero del 2025

Dictamen: 009812-C-EPMVZ-2025

Visto el borrador del expediente 009812, presentado por:

2018223852 - NEYRA PAREDES LUISA ALEJANDRA

Titulado:

ESTUDIOS MOLECULARES DEL CURSO DE LA INFECCIÓN EN SANGRE DE ALPACAS (VICUGNA PACOS) POR EL PROTOZOO SARCOCYSTIS AUCHENIAE

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

**29470814 - ZEGARRA PAREDES JORGE LUIS
DICTAMINADOR**



**29327492 - VALDEZ NUÑEZ VERONICA ROCIO
DICTAMINADOR**



**40688434 - AGUILAR BRAVO HERBERT MISHAEF
DICTAMINADOR**



Estudios moleculares del curso de la infección en sangre de alpacas (*Vicugna pacos*) por el protozoo *Sarcocystis aucheniae*

INFORME DE ORIGINALIDAD

19%	18%	5%	5%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorioubasib.uba.ar Fuente de Internet	3%
2	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	3%
3	repositorio.unc.edu.pe Fuente de Internet	2%
4	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
5	www.elsevier.es Fuente de Internet	1%
6	www.redalyc.org Fuente de Internet	1%
7	repositorio.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
8	ri.agro.uba.ar Fuente de Internet	<1%
9	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	<1%
10	GASTÓN MORÉ, CRISTIAN REGENSBURGER, M. LAURA GOS, LAIS PARDINI, SHIV K. VERMA, JULIANA CTIBOR, MARCOS ENRIQUE	<1%

DEDICATORIAS

*Para mis papás, Luis y Kelly, por su incansable e
incommensurable apoyo toda mi vida.*

*Para mis hermanas, Gigi y Kelly, por cuidarme y
aconsejarme desde pequeña.*

*Para mi compañero de risas, Carlos, por su cariño
sublime y ser mi fuente de inspiración.*

*Para mi abuelo, Félix, por acompañarme en los
desvelos de mi carrera universitaria.*

*Para mi Naky, quien me reconforta cada día con su
existencia.*

Con mucho amor, les dedico esta investigación.

W.W.

AGRADECIMIENTOS

A las doctoras Mónica Jacobsen y Susana Giuliano, quienes con su guía, paciencia, sabiduría, consejos y enseñanzas hicieron posible este trabajo.

Al vicerrectorado de investigación y a PROCIENCIA, que con el proyecto PE501079385-2022-PROCIENCIA “Estudios Moleculares e Histopatológicos de la Infestación por Sarcocystis aucheniae en Llamas (Lama glama) y Alpacas (Vicugna pacos), se obtuvo el financiamiento para la realización de esta investigación.

A mi asesor, Dr. Juan Reátegui y a la dra. Ximena Barriga, por su compromiso y gestión. A mis compañeros de equipo, Dr. César y Kelly, con quienes compartí largos meses en el laboratorio y en el campo, aprendí todos los días de ellos.

Al Dr. Jose Luis Málaga, por su orientación y vasto conocimiento.

Al Dr. Gonzalo Málaga, por su comprensión, apoyo y propiciar mi crecimiento profesional y personal.

Al equipo del centro CEDAT de DESCOSUR por permitirme trabajar en sus instalaciones y compartir junto con las alpacas.

A los jurados, Dr. Jorge Luis Zegarra, Dra. Verónica Valdez y Dr. Herbert Aguilar por sus aportes y contribuciones en el desarrollo de esta investigación.

Y a todo aquel que, de manera directa o indirecta, contribuyó en el desarrollo y ejecución.

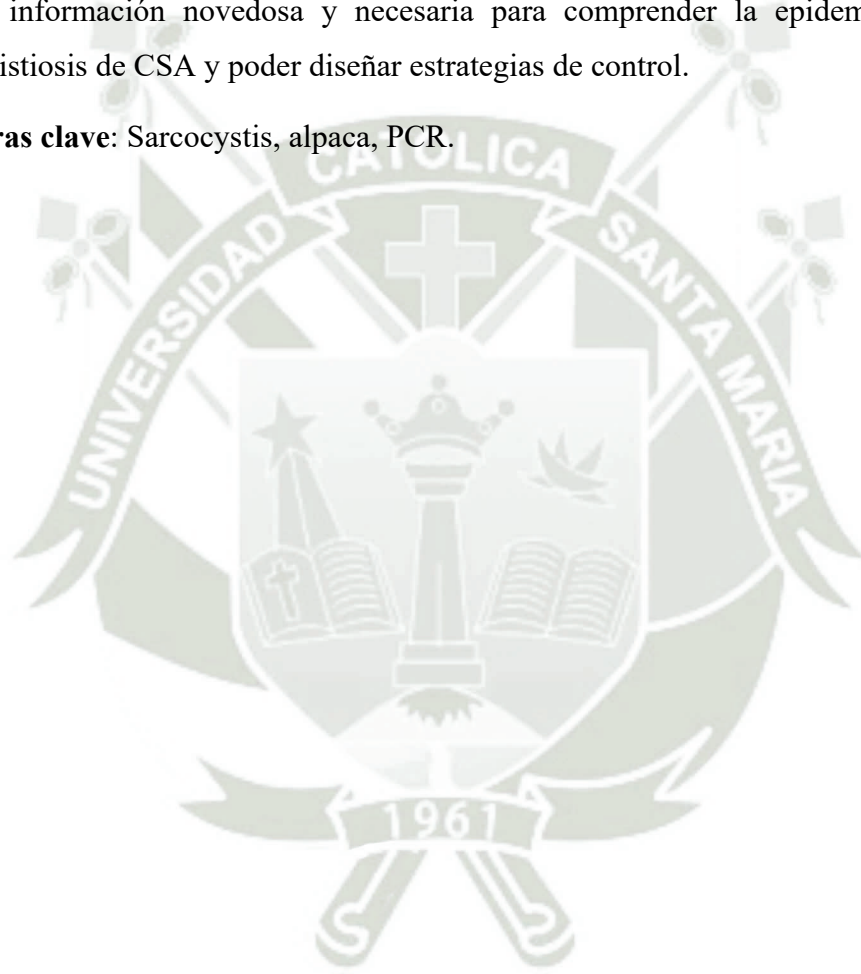
Mi más sincero agradecimiento a ustedes ya que esto no se hubiera materializado sin su presencia e intervención.

RESUMEN

El protozooario *Sarcocystis aucheniae* es responsable de la Sarcocistiosis en CS (Camélidos sudamericanos) que genera quistes predominantemente ovalados en musculatura esquelética. Debido a que no presenta signos específicos, no se puede diagnosticar de manera clínica, sino mediante la visualización directa de los quistes post-mortem, siendo responsable de decomiso entre el 60 al 80 % de carne de alpaca. Al no contar con antiparasitarios eficaces que impidan el contagio y la alta prevalencia existente, el primer paso para lograr medidas de control es conocer de manera más exacta el ciclo de vida del parásito. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal la evaluación periódica de la presencia de ADN de *Sarcocystis aucheniae* en muestras de sangre de alpacas (*Vicugna pacos*). Para ello, se eligieron al azar 38 animales machos reproductores clínicamente sanos mayores a 2 años de edad del centro de desarrollo alpaquero de Tocra (CEDAT) del Centro de Estudios y Promoción del Desarrollo del Sur (DESCOSUR), en el distrito de Yanque – Caylloma – Arequipa a 4400msnm. De cada animal se recolectó una muestra sanguínea de la vena yugular de manera mensual logrando, durante el periodo julio 2023 a abril 2024, un total de 281 muestras sanguíneas. Se extrajo el ADN de las muestras sanguíneas obtenidas, seguidamente se realizó una PCR semi-anidada dúplex y los productos de amplificación se observaron mediante luz UV en un transiluminador. En la PCR se utilizaron primers que tuvieron como diana la detección de un fragmento del gen ARNr 18S del parásito *S. aucheniae* y otros para el gen mitocondrial ARNr 16S de CS como control de extracción. Se determinó la sensibilidad analítica de esta técnica mediante diluciones seriadas de ADN genómico de sarcoquistes, pudiendo detectarse hasta 0.46 pg por 13 μ L de reacción. Los datos cualitativos fueron analizados mediante distribución de frecuencias, reportando frecuencia observada, relativa y porcentual. La significancia de los datos se evaluó con un $\alpha=0,05$ mediante la prueba de probabilidad exacta de Fisher. Mediante el coeficiente de correlación lineal de Pearson (r) se relacionó temperatura media máxima y precipitaciones pluviales con la cantidad y porcentaje de animales positivos. La frecuencia porcentual de animales que presentan ADN de *Sarcocystis aucheniae* en muestras de sangre fue del 24% y se determinó que no existe relación significativa ($p > 0,05$) entre la presencia de ADN de *S. aucheniae* y la edad del hospedador. El mes donde hubo mayor incidencia de positivos fue julio 2023, sin embargo, no se observó dependencia entre el porcentaje de detección y las condiciones climáticas, tales como

temperatura media máxima y precipitaciones pluviales. Bajo las condiciones utilizadas, se observó que la parasitemia duró 30 días o menos, pero en dos casos alcanzó los 60 días. Finalmente, una alpaca mostró una fluctuación siendo positiva un mes, luego negativa dos meses y positiva nuevamente los dos meses subsiguientes. Se concluye que: (1) hay circulación de *S. aucheniae* en la región estudiada; (2) la detección de la parasitemia a lo largo del tiempo es transitoria, y (3) la parasitemia puede fluctuar, ya sea por recirculación del parásito en un animal infectado o por reinfección. Esta investigación aporta información novedosa y necesaria para comprender la epidemiología de la Sarcocistiosis de CSA y poder diseñar estrategias de control.

Palabras clave: Sarcocystis, alpaca, PCR.



ABSTRACT

The protozoan *S. aucheniae* is responsible for sarcocystosis in SAC (South American camelids), which generates predominantly oval cysts in skeletal muscle. Due the absence of specific signs, it cannot be diagnosed clinically, but rather through post-mortem direct visualization of the cyst, which is responsible for the seizure of 60 to 80% of alpaca meat. Due to the lack of effective antiparasitics to prevent transmission and the high prevalence present, the first step to achieving control measures is to gain a more precise understanding of the parasite's life cycle. The main objective of this research work was the periodic evaluation of the presence of DNA of *Sarcocystis aucheniae* through molecular detection in blood samples from alpacas (*Vicugna pacos*). For that, they selected 38 clinically healthy male breeding animals older than 2 years of age at the Toca Alpaca Development Center (CEDAT) of the South Center for Studies and Promotion of Development (DESCOSUR), in the district of Yanque – Caylloma – Arequipa at an altitude of 4400 meters above sea level. A blood sample was collected from the jugular vein of each animal on a monthly basis, obtaining a total of 281 blood samples during the period from July 2023 to April 2024. DNA was extracted from the blood samples obtained, then a semi-nested duplex PCR was performed and the amplification products were observed using UV light on a transilluminator. In the PCR, primers were used that targeted the detection of a fragment of the 18S rRNA gene of the parasite *S. aucheniae* and others for the mitochondrial gene 16S rRNA of SAC as an extraction control. The analytical sensitivity of this technique was determined using serial dilutions of genomic DNA from sarcocysts and was detected up to 0.46pg per 13 μ l of reaction. Qualitative data were analyzed using frequency distribution, reporting observed, relative and percentage frequencies. The significance of the data was evaluated with $\alpha=0.05$ using Fisher's exact probability test. Using Pearson's linear correlation coefficient (r), the maximum average temperature and rainfall were related to the number and percentage of positive animals. The percentage frequency of animals presenting *Sarcocystis aucheniae* DNA in blood samples was 24% and it was determined that there is no significant relationship ($p > 0.05$) between the presence of *S. aucheniae* DNA and the age of the host. The month with the highest incidence of positives was July 2023; however, there is no dependence between the detection percentage and the weather conditions, such as average maximum temperature and rainfall. Under the conditions used, it was observed that the parasitemia lasts 30 days or less, but in two cases it reached 60 days. Finally, one alpaca

showed a fluctuation, being positive one month, then negative two months, and positive again the following two months. It is concluded that: (1) *S. aucheniae* is circulating in the studied region; (2) the detection of parasitemia over time is transient, and (3) parasitemia can fluctuate, either by parasite's recirculation in an infected animal or by reinfection. This research provides novel and necessary information to understand the epidemiology of CSA sarcocystiosis and to be able to design control strategies.

Keywords: Sarcocystis, alpaca, PCR.



ÍNDICE

DEDICATORIAS

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN 1

CAPITULO I..... 2

1. PLANTEAMIENTO TEÓRICO 3

1.1. Enunciado del Problema..... 3

1.2. Descripción del problema..... 3

1.3. Justificación del trabajo..... 4

1.3.1. Aspecto general..... 4

1.3.2. Aspecto tecnológico..... 4

1.3.3. Aspecto social 5

1.3.4. Aspecto económico..... 5

1.3.5. Importancia 5

1.4. Objetivos 6

1.4.1. Objetivos generales..... 6

1.4.2. Objetivos específicos 6

1.5. Hipótesis..... 6

CAPITULO II..... 7

2. MARCO TEÓRICO 8

2.1. Análisis bibliográfico 8

2.1.1. Camélidos sudamericanos..... 8

2.1.2. Carne de CSD 9

2.1.3. Etiología..... 12

2.1.3.1. Taxonomía..... 12

2.1.3.2. Morfología..... 16

2.1.3.3. Ciclo biológico..... 20

2.1.4. Epidemiología..... 22

2.1.5.	Lesiones	22
2.1.6.	Diagnóstico	23
2.1.7.	Obtención de ADN de muestras sanguíneas.....	24
2.1.8.	Gen 18S.....	25
2.1.9.	ARNr 16S.....	25
2.1.10.	PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	26
2.1.10.1.	Nested PCR o PCR anidada	29
2.1.10.2.	Seminested PCR o PCR semi-anidada.....	29
2.1.10.3.	PCR transcripción reversa (RT-PCR)	29
2.1.10.4.	PCR múltiple	29
2.1.11.	Electroforesis en geles de agarosa	30
2.2.	Antecedentes de investigación	31
2.2.1.	Análisis de tesis.....	32
2.2.2.	Análisis de trabajos de investigación.....	33
<i>CAPITULO III</i>		37
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1.	Materiales	38
3.1.1.	Localización del trabajo	38
3.1.1.1.	Espacial	38
3.1.1.2.	Temporal	38
3.1.2.	Materiales biológicos	38
3.1.3.	Materiales de laboratorio	38
3.1.3.1.	Para extracción de ADN.....	38
3.1.3.2.	Para PCR	40
3.1.3.3.	Para electroforesis	43
3.1.3.4.	Para visualización de geles de agarosa.....	45
3.1.4.	Materiales de campo	46
3.1.4.1.	Extracción de muestras sanguíneas.....	46
3.1.5.	Equipos y maquinarias	46
3.1.6.	Otros materiales	46
3.1.7.	Indumentaria y equipo de protección personal	47
3.2.	Métodos.....	47
3.2.1.	Muestreo	47

3.2.1.1. Universo	47
3.2.1.2. Tamaño de muestra	47
3.2.1.3. Procedimiento de muestreo	48
3.2.1.3.1. Toma de muestras sanguíneas	48
3.2.2.1.1. Almacenamiento de las muestras	57
3.2.2. Métodos de evaluación	58
3.2.2.1. Metodología de la experimentación	58
3.2.2.1.1. Extracción de ADN.....	58
3.2.2.1.2. Medición de la concentración de ADN y su grado de pureza	69
3.2.2.1.3. Pruebas previas al análisis de muestras de sangre	71
3.2.2.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	73
3.2.2.1.5. Preparación de geles de agarosa	81
3.2.2.1.6. Electroforesis	85
3.2.2.1.7. Visualización	89
3.2.2.2. Metodología de análisis.....	90
3.2.2.2.1. Correlación lineal entre 2 variables	90
3.2.2.2.2. Estadística no paramétrica	94
3.2.2.3. Recopilación de la información.....	96
3.2.2.3.1. En el campo	96
3.2.2.3.2. En el laboratorio	96
3.2.2.3.3. En la biblioteca	96
3.2.2.3.4. En otros ambientes generadores de la información científica	97
3.3. Variables de respuesta.....	97
3.3.1. Variables independientes o conocidas	97
3.3.2. Variables dependientes o de predicción.....	97
3.3.3. Cuadro de observaciones a registra.....	97
3.4. Evaluación estadística	98
3.4.1. Diseño Experimental.....	98
3.4.1.1. Unidades experimentales.....	98
3.4.1.2. Análisis estadístico	98
3.4.1.2.1. Análisis de varianza	98
3.4.1.2.2. Análisis de significancia	98
<i>CAPITULO IV</i>	99

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	100
4.1.	Resultados	100
4.1.1.	Resultados de geles de agarosa de pruebas de puesta a punto	100
4.1.2.	Fluctuaciones de la presencia de ADN de <i>S. aucheniae</i> determinado por PCR 105	
4.1.2.1.	Fluctuación individual de alpacas en el tiempo que fueron positivas a ADN de <i>S. aucheniae</i> en algún momento del estudio	106
4.1.3.	Estadística	110
4.1.3.1.	Correlación lineal entre temperatura máxima media y los animales positivos 113	
4.1.3.2.	Correlación lineal entre temperatura máxima media y el porcentaje de Animales positivos.....	114
4.1.3.3.	Correlación lineal entre precipitaciones pluviales y Animales positivos 115	
4.1.3.4.	Correlación lineal entre precipitaciones pluviales y porcentaje de Animales positivos.....	116
4.1.4.	Estadística no paramétrica	116
4.2.	Discusión.....	117
<i>CAPITULO V.....</i>		122
5.	CONCLUSIONES.....	123
<i>CAPITULO VI.....</i>		124
6.	RECOMENDACIONES.....	125
<i>CAPITULO VII.....</i>		126
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
<i>CAPITULO VIII.....</i>		133
8.	ANEXOS.....	134
8.1.	Hoja de campo.....	134
8.2.	Hoja de trabajo para PCR.....	135
8.3.	Hoja de trabajo para electroforesis.....	136
8.4.	Mapa de localizaciones	137
8.5.	Condiciones climáticas: normales de estación Pillones	140

8.6.	Condiciones climáticas: anomalías	140
8.7.	Matriz de datos de muestreo de campo	146
8.8.	Matriz de datos de resultados de PCR.....	147
8.9.	Fotografías.....	148
8.10.	Anexos estadísticos	149
8.10.1.	Correlación lineal entre 2 variables	149
8.10.1.1.	Correlación lineal entre temperatura máxima media y los animales positivos	149
8.10.1.2.	Correlación lineal entre temperatura máxima media y el porcentaje de Animales positivos	150
8.10.1.3.	Correlación lineal entre precipitaciones pluviales y Animales positivos	151
8.10.1.4.	Correlación lineal entre precipitaciones pluviales y porcentaje de Animales positivos.....	152
8.10.2.	Frecuencias observadas por mes.....	153

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1: Quistes macroscópicos de <i>S. aucheniae</i> (19).....	16
Ilustración 2: Morfología de sarcoquistes y bradizoitos de <i>S. aucheniae</i> . (a,b) Macroquistes en esquelético de llama (a) y alpaca (b); (c) sección transversal del músculo esquelético de alpaca con dos macroquistes, los zoitos se encuentran en la periferia y el centro está vacío (Hematoxilina-Eosina, 100×); (de) macroquiste, morfología de la pared celular (d), compartimentos con bradizoitos en forma de plátano (e) (Hematoxilina-Eosina ,400×); (f) bradizoitos (Giemsa, 1000×) . (1)	17
Ilustración 3: Quiste de <i>Sarcocystis aucheniae</i> de <i>Lama glama</i> de Perú. Célula huésped (hc), pared del quiste (cw) y bradizoitos (br). Azul de toluidina. (12).....	18
Ilustración 4: Microscopía electrónica de transmisión, llamada TEM, de <i>Sarcocystis aucheniae</i> de <i>Lama glama</i> de Argentina. A) Bajo aumento de la pared del quiste que muestra y Proteínas Villares, llamadas también ramificadas (PV). B) Mayor aumento de una VP que muestra la punta de la protuberancia con microtúbulos (mt) y proyecciones (puntas de flecha) (12).....	18
Ilustración 5: <i>Sarcocystis aucheniae</i> de <i>Lama glama</i> de Argentina. C) Microscopía electrónica de barrido (SEM), bradizoitos (br) y tabiques (se). D) Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de bradizoitos, gránulos de amilopectina (am), gránulos densos (dg) y núcleo (nu) (12).....	19
Ilustración 6: Ciclo biológico de <i>Sarcocystis</i> spp. Adaptado de Wieser, S. (1)	21
Ilustración 7: Subunidades de ribosomas eucariotas. (35)	25
Ilustración 8: Replicación simultánea de ambas hebras de la doble hélice. Ambas hebras se leen en la dirección 3' a 5'. Una cadena orientada de 5' a 3' (la hebra retrospectiva) se lee de forma discontinua, con la polimerasa saltando hacia adelante y leyendo hacia la horquilla de replicación (39).....	26
Ilustración 9: Presentación esquemática del principio de la PCR (37).....	28
Ilustración 10: Separación de fragmentos de DNA por electroforesis en gel (31).....	30
Ilustración 11: Detección molecular de ADN <i>S. aucheniae</i> por PCR semi-anidada. Se amplificaron fragmentos del gen 18S rRNA de <i>S. aucheniae</i> mediante PCR semi-anidada a partir de muestras de ADN de sangre de llama utilizando dos diferentes protocolos. Los	

carriles 1, 2 y 3 muestran resultados positivos, donde se ha obtenido una banda de 400 pB (calle 1) o de 550 pb (calles 2 y 3) correspondientes a *S. aucheniae*. En las calles 3 y 4 se agregaron a la mezcla primers para amplificar un fragmento del gen 16S de ARNr de CS, por lo que se obtiene una banda de 257 pb, correspondiente a ADN del hospedador. La calle 4 es negativa para *S. aucheniae*, por lo que solo se obtiene la banda correspondiente a ADN de llama (28)..... 31

Ilustración 12: Lugar de punción a la altura de vértebras cervicales 5 y 6. Adaptado de (44)..... 49

Ilustración 13: Lugar de punción en ángulo mandibular, se representó a la glándula salival parótida (44) 50

Ilustración 14: representación de esquema de diluciones empleadas para límites de detección. C=concentraciones inicial y de 2 a 7. Dichas concentraciones se obtienen de las diluciones a partir de la concentración inicial..... 72

Ilustración 15: esquema de PCR semi-anidada dúplex para la amplificación del gen 18S rARN de *S. aucheniae* (28)..... 74

Ilustración 16: Izquierda a derecha: Marcador de 100pB marca promega corrido en gel de agarosa 2% (46) Visualización de gel de agarosa en transiluminador UV. 89

Ilustración 17: Puesta a punto 1: Prueba de primers para la detección de ADN de *S. aucheniae* 100

Ilustración 18: Puesta a punto 2: Límite de detección de ADN de *S. aucheniae*. 101

Ilustración 19: Puesta a punto 3: Límite de detección de ADN de alpaca 102

Ilustración 20: Resultado de muestras del primer mes de muestreo. La calle correspondiente a la alpaca número 5, 15 y 19 son positivas a *S. aucheniae* ya que presentan una banda de 500bp, aproximadamente. Todas las muestras dieron positivo a sangre de alpaca, lo que indica una correcta extracción de ADN 102

Ilustración 21: Resultados de muestras de sangre. Se detalla con n.m. siendo n=número de muestreo y m=muestra. Todas las muestras dieron positivo a sangre de alpaca, lo que indica una correcta extracción de ADN..... 103

Ilustración 22: Resultados de muestras de sangre. Se detalla con n.m. siendo n=número de muestreo y m=muestra. Todas las muestras dieron positivo a sangre de alpaca, lo que indica una correcta extracción de ADN.....	104
Ilustración 23: Mapa de distritos de la provincia de Arequipa – Arequipa, se señala el distrito de Jacobo Hunter, ubicación del laboratorio de biotecnología y reproducción animal del vicerrectorado de investigación de la UCSM (50).....	137
Ilustración 24: Mapa de la provincia de Caylloma – Arequipa, se señala el distrito de Yanque, ubicación del trabajo de campo en CEDAT de DESCOSUR en Tocra (51) .	138
Ilustración 25: Distritos de la provincia de Caylloma – Arequipa, se señala el distrito de Yanque, ubicación del trabajo de campo en CEDAT de DESCOSUR en Tocra (52).	138
Ilustración 26: Ubicación del centro CEDAT de DESCOSUR en Tocra, se señalizan las estaciones próximas: superior de izquierda a derecha: Chivay (Arequipa, Caylloma, Chivay, 3644msnm) e Imata (Arequipa, Caylloma, San Antonio de Chuca, 4475msnm). Inferior de izquierda a derecha: Pampa de Arrieros (Arequipa, Arequipa, Yura, 3701msnm) y Pillones (Arequipa, Caylloma, San Antonio de Chuca, 4432msnm). Adaptado de SENAMHI (48).....	139
Ilustración 27: Anomalías de julio 2023. De izquierda a derecha: Temperatura máxima. Temperatura mínima. Precipitación (49).....	140
Ilustración 28: Anomalías de agosto 2023. De izquierda a derecha: Temperatura máxima. Temperatura mínima. Precipitación (49).....	141
Ilustración 29: Anomalías de septiembre 2023. De izquierda a derecha: Temperatura máxima. Temperatura mínima. Precipitación (49).....	141
Ilustración 30: Anomalías de octubre 2023. De izquierda a derecha: Temperatura máxima. Temperatura mínima. Precipitación (49).....	142
Ilustración 31: Anomalías de noviembre 2023. De izquierda a derecha: Temperatura máxima. Temperatura mínima. Precipitación (49).....	142
Ilustración 32: Anomalías de diciembre 2023. De izquierda a derecha: Temperatura máxima. Temperatura mínima. Precipitación (49).....	143
Ilustración 33: Anomalías de enero 2024. De izquierda a derecha: Temperatura máxima. Temperatura mínima. Precipitación (49).....	143

Ilustración 34: Anomalías de febrero 2024. De izquierda a derecha: Temperatura máxima.
Temperatura mínima. Precipitación (49)..... 144

Ilustración 35: Anomalías de marzo 2024. De izquierda a derecha: Temperatura máxima.
Temperatura mínima. Precipitación (49)..... 144

Ilustración 36: Anomalías de abril 2024. De izquierda a derecha: Temperatura máxima.
Temperatura mínima. Precipitación (49)..... 145



INDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1: Bradizoitos de <i>S. aucheniae</i>	19
Fotografía 2: Izquierda a derecha: Kit de extracción de ADN de Promega, Reactivos para la extracción.....	39
Fotografía 3: Izquierda a derecha: Tips con filtro de 1ml. Detalle del filtro.....	39
Fotografía 4: Pipeta de 1000 μ L (superior) y pipeta de 200 μ L (inferior)	40
Fotografía 5: Izquierda a derecha: Tubos eppendorf para PCR de 200 μ L Reactivos de Kit de GoTaq® G2 Hot Start Taq Polymerase, marca Promega.....	41
Fotografía 6: Primers o cebadores requeridos para PCR.....	41
Fotografía 7: Reactivos requeridos para PCR (de izquierda a derecha: dNTP mix, GoTaq Hot start polymerase, 5X green flexi buffer, MgCl ₂)	42
Fotografía 8: Izquierda a derecha: Termociclador marca Eppendorf. Cabina de Flujo laminar	42
Fotografía 9: Izquierda a derecha: Pipeta de 1000 μ L, pipeta de 200 μ L, pipeta de 10 μ L, pipeta de 2 μ L	42
Fotografía 10: Izquierda a derecha: Racks para microtubos eppendorf de PCR. Racks para tubos eppendorf de 2ml	43
Fotografía 11: Probeta graduada de 100ml, matraz Erlenmeyer de 250ml, tips con filtro de 10 uL, pipeta de 5 uL y agarosa.....	44
Fotografía 12: Izquierda a derecha: GelGreen nucleic acid stain 10000X. Buffer TAE 50X. Agarosa	44
Fotografía 13: Cámara de electroforesis junto con fuente de poder.....	45
Fotografía 14: Microondas	45
Fotografía 15: Transiluminador de luz UV	45
Fotografía 16: Izquierda a derecha: Ingreso al centro de desarrollo alpaquero de Tocra. Corrales de aparto y aislamiento de alpacas.....	50
Fotografía 17: : Izquierda a derecha: Alpacas ingresando a corrales. Alpacas ubicadas dentro de corrales de aislamiento en grupos de 7 individuos como máximo	51

Fotografía 18: Distribución de las alpacas en corrales de aislamiento para mejor manejo	51
Fotografía 19: Indumentaria necesaria para campo.....	52
Fotografía 20: Izquierda a derecha: Maletín de campo. Materiales para toma de muestras sanguíneas.....	52
Fotografía 21: Izquierda a derecha: Marcador de ganado. Señalización en la frente de alpacas que fueron muestreadas. Alpaca señalizada	52
Fotografía 22: Izquierda a derecha: Visualización de arete de alpaca. Registro de número de arete, fecha y otros	53
Fotografía 23: Izquierda a derecha: Sujeción correcta de alpaca. Inmovilización de alpaca para toma de muestra sanguínea de yugular.....	53
Fotografía 24: Izquierda a derecha: Localización de vena yugular. Punción para toma de muestra sanguínea de vena yugular	54
Fotografía 25: Izquierda a derecha: Localización de vena yugular en alpaca suri. Toma de muestra sanguínea en tubo Vacutainer con tapa celeste.....	54
Fotografía 26: Izquierda a derecha: Antisepsia de la zona yugular con alcohol. Colocación de aguja de Vacutainer en yugular junto con capuchón	55
Fotografía 27: Izquierda a derecha: Colocación de tubo con anticoagulante en sistema . Toma de muestra. La sangre fluye por presión negativa del sistema	55
Fotografía 28: Izquierda a derecha: Almacenamiento de muestras con geles refrigerantes. Ficha de registro de campo llena	56
Fotografía 29: Izquierda a derecha: Liberación de alpacas de corrales. Alpacas siendo dirigidas a zona de pastoreo.....	56
Fotografía 30: Tubos Vacutainer con muestras de las alpacas y tubos eppendorf de 2ml rotulados	57
Fotografía 31: Izquierda a derecha: Muestra sanguínea en tubo vacutainer rotulado. Muestras rotuladas.....	57
Fotografía 32: Izquierda a derecha: Colocación de tubos eppendorf en bolsa hermética. Congelación de muestras en bolsas individuales por mes.....	58

Fotografía 33: Izquierda a derecha: Muestras congeladas del mes de julio 2023. Descongelamiento gradual de muestras	60
Fotografía 34: Calentamiento de muestras a 56 grados celsius.....	60
Fotografía 35: Muestras por extraer ADN con sus respectivos tubos eppendorf para mezcla.....	60
Fotografía 36: Izquierda a derecha: Tubos colectores para lavados y tubos de eppendorf para elución. Columnas de kit de extracción en tubos colectores	61
Fotografía 37: Izquierda a derecha: Rótulo de tubos eppendorf. Cinta adhesiva en tubo eppendorf. Tubo rotulado	61
Fotografía 38: Izquierda a derecha: Proteinasa K. Tubos eppendorf con proteinasa K .	61
Fotografía 39: Izquierda a derecha: Extracción de proteinasa K. Colocación de proteinasa K en tubos eppendorf.....	62
Fotografía 40: Izquierda a derecha: Micropipeta señalada en 200 microlitro. Extracción de muestra sanguínea. Colocación de muestra sanguínea en tubo eppendorf.....	62
Fotografía 41: Izquierda a derecha: Extracción de buffer de lisis celular. Colocación de buffer de lisis en tubos eppendorf.....	62
Fotografía 42: Izquierda a derecha: Cerrado de tubo eppendorf. Vortex de la mezcla..	63
Fotografía 43: Izquierda a derecha: Colocación de tubos eppendorf en baño termostatizado. Programación	63
Fotografía 44: Izquierda a derecha:Devolución de muestras. Cierre hermético s.....	63
Fotografía 45: Izquierda a derecha:Extracción de buffer de unión. Colocación en tubo eppendorf correspondiente. Vortex de la mezcla	64
Fotografía 46: Izquierda a derecha: Apertura de tubo eppendorf con cuidado, procurando no tocar el interior de la tapa. Extracción de mezcla, Colocación de la mezcla en la columna. Columna en tubo colector	64
Fotografía 47: Izquierda a derecha: Programación. Tiempo de centrifugado	64
Fotografía 48: Izquierda a derecha: Buffer de lavado. Colocación de buffer en columna	65

Fotografía 49: Izquierda a derecha: Colocación de tubo y columna en centrífuga contrapesando. Cerrado de tapa de microcentrífuga	65
Fotografía 50: Izquierda a derecha: Antes del primer lavado. Primer lavado. Segundo Lavado. Tercer lavado. ADN eluido en tubo eppendorf	66
Fotografía 51: Izquierda a derecha: Agua libre de nucleasas para eluir ADN obtenido. Colocación de agua libre de nucleasas en columna.....	66
Fotografía 52: Izquierda a derecha: Membrana después del primer lavado. Tubo y columna despues de elusión. Membrana despues de eluir. ADN eluido.....	67
Fotografía 53: Izquierda a derecha: Tubos eppendorf con columnas colocadas en centrífuga contrapesadas. Otra forma de contrapesar los tubos	67
Fotografía 54: ADN eluido en bolsa hermética lista para congelación hasta su uso.....	68
Fotografía 55: Izquierda a derecha: muestra 2. Concentración mediante nanodrop de la muestra 2 del mes de julio 2023	70
Fotografía 56: Concentración mediante nanodrop de la muestra 28 del mes de diciembre 2023	71
Fotografía 57: Concentración mediante nanodrop del control positivo a ADN de <i>S. aucheniae</i>	71
Fotografía 58: Izquierda a derecha: Reactivos necesarios para master mix (5X green, MgCl ₂ , Primer Cocc18S-F1, Primer Sauch-R, Primer Lg_16SRNA-F, Primer Lg_16SRNA-R, dNTP, taq polimerasa). Rack para microtubos para PCR rotulados ...	78
Fotografía 59: Izquierda a derecha: Colocación de 5X green. Extracción de MgCl ₂	79
Fotografía 60: Izquierda a derecha: Colocación de dNTP. Extracción de taq polimerasa	79
Fotografía 61: Izquierda a derecha: Vortex. Spin-down en microcentrífuga.....	79
Fotografía 62: Izquierda a derecha: Cerrado de tubos para PCR. Colocación de master mix en cada tubo para PCR	80
Fotografía 63: Izquierda a derecha: Extracción de amplicón de primera ronda en otro ambiente. Colocación de amplicón en master mix para la segunda ronda.....	80

Fotografía 64: Izquierda a derecha: Colocacion de microtubos para pCR en termociclador. Programación de condiciones de termociclado	81
Fotografía 65: Partes de la placa para preparación de geles de agarosa, en la parte inferior se aprecian peines de 11 dientes	82
Fotografía 66: Izquierda a derecha: Buffer TAE 1X, Medición de buffer TAE 1X en probeta graduada.....	82
Fotografía 67: Izquierda a derecha: Taraje de papel. Pesaje de 1g de agarosa	83
Fotografía 68: Izquierda a derecha: Colocación de buffer TAE 1x en matraz. Agregacio2n de agarosa al matraz	83
Fotografía 69: Calentamiento en microondas de mezcla.....	83
Fotografía 70: Izquierda a derecha: Mezcla transparente. Mezclado sobre superficie ..	84
Fotografía 71: Izquierda a derecha: Gel Green. Adicio2n de gel green a la mezcla.....	84
Fotografía 72: Izquierda a derecha: Mezclado. Armado de placa para gel	84
Fotografía 73: Izquierda a derecha: Vertido de mezcla en placa para gel. Colocación de peines	85
Fotografía 74: Izquierda a derecha: Posición de los peines. Reposo de gel de agarosa .	85
Fotografía 75: Izquierda a derecha: Colocación de placa de gel en cámara de electroforesis horizontal. Orientación de los peines dentro de cámara.....	86
Fotografía 76: Izquierda a derecha: Blue/orange buffer de carga. Marcador de peso molecular. Retiro de peines de gel de agarosa dentro de cámara de electroforesis.....	86
Fotografía 77: Gel de agarosa sin peines, se aprecian muy bien los pocillos o wells	87
Fotografía 78: Izquierda a derecha: colocación de 1 microlitro de buffer de carga. Sembrado de amplicones en well correspondiente.....	87
Fotografía 79: Izquierda a derecha: Forma de sembrado en gel. Sembrado de pocillos	87
Fotografía 80: Gel con todas las muestras sembradas.....	88
Fotografía 81: Cámara de electroforesis horizontal cerrada.....	88
Fotografía 82: Izquierda a derecha: Frente de corrida de electroforesis. Frente de corrida transcurrido más tiempo	88

Fotografía 83: Visita de Dra. Mónica Jacobsen de Argentina. Julio 2023 148

Fotografía 84: Equipo del proyecto Sarcocystis en lugar de muestreo. Julio 2023..... 148

Fotografía 85: Equipo del proyecto Sarcocystis en laboratorio de biotecnología y reproducción animal del vicerrectorado de investigación. Julio 2023 149



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición proximal (%) y contenido de colesterol del músculo L. dorsi de animales de producción (7).....	10
Tabla 2: Contenido de AA (aminoácidos) del músculo L. dorsi de animales de producción (% sobre el total de aminoácidos) (7).....	10
Tabla 3: Taxonomía de Sarcocystis spp. (11).....	12
Tabla 4: Registros de la presencia de sarcoquistes de Sarcocystis spp. en CS (12).....	14
Tabla 5: Causas de problemas frecuentes por mal procesamiento o manejo (33).....	68
Tabla 6: Concentración de primers de Sigma-Aldrich. Adaptado del certificado de análisis de primers de Sigma-Aldrich.....	73
Tabla 7: Secuenciación de los primers y tamaños de gen que amplifican (28).....	73
Tabla 8: Cantidades de reactivos necesarios por muestra para Master mix de primera ronda.....	75
Tabla 9: Cantidades de reactivos necesarios por muestra para Master mix de segunda ronda.....	77
Tabla 10: clasificación del grado de correlación entre variables (47).....	91
Tabla 11: Temperatura máxima media por meses y Cantidad de animales positivos....	91
Tabla 12: Temperatura máxima media por meses y Porcentaje de animales positivos .	92
Tabla 13: Precipitaciones pluviales por meses y Cantidad de animales positivos	93
Tabla 14: Precipitaciones pluviales por meses Porcentaje de animales positivos.....	93
Tabla 15: Tabla de contingencia.....	95
Tabla 16: Datos necesarios para el cálculo de coeficiente de correlación de Pearson .	149
Tabla 17: Datos necesarios para el cálculo de coeficiente de correlación de Pearson .	150
Tabla 18: Datos necesarios para el cálculo de coeficiente de correlación de Pearson .	151
Tabla 19: Datos necesarios para el cálculo de coeficiente de correlación de Pearson .	152
Tabla 20: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de julio 2023	153

Tabla 21: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de agosto 2023	153
Tabla 22: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de septiembre 2023	153
Tabla 23: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de octubre 2023	154
Tabla 24: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de noviembre 2023	154
Tabla 25: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de diciembre 2023	154
Tabla 26: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de enero 2024	155
Tabla 27: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de febrero 2024	155
Tabla 28: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de marzo 2024	156
Tabla 29: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de abril 2024	156
Tabla 30: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual total del periodo julio 2023 a abril 2024	156

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Fluctuación mensual de la detección molecular de ADN en sangre de alpacas mayores a 3 años de edad en el periodo de julio a noviembre, 2023. 1=positivo y 0=negativo. H= Huacaya y S=suri.....	105
Gráfico 2: Fluctuación mensual de la detección molecular de ADN de <i>S. aucheniae</i> en sangre de alpacas de 2 años de edad en el periodo de julio 2023 a abril 2024. 1=positivo y 0=negativo. H= Huacaya y S=suri.....	106
Gráfico 3: Fluctuación en el tiempo de alpaca 211056 que fue positiva a ADN de <i>S. aucheniae</i> en julio 2023. 1=positivo y 0=negativo.....	107
Gráfico 4: Fluctuación en el tiempo de alpaca 191024 que fue positiva a ADN de <i>S. aucheniae</i> en julio 2023. 1=positivo y 0=negativo.....	107
Gráfico 5: Fluctuación en el tiempo de alpaca 181091 que fue positiva a ADN de <i>S. aucheniae</i> en julio 2023. 1=positivo y 0=negativo.....	107
Gráfico 6: Fluctuación en el tiempo de alpaca 211041 que fue positiva a ADN de <i>S. aucheniae</i> en julio 2023. 1=positivo y 0=negativo.....	108
Gráfico 7: Fluctuación en el tiempo de alpaca 211088 que fue positiva a ADN de <i>S. aucheniae</i> en julio 2023. 1=positivo y 0=negativo.....	108
Gráfico 8: Fluctuación en el tiempo de alpaca 211003 que fue positiva a ADN de <i>S. aucheniae</i> en septiembre 2023. 1=positivo y 0=negativo.....	108
Gráfico 9: Fluctuación en el tiempo de alpaca 211052 que fue positiva a ADN de <i>S. aucheniae</i> en diciembre 2023 y enero 2024. 1=positivo y 0=negativo.....	109
Gráfico 10: Fluctuación en el tiempo de alpaca 211080 que fue positiva a ADN de <i>S. aucheniae</i> en abril 2024. 1=positivo y 0=negativo.....	109
Gráfico 11: Fluctuación en el tiempo de alpaca 21006 que fue positiva a ADN de <i>S. aucheniae</i> en diciembre 2023, marzo y abril 2024. 1=positivo y 0=negativo.....	109
Gráfico 12: Porcentaje de alpacas positivas y negativas a ADN de <i>S. aucheniae</i> por prueba molecular de PCR distribuido de manera mensual en el periodo julio 2023 a abril 2024, se detalla el valor numérico de las muestras que fueron positivas y negativas encima de cada columna del color correspondiente.....	110

Gráfico 13: Condiciones climáticas en el periodo julio 2023 a abril 2024 en la estación de Pillones incluye precipitaciones, temperatura mínima y máxima. Adaptado de SENAMHI (49)	111
Gráfico 14: Porcentaje de animales positivos a ADN de <i>S. aucheniae</i> y temperaturas medias máxima y mínima durante el periodo julio 2023 a abril 2024	112
Gráfico 15: Porcentaje de animales positivos a ADN de <i>S. aucheniae</i> y precipitaciones pluviales durante el periodo julio 2023 a abril 2024	112
Gráfico 16: diagrama de dispersión del número de alpacas positivas en relación con temperatura máxima media	113
Gráfico 17: diagrama de dispersión del porcentaje de alpacas positivas en relación con temperatura máxima media	114
Gráfico 18: diagrama de dispersión del número de de alpacas positivas en relación con las precipitaciones pluviales	115
Gráfico 19: diagrama de dispersión del porcentaje de de alpacas positivas en relación con las precipitaciones pluviales	116
Gráfico 20: Normales climatológicas estándares y medias climáticas periodo 1991 a 2020 de la estación Pillones, incluye precipitaciones, temperatura mínima y máxima en los meses de enero a diciembre. Adaptado de SENAMHI (48).....	140

INTRODUCCIÓN

La sarcocistiosis es una enfermedad que tiene como agente etiológico al protozoo *Sarcocystis aucheniae* y afecta a los camélidos sudamericanos (CS), es decir, alpacas, guanacos, llamas y vicuñas, actuando como hospederos intermediarios. La adquieren por consumo de pastos o agua contaminada con ooquistes esporulados y desarrollan quistes macroscópicos de color amarillo pálido de 2 a 7 mm de largo que han sido encontrados en músculos esqueléticos, generando un impacto negativo en la carcasa, con su consecuente decomiso y pérdida económica del productor.

El curso y desarrollo de la sarcocistiosis no está dilucidado, es por ello que no se pueden establecer medidas de control efectivas para mejora de la calidad de carcasa y erradicación de la enfermedad. Por otro lado, generalmente los CS no muestran signos específicos en fase aguda, siendo la observación directa post mortem de los quistes el diagnóstico más empleado.

La crianza de camélidos sudamericanos domésticos (CSD), llama y alpaca, es una de las principales actividades económicas para la región altoandina del Perú, representando el 80 % de los ingresos. Nuestro país, Perú, posee el 87% de la población mundial de alpacas, según el Ministerio de Agricultura y Riego del Perú en 2022, contando con 4.3 millones de ejemplares. La carne de llama y alpaca son reconocidas por su alto contenido proteico y bajo contenido graso. La falta de medidas de control para la Sarcocistiosis es la principal causa por la cual no es posible organizar la exportación de carne de estos animales a otros países donde hay un particular interés por el consumo de carnes magras de animales que tengan menor impacto sobre el medio ambiente que los ganados tradicionales, como el vacuno.

Reconocer e identificar la presencia de *S. aucheniae* en la sangre de alpacas de manera oportuna podría impedir el desarrollo de la infestación. Por lo mencionado, realizar el diagnóstico de este parásito y evaluar su fluctuación en el tiempo resulta necesario para ayudar a la reducción en la prevalencia e incidencia. Con este fin, en esta investigación se realizó el primer estudio, a nivel mundial, de detección de ADN de *S. aucheniae* en sangre de alpacas (*Vicugna pacos*) a lo largo de 10 meses con el objetivo principal de comprender la fluctuación de la parasitemia en función del tiempo.



CAPITULO I

1. PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1.1. Enunciado del Problema

El protozoo *Sarcocystis aucheniae* produce numerosos quistes macroscópicos, en forma de granos de arroz, en los músculos de los camélidos sudamericanos (CS). La alta prevalencia de esta parasitosis en las especies domésticas, llama y alpaca (CSD), provoca altos porcentajes de decomiso (60 al 80%) de sus carcasas. Hasta el momento, no hay reportes sobre la evolución en función del tiempo de las infecciones por este parásito. Los resultados y conclusiones de esta investigación de Pregrado brindarán nueva información y conceptos sobre la infestación por *S. aucheniae* en CSD, contribuyendo al desarrollo de medidas de control para esta enfermedad, razón por la cual se enuncia la investigación “Estudios moleculares del curso de la infección en sangre de alpacas (*Vicugna pacos*) por el protozoo *Sarcocystis aucheniae*”.

1.2. Descripción del problema

Las infecciones de camélidos sudamericanos (CS) por el protozoo parásito *Sarcocystis aucheniae* dan lugar a quistes macroscópicos en los músculos de estos animales. Esta parasitosis, conocida como sarcocistiosis de CS, es de particular relevancia para los criadores de llamas y alpacas, del Perú y todos los países andinos donde se consume la carne de estos animales, dado que la presencia de quistes provoca la depreciación o decomiso de las carcasas, con las consecuentes pérdidas económicas. Es de tener en cuenta que del 60 a 80% de los animales mayores de 2 años presentan macroquistes. La carne de llama y la de alpaca son reconocidas por su alto contenido proteico y bajo contenido graso. Es muy importante comprender que los porcentajes proteicos y grasos por sí solos no hacen a la calidad de la carne, sino que se debe tener en cuenta todas las propiedades y factores que en su conjunto hacen a la particularidad de este producto. La buena calidad de los animales a faenar garantiza el máximo retorno económico. Se debe trabajar en la formalización de la cadena agroalimentaria con el fin de lograr el volumen y calidad esperada. La falta de medidas de control para la Sarcocistiosis de CS, además de los perjuicios que ocasiona para el mercado interno, es la principal causa por la cual no es posible organizar la exportación de carne de estos animales a otros países, tales como los de la Comunidad Europea y China, donde hay un particular interés por el consumo de carnes magras de animales que tengan menor impacto

sobre el medio ambiente que los ganados tradicionales, animales provenientes de sistemas sostenibles de producción.

Por las razones expuestas anteriormente se planteó la presente investigación en la cual se ha estudiado mediante métodos moleculares el curso de las infecciones por el parásito *S. aucheniae* a lo largo del tiempo en sangre de alpacas. Esto, para poder manejar adecuadamente los sistemas de crianza de CSD, dado que es esencial conocer la biología de *S. aucheniae*, ya que al no contar con este conocimiento es difícil encontrar medios de control, así como antiparasitarios eficaces que impidan el contagio y la alta prevalencia existente, el primer paso para lograr medidas de control es conocer mejor el ciclo de vida del parásito.

1.3. Justificación del trabajo

1.3.1. Aspecto general.

El desarrollo de una ganadería sustentable de CSD beneficia a las comunidades alto andinas y, en general, a todos los países que cuentan con estos animales. Según el Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego del Perú (2024), el precio promedio pagado a los productores de alpaca es de S/.5.00 por kg de carne alpaca y de s/.15.00 por kg de fibra de alpaca (5), es así que con manejo planificado e incrementando la venta de carne, el ingreso mensual de cada productor podría incrementarse. En la actualidad, la producción por año de carne de alpaca no supera las 30000 toneladas. Debido a su gran calidad por su composición proteica, su producción podría impactar sobre la anemia infantil que, en regiones como Puno, fue de 67.7%, según ENDES, en 2018. Además, dicha actividad puede significar un factor de desarrollo para productores alto andinos ya que existe una creciente demanda por consumir carne de animales que fueron alimentados por pastizales y aguas naturales. Actualmente, se decomisa entre el 60 al 80 % de carne de alpaca debido a la presencia de sarcoquistes en la misma lo que impide garantizar su inocuidad alimentaria, es así como la mayoría de beneficios de dichos animales se da de manera informal para evitar el decomiso y pérdida monetaria a causa de ello.

1.3.2. Aspecto tecnológico

Es posible detectar la presencia de *S. aucheniae* en sangre de CSD mediante técnicas moleculares por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), siendo una técnica muy sensible que permite su detección por lo menos un parásito por μl de sangre. La

implementación de esta técnica en Perú permitirá su diagnóstico temprano en ejemplares pertenecientes sistemas de crianza en zonas altoandinas.

1.3.3. Aspecto social

Las poblaciones alto andinas de los países sudamericanos donde se crían CSD dependen de manera directa de la producción y productividad que tenga dicha actividad. La cantidad de ejemplares que posee un criador o productor le otorga status en la sociedad, por lo que dicha cantidad debe complementarse con una buena calidad e inocuidad de la carcasa, para así asegurar el retorno económico rentables en sistemas de producción de camélidos sudamericanos para carn reflejando el manejo que se tiene durante la crianza de los animales. Ello repercutirá en una mejora del sector ganadero de la región e influirá en la calidad de vida de los productores y sus familias.

1.3.4. Aspecto económico

Las cifras del año 2017 indican que el 34 % de todos los productores de alpaca se consideran pobres y el 12 % en pobreza extrema. Si el producto final de la crianza de CSD es de alta calidad, permite que el retorno de la inversión que realiza el criador desde el momento del nacimiento del animal, incluso antes, sea más rápido, lo que permitiría que se implementen mejores técnicas de manejo y ello repercute de manera positiva en el rendimiento de los animales.

1.3.5. Importancia

Las alpacas representan los hospederos intermediarios donde se desarrollan quistes macroscópicos de *S. aucheniae*, lo que le confiere un mal aspecto a su carne, impidiendo su comercialización ya que no garantiza la salud pública de la población que la consume. Reconocer e identificar la presencia de este parásito en la sangre de alpacas de manera oportuna impediría el desarrollo de la infestación y el decomiso de carcasas, además permitirá conocer el curso de la enfermedad para que con el uso de biotecnologías se planteen medidas de control para mejora de la calidad de carcasa y erradicación de la infección de alpacas (*Vicugna pacos*) por el protozoo *Sarcocystis aucheniae*. Por lo mencionado, realizar el diagnóstico de *S. aucheniae* en alpacas y evaluar su fluctuación en el tiempo resulta necesario para ayudar a la reducción en la prevalencia e incidencia de dicha enfermedad en los países donde se realiza su crianza.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivos generales

Evaluar en forma periódica la presencia de ADN de *Sarcocystis aucheniae* por detección molecular de PCR semi-anidada dúplex en muestras de sangre de alpacas (*Vicugna pacos*).

1.4.2. Objetivos específicos

1. Implementar la técnica de PCR semi-anidada dúplex para detección molecular de *S. aucheniae* a partir de ADN extraído de muestras de sangre de alpacas (*Vicugna pacos*).
2. Diagnosticar la presencia de ADN de *S. aucheniae* en sangre de alpacas (*Vicugna pacos*) mediante la prueba de PCR semi-anidada dúplex en el distrito de Yanque.
3. Cuantificar la sensibilidad analítica de la prueba de PCR semi-anidada dúplex para la detección de ADN de *S. aucheniae* en sangre de alpacas (*Vicugna pacos*).
4. Demostrar la fluctuación periódica de ADN de *S. aucheniae* en sangre de alpacas (*Vicugna pacos*).
5. Indicar la relación entre la presencia de ADN de *S. aucheniae* en sangre alpacas (*Vicugna pacos*) con la edad del animal y condiciones climáticas.

1.5. Hipótesis

Dado que, la prueba de PCR semi-anidada dúplex detecta la presencia de ADN de *S. aucheniae* en sangre de CSD, es probable que:

Se pueda detectar la presencia, la fluctuación y la relación entre la presencia de ADN de *S. aucheniae* en sangre de alpacas con la edad del animal y condiciones climáticas en el comportamiento epidemiológico de la sarcocistiosis.



CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Análisis bibliográfico

2.1.1. Camélidos sudamericanos

Los camélidos sudamericanos pertenecen al orden *Artiodactyla* y a la familia *Camelidae* (6). El proceso de domesticación de los camélidos sudamericanos se inició en los Andes Centrales de Sudamérica hace 6000 años. Los camélidos sudamericanos (CS) comprenden cuatro especies, dos domesticas: la llama (*Lama glama*) y la alpaca (*Vicugna pacos*); y dos en estado silvestre: la vicuña (*Vicugna vicugna*) y el guanaco (*Lama guanicoe*) (6), todas estas especies están presentes en el Perú. Según FAO, 2019, en América del Sur hay alrededor de 5 millones de llamas y 4,5 millones de alpacas (7).

Las alpacas, llamas, guanacos y vicuñas habitan la zona alto andina de Perú, Bolivia, Argentina y Chile. Estos ambientes incluyen mesetas (Altiplanos) y laderas cordilleranas con baja calidad de pastos naturales, alta incidencia de heladas y precaria disponibilidad de agua. En Perú se concentra la mayor cantidad de alpacas y vicuñas de Sudamérica, en Bolivia la mayor concentración de llamas y en Argentina la mayor población de guanacos. Estas especies están adaptadas a condiciones ambientales duras, como temperaturas extremas, radiación solar, escasez de agua y pasturas pobres en calidad y escasas. En estas condiciones, la mayoría de especies ganaderas son incapaces de desarrollarse o merman su producción; además, presentan almohadillas suaves adaptadas a las condiciones montañosas y rocosas. Es por ello que los camélidos constituyen una opción atractiva en zonas con dichas características (8).

Históricamente los derivados obtenidos de la producción de los CS son la fibra, los productos cárnicos y cueros. En la época prehispánica los camélidos se habían adaptado a la costa, pero luego de la conquista, los españoles prefirieron consumir carnes de especies procedentes de Europa, como el bovino, oveja, cabra, cerdo, gallina, etc. Los españoles impusieron la crianza de camélidos lejos de la costa y en las zonas altas de los valles interandinos. Durante siglos se despreció a los CS. El consumo de llamas y alpacas fue “cosa de indios” y “transmitía enfermedades”. Actualmente existe una tendencia hacia la alimentación sana que hace apreciar los alimentos bajos en grasas y los producidos con pastizales naturales. Esto hace que haya un interés particular por la carne de CSD como

una alternativa válida. Es curioso que esta tendencia no surja desde las comunidades originarias, sino de Europa y de Estados Unidos de América, donde hay una significativa valoración de la salud y el consumo de carnes magras y sanas. Un ejemplo es el de Australia (8), que introdujo alpacas y llamas en su territorio como una alternativa a la lana de oveja.

Considerando la situación de las personas que actualmente viven en las regiones altoandinas, la producción de carne de llama representa una oportunidad para aumentar los ingresos de los agricultores locales, mientras que la alpaca aún debe criarse como un animal de fibra y no como un animal de carne, especialmente considerando el alto valor agregado obtenido en los países más ricos por la fibra natural de alpaca (9).

2.1.2. Carne de CSD

El tejido muscular y los tejidos blandos que rodean al esqueleto, una vez realizada la operación de faena, es la porción comestible de los animales declarados aptos para la alimentación humana por la Inspección Veterinaria. En particular, para el caso de la carne de CS en Perú, hablaremos específicamente de la carne de llama y alpaca debido a que tanto la vicuña como el guanaco son especies silvestres y no está aprobada la faena de estas especies.

Los productos cárnicos de los CSD poseen excelentes propiedades nutricionales, bajo colesterol y elevados niveles de proteínas. Esto, combinado con el menor impacto ambiental de las camelidas en comparación con el ganado tradicional, cumple con el perfil de los consumidores conscientes del medio ambiente y la salud (6). El contenido de proteínas de la carne de CSD es mayor a la de otras carnes, siendo de 24 g por cada 100 g de carne. A su vez posee una proporción de grasa menor a las de las especies ganaderas tradicionales, siendo de 1,6 g por cada 100 g de carne (10,11). Asimismo, el contenido de colesterol de la carne de llamas y alpacas es bajo (0.51 y 0.56 g/kg, respectivamente).

En la carne de llama y alpaca están presentes las vitaminas del complejo B, el cual colabora en la obtención de energía de los alimentos que se consumen, e intervienen en la formación de glóbulos rojos y aportan hierro de muy buena absorción (hierro hem), contrariamente al hierro proveniente de alimentos de origen vegetal. En la tabla 1 se

pueden observar las principales características de la carne de los CSD. Además, cuenta con minerales como Potasio, fósforo, sodio y magnesio (11)

En las tablas 1 y 2 se describe la composición de la carne de los distintos animales domésticos productivos.

Tabla 1: Composición proximal (%) y contenido de colesterol del músculo L. dorsi de animales de producción (12)

	Humedad (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Ceniza (%)	Colesterol (mg/100g)
Llama	72.8 ± 2.2	24.3 ± 2.7	3.3 ± 0.7	1.4 ± 0.3	57.7 ± 18.0
Alpaca	74.1 ± 1.6	22.7 ± 1.7	2.1 ± 0.9	1.1 ± 0.1	51.1 ± 2.0
Oveja	68.9 - 70.4	18.8 - 21.0	8.5 - 8.8	1.0 - 1.2	66.9
Cabra	76.5	20.8	1.6	0.9	56.6 - 64.6
<i>Bos indicus</i>	72.2	25.1	1.7	1	27.5
<i>Bos taurus</i>	76.1	22.4	1.3	1.1	49.7
Conejo	74.6 ± 1.4	22.4 ± 1.3	1.8 ± 1.5	1.2 ± 0.1	47.9 ± 7.9

Tabla 2: Contenido de AA (aminoácidos) del músculo L. dorsi de animales de producción (% sobre el total de aminoácidos) (12)

Aminoácidos	Alpaca	Llama	Bovino	Cabra
Acido glutámico	16.6 ± 1.8	14.9 ± 0.6	17.3 - 18.6	13.4

Acido aspártico	12.1 ± 1.8	9.8 ± 0.4	9.6 - 11.5	7.7
Isoleucina + leucina	11.4 ± 1.1	10.9 ± 0.2	13.1 - 15.1	11
Lisina	11.1 ± 2.8	11.7 ± 0.7	9.1 - 10.6	8.4
Histidina + treonina	7.6 ± 0.5	8.5 ± 0.3	6.6 - 7.8	7.2
Alanina	7.3 ± 0.5	3.4 ± 0.1	6.4 - 7.1	4.8
Arginina	6.9 ± 1.5	6.9 ± 0.2	6.7 - 7.6	5.5
Glicina	6.0 ± 0.5	4.5 ± 0.3	4.7 - 5.6	3.8
Fenilalanina + triptófano	5.2 ± 2.9	3.3 ± 0.1	5.8 - 6.2	4.6
Serina	4.8 ± 0.3	4.2 ± 0.3	4.5-3.9	3.8
Valina	3.3 ± 0.3	4.9 ± 0.3	5.3 - 6.7	4
Prolina	3.3 ± 0.3	9.1 ± 0.2	4.1 - 5.1	3.2
Tirosina	2.4 ± 0.3	4.4 ± 0.4	3.8 - 4.6	3.1
Metionina	2.2 ± 0.8	2.6 ± 0.4	2.7 - 3.9	2.2
Cistina	n/d	1.0 ± 0.4	1.2 - 1.3	0.9

Abreviaciones: (n/d) no determinado

En Perú, el faenamiento de carne de CSD se concentra en las zonas alto andinas, en condiciones precarias y poco eficientes. Son pocas las plantas de faena adecuadas. La logística se dificulta por las grandes distancias entre un ganadero y otro, por lo que se recurre a una faena “domiciliaria”, en la que luego de separada la carne de autoconsumo

se vende el excedente. El volumen de carne faenado en estas condiciones supera ampliamente a la carne faenada de manera formal y/o legal. Sin duda es un sistema de subsistencia, pues la venta de animales en pie o de carne es para cubrir necesidades básicas. En cuanto a la comercialización, la carne llega informalmente a mercados o ferias de distintas poblaciones, o se vende a domicilio previo encargo y a carnicerías (4).

Una de las causas de la informalidad en la faena de los CSA, es el rechazo o decomiso producido por la presencia de quistes de *S. aucheniae*. Esta situación trae aparejadas dos situaciones: la pérdida económica del productor y el cierre de plantas de procesamiento de carne CSD. Este es el caso de la planta del Proyecto de Desarrollo ARAUCARIA Valle del Colca. En esta planta se encontró que el 70% de las carcasas tenían macroquistes de *Sarcocystis spp* (4). Sus directores llegaron a la conclusión que no se puede desarrollar en el tema de carne, mientras no se controle la Sarcocistiosis.

2.1.3. Etiología

La Sarcocistiosis es una enfermedad parasitaria cuya noxa es el protozoo coccidio del filo Apicomplexa que pertenece al género *Sarcocystis*, siendo un parásito intracelular obligado que posee complejidad biológica (13,14).

El término *Sarcocystis* está compuesto por 2 vocablos griegos: *sarko*, que significa carne, y de *kystis*, vesícula.

2.1.3.1. Taxonomía

Los coccidios se transmiten por contaminación fecal siguiendo secuencias de multiplicación asexual y sexual que requiere de hospedadores (13). El zoito es la unidad funcional de la ontogenia de los coccidios, ya que representa el punto de partida y fin de su ciclo biológico. Es una célula móvil que migra dentro del hospedador e ingresa a sus células y posee un extremo redondeado y un extremo puntiagudo, al cual se le denomina ápice. En el caso de las especies del género *Sarcocystis*, los hospedadores son dos, uno definitivo y uno intermediario, que corresponden, respectivamente a un predador y su presa. La clasificación taxonómica de *Sarcocystis spp.* se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3: Taxonomía de Sarcocystis spp. (15)

Reino	Animalia
Subreino	Protozoa
Phylum	Apicomplexa
Clase	Conoidasida (sporozoa)
Subclase	Coccidia (coccidiasina)
Orden	Eucoccidiorida
Suborden	Eimeriorina
Familia	Sarcocystidae
Género	Sarcocystis

La taxonomía de las especies de *Sarcocystis* presentes en CS ha sido confusa hasta hace unos años (3). Brumpt, en 1913, denominó *Sarcocystis aucheniae* a la especie productora de un quiste macroscópico que observó en una llama de Australia, sin mayor detalle (16); más tarde, Quiroga et al. en 1969, encontraron quistes en guanaco y los denominaron *S. tilopodi* basándose en que fue en una especie distinta de camélido (17). En 1984, encontraron macro y microquistes en guanaco y sugirieron que dicho parásito se denomine *S. guanicoecanis*, y el de llama, *S. lamacanis*, sin embargo, no se describieron diferencias morfológicas o estructurales (18). Leguía et al. denominaron *S. aucheniae* a la especie productora de macroquistes, y *S. lamacanis*, a la de microquistes. Posteriormente, Leguía y Casas en 1999, detectaron microquistes en miocardio de llamas y alpacas a los cuales llamaron *S. lamacanis*.

Carletti et al. en 2013 (2), realizaron la secuenciación del gen completo 18S ARNr de la especie de *Sarcocystis* hallada en macroquistes de llamas de Argentina y observaron que esta secuencia agrupaba con la única secuencia disponible de *S. aucheniae* correspondiente a una llama de Australia. De esta manera, quedó demostrado que el parásito que infecta a llamas de Sudamérica es *S. aucheniae* (19,20). Finalmente, Dubey

et al. en 2015 (19), realizaron un análisis de la taxonomía de las especies de *Sarcocystis* que forma sarcoquistes macroscópicos en llamas y alpacas, llegando a la conclusión de que no hay una razón que justifique separar a las especies que se encuentran en dichos camélidos sudamericanos. Debido a que Brumpt en 1913 observó un macroquiste por primera vez, es razonable que se denomine *S. aucheniae*, siendo la única forma correcta de denominar taxonómicamente a dicho quiste.

More et. al., avanzaron en la taxonomía de estos parásitos, demostrando por métodos moleculares que *S. aucheniae* es la especie que produce macroquistes en llamas y alpacas de Perú, como así también en guanacos de Argentina (3). Asimismo, redescubrieron al parásito formador de microquistes como *S. masoni*, en honor al Dr. Mason quien reconoció Sarcocistiosis en un camello por primera vez. De esta manera, las anteriores denominaciones *S. guanicoecanis*, *S. tilopodi* y *S. lamacanis* quedaron obsoletas.

Los distintos trabajos en los que se reportaron sarcoquistes en CS y los nombres que se les asignaron se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: Registros de la presencia de sarcoquistes de *Sarcocystis* spp. en CS (3)

Autor	Año	País	Hospedero	n	Denominación
Guerrero et al.	1967	Perú	Alpaca	200	<i>Sarcocystis</i> spp.
Quiroga et al.	1969	Argentina	Guanaco	119	<i>S. tilopodi</i>
Castro	1974	Perú	Llama	131	<i>S. aucheniae</i>
Schnieder et al.	1984	Bolivia	Llama	-	<i>S. aucheniae</i>
Gorman et al.	1984	Chile	Guanaco	-	<i>S. guanicoecanis</i>

Leguía et al.	1989	Perú	Alpaca	-	<i>S. aucheniae</i> (M), <i>S. lamacanis</i> (m)
Ayala	1999	Bolivia	SAC	1023	<i>Sarcocystis spp.</i>
La perle et al.	1999	USA	Alpaca	1	<i>S. aucheniae</i>
Holmdahl et al.	1999	Australia	Alpaca	1	<i>S. aucheniae</i>
Beldomenico et al.	2003	Argentina	Guanaco	12	<i>Sarcocystis spp.</i>
Cornejo et al.	2007	Perú	Alpaca, Llama	-	<i>S. aucheniae</i>
Gabor et al.	2010	Australia	Alpaca	1	<i>Sarcocystis spp.</i>
Carletti et al.	2013	Argentina	Llama	3	<i>S. aucheniae</i>
Zacarias et al.	2013	Perú	Alpaca	-	<i>S. aucheniae</i>
Rooney et al.	2014	Bolivia	Llama	1196	<i>S. lamacenis</i>
Regensburger et al.	2015	Argentina	Guanaco	2	<i>S. aucheniae</i>
Moré et al.	2016	Argentina y Perú	Llama, Guanaco, Alpaca	8, 10, 7	<i>S. aucheniae</i> (M), <i>S. masoni</i> (m),

Abreviaciones: (-) no informado, (M) macroquiste, (m) microquiste

2.1.3.2. Morfología

Los sarcoquistes de *S. aucheniae* tienen forma y tamaño de grano de arroz y han sido descritos en músculos esqueléticos de alpacas, guanacos, llamas y vicuñas (1–3). Miden entre 2 a 7 mm de largo y son de color amarillo pálido. Consisten en una pared de quiste primaria que contiene varias protuberancias y en su base se encuentra una sustancia fundamental, ambas pueden medir hasta 10µm (6). Esta última se pliega entre las fibras musculares colindantes para formar protuberancias de 3 – 4.5 µm x 3 – 5 µm en forma de coliflor (1), cada protuberancia contiene microtúbulos o microfilamentos. Además, están rodeados de una pared quística secundaria densa de 50µm de grosor (3).

Los quistes de *S. aucheniae* contienen de 10 a 15 millones de bradizoitos ovalados alargados de 13 -18 µm x 3 – 5 µm (1) que se encuentran empaquetados en sacos y se encuentran separados por septos o tabiques. Cada bradizoito contiene numerosos micronemas, que son orgánulos secretores en la mitad anterior y de gránulos de amilopectina en la mitad posterior.

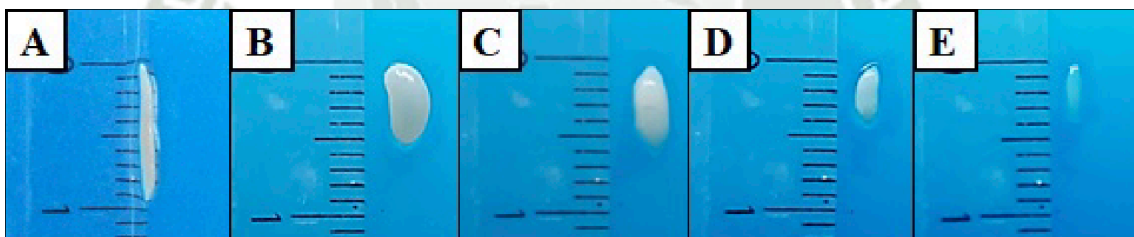


Ilustración 1: Quistes macroscópicos de *S. aucheniae* (21)

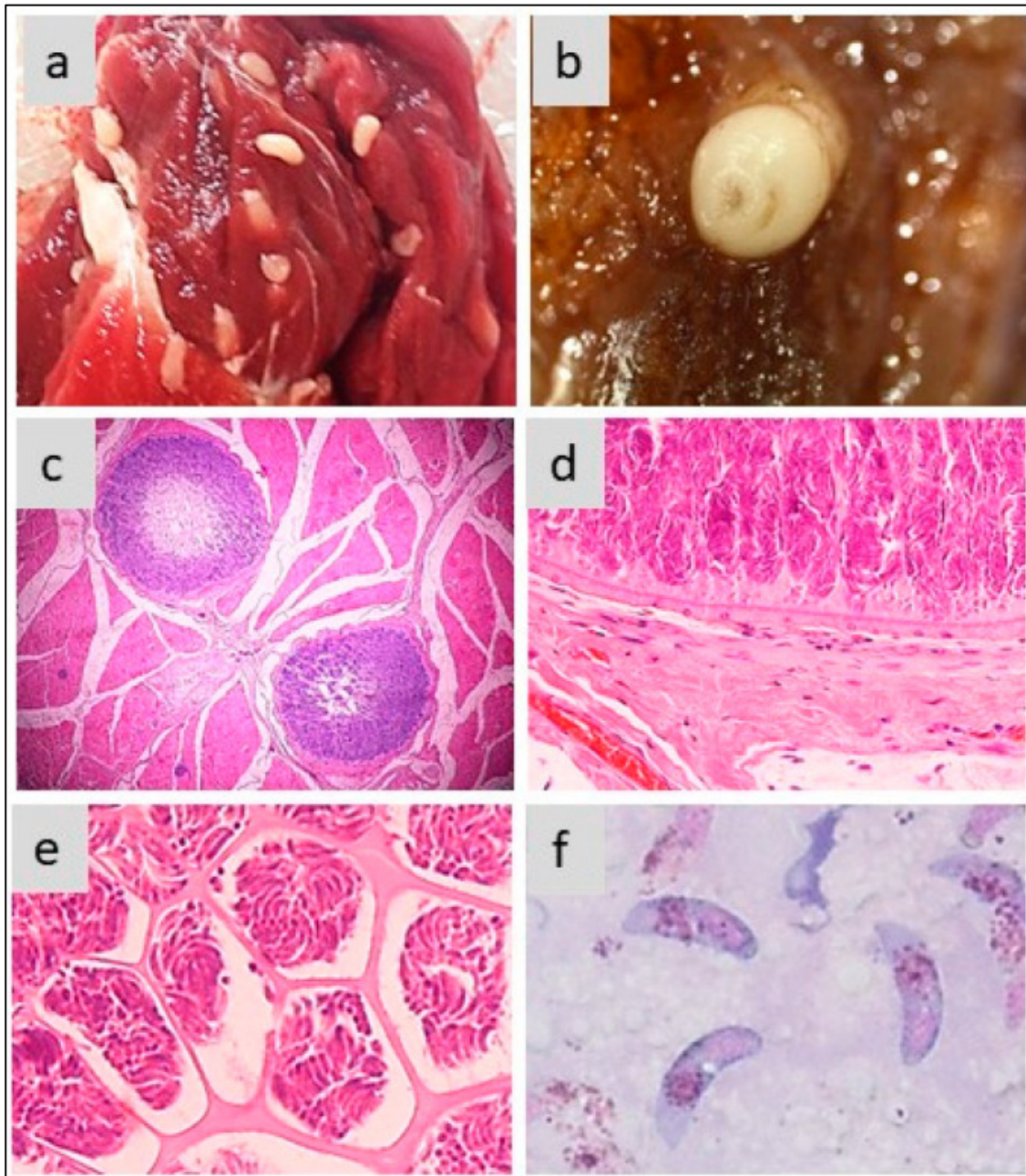


Ilustración 2: Morfología de sarcocistes y bradizoitos de S. aucheniae. (a,b) Macroquistes en esquelético de llama (a) y alpaca (b); (c) sección transversal del músculo esquelético de alpaca con dos macroquistes, los zoitos se encuentran en la periferia y el centro está vacío (Hematoxilina-Eosina, 100×); (de) macroquiste, morfología de la pared celular (d), compartimentos con bradizoitos en forma de plátano (e) (Hematoxilina-Eosina ,400×); (f) bradizoitos (Giemsa, 1000×) . (6)

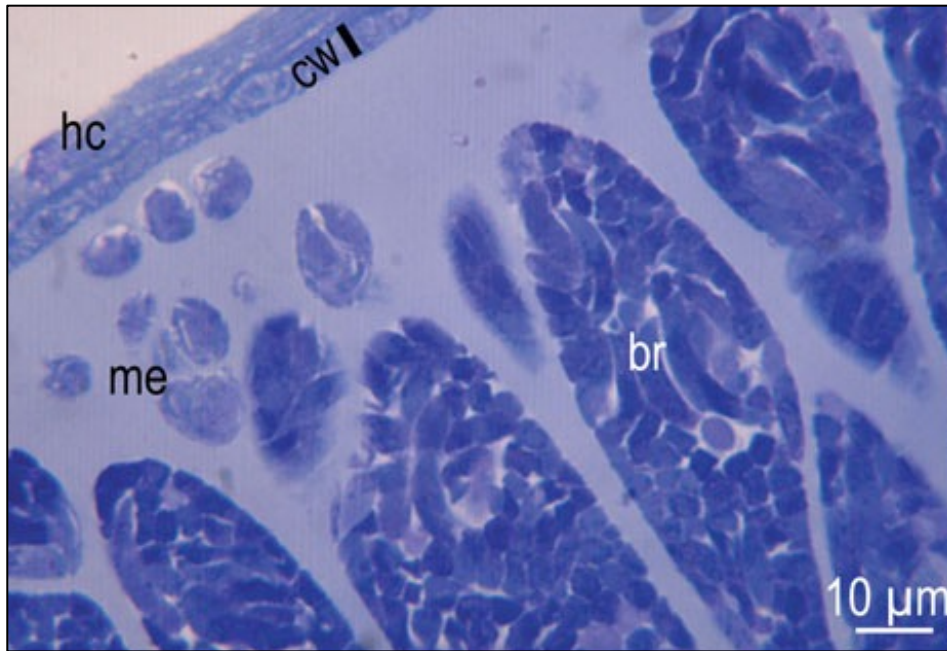


Ilustración 3: Quiste de *Sarcocystis aucheniae* de *Lama glama* de Perú. Célula huésped (hc), pared del quiste (cw) y bradizoítos (br). Azul de toluidina. (3)

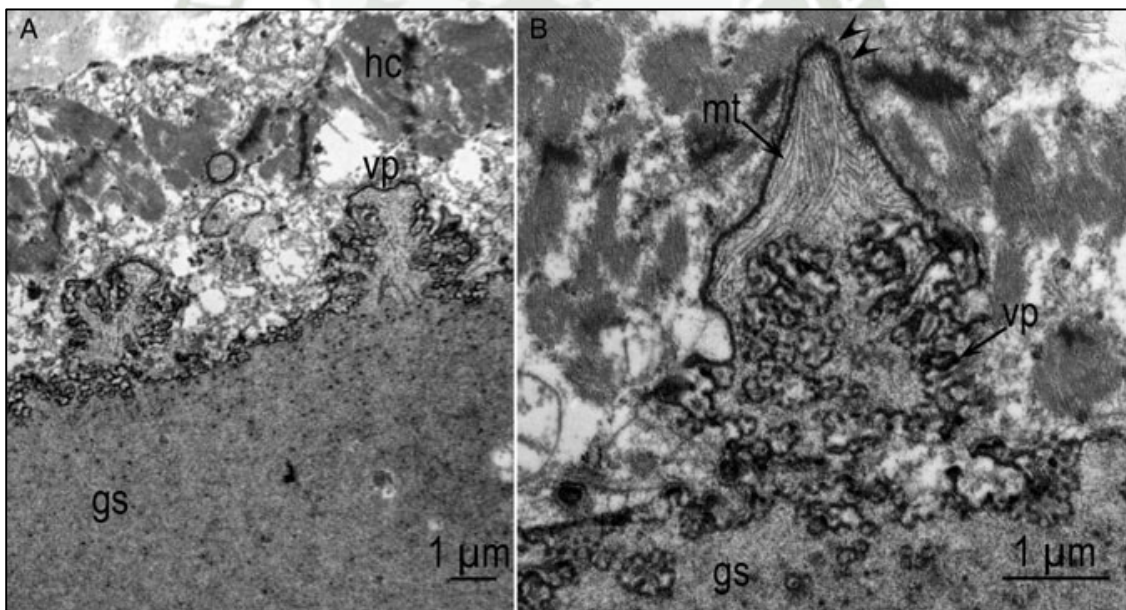


Ilustración 4: Microscopía electrónica de transmisión, llamada TEM, de *Sarcocystis aucheniae* de *Lama glama* de Argentina. A) Bajo aumento de la pared del quiste que muestra y Proteínas Villares, llamadas también ramificadas (PV). B) Mayor aumento de una VP que muestra la punta de la protuberancia con microtúbulos (mt) y proyecciones (puntas de flecha) (3).

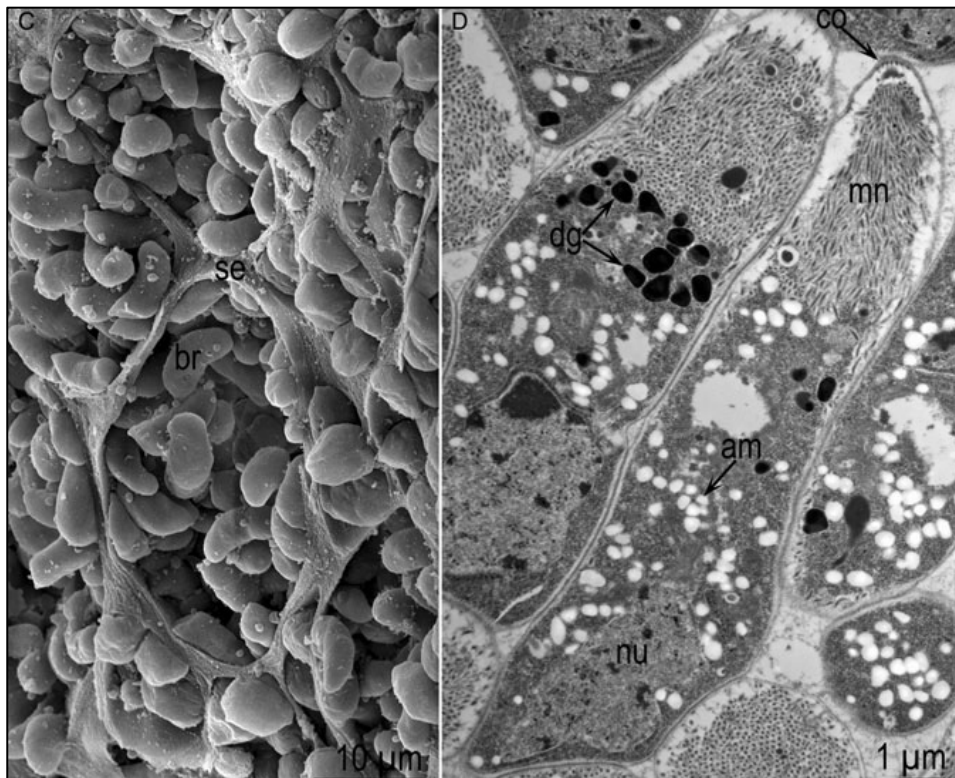
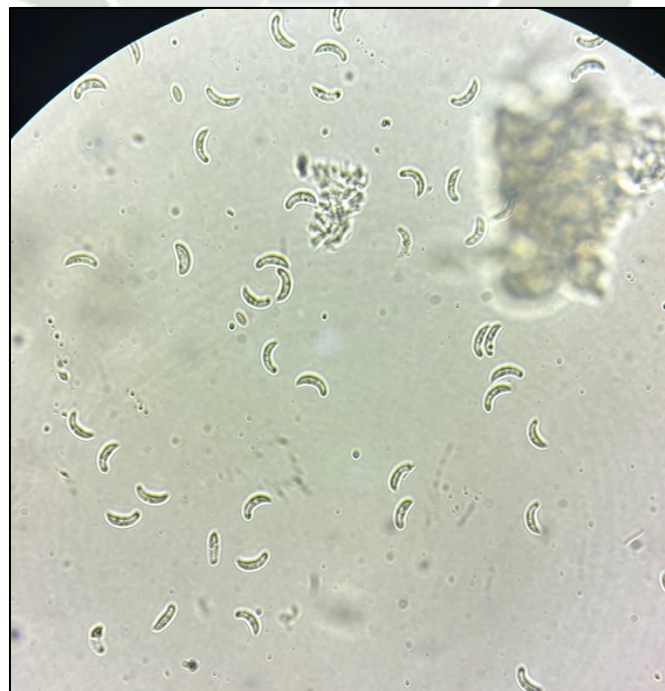


Ilustración 5: Sarcocystis aucheniae de Lama glama de Argentina. C) Microscopía electrónica de barrido (SEM), bradizoitos (br) y tabiques (se). D) Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de bradizoitos, gránulos de amilopectina (am), gránulos densos (dg) y núcleo (nu) (3).



Fotografía 1: Bradizoitos de S. aucheniae

2.1.3.3. Ciclo biológico

El ciclo de *S. aucheniae* no está del todo dilucidado, sin embargo, se ha descrito que los camélidos son huéspedes intermediarios que supuestamente se infectan de la noxa al ingerir ooquistes esporulados, también denominados esporoquistes, del medio ambiente (1). Su ciclo biológico incluye una fase de multiplicación sexual por gametogonia, fecundación y esporulación, en el intestino del hospedador definitivo, que termina en la excreción con las heces de esporoquistes infectivos y una fase de multiplicación asexual por esquizogonia y enquistamiento en el hospedador intermediario, que concluye con la formación de quistes macroscópicos en la musculatura (13). Estudios de infección experimental han demostrado que el perro puede actuar como hospedador definitivo de *S. aucheniae*. No se conoce si existen otros cánidos que puedan cumplir con esta función (Ilustración 6).

Cuando el hospedador intermediario ingiere pastos o agua conteniendo ooquistes, los cuatro esporozoitos contenidos en éstos se liberan en su tracto gastrointestinal por la acción de las enzimas digestivas, como la tripsina. Luego, al desplazarse, penetran en el endotelio vascular donde realizan una fase de multiplicación asexual denominada esquizogonia. Los esquizontes entran en un proceso conocido como endopoligenia que genera merozoitos por gemación de la superficie de éste. Según la especie de *Sarcocystis*, se dan multiplicaciones seguidas de esquizogonias, resultando en varias generaciones de merozoitos que migrarán a los músculos por vía sanguínea (3). La localización de estos y el número de ciclos aún no ha sido determinada.

Los merozoitos cuando llegan a los miocitos se convierten en sarcoquistes dentro de la célula hospedera, formando vacuolas parasitarias del plasmalema del miocito. Esto evita que el cuerpo del hospedero los reconozca como antígenos, y escapan de esta forma los mecanismos de defensa del animal (3). Es así como los miocitos pueden contener millones de bradizoitos infecciosos. Para diferenciar a los merozoitos de los bradizoitos se deben reconocer las roptrias que poseen estos últimos, ya que los merozoitos carecen de ellas. Los bradizoitos representan un estado de hipobiosis ya que el desarrollo está inhibido y pueden continuarlo en el hospedero definitivo (13).

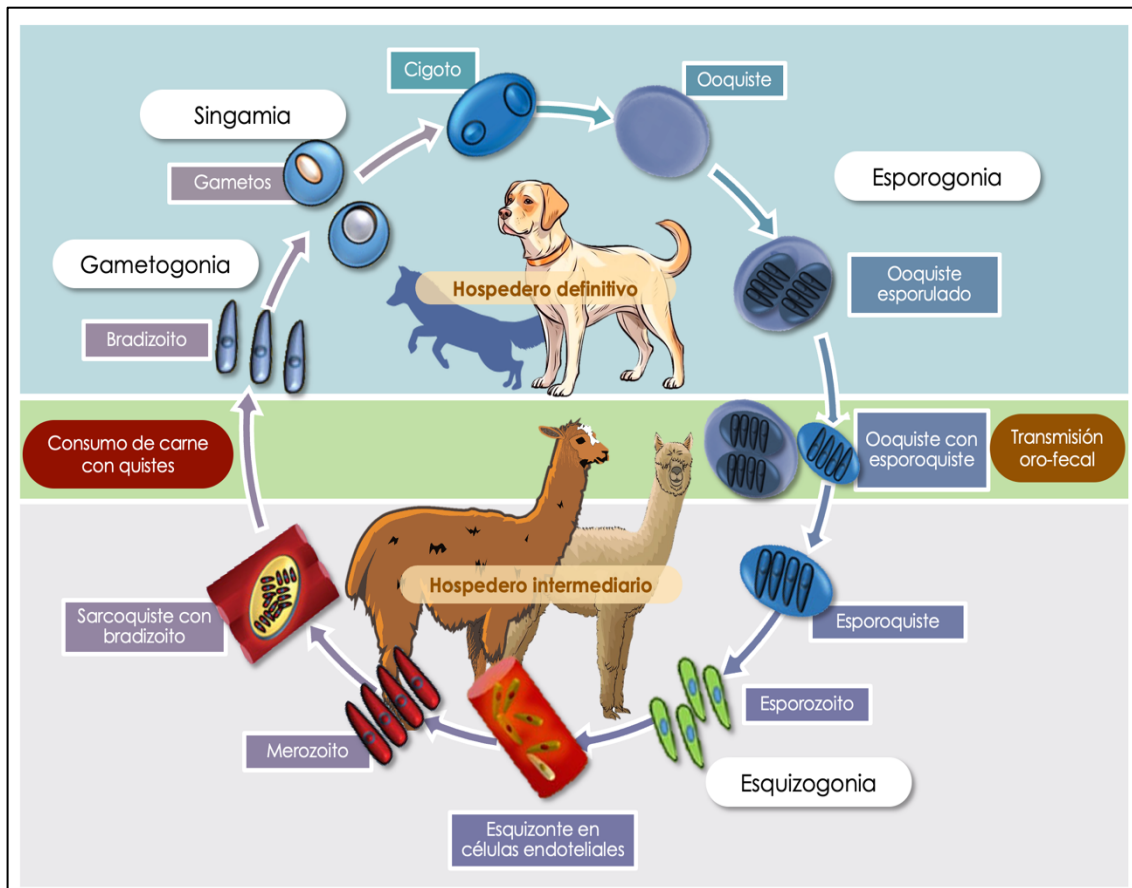


Ilustración 6: Ciclo biológico de *Sarcocystis* spp. Adaptado de Wieser, S. (6)

Los cánidos, que son el hospedero definitivo, desarrollan Sarcocistiosis intestinal tras consumir carne con quistes, de ellos se liberan los bradizoitos e invaden los enterocitos, donde experimentan gametogonia (1), formando microgametos y macrogametos. Estas estructuras se fusionan y forman un cigoto, futuro esporoquiste, en la lámina propia del intestino delgado y se desarrollan dentro del ooquiste que posee una membrana delicada. Es por esto que en las heces se pueden liberar esporoquistes libres o encapsulados (3) y así contaminar alimentos y agua de los hospederos intermediarios, completando el ciclo. No se realiza ningún tipo de desarrollo en el ambiente (1) y se ha observado para otra especie, *S. cruzi*, que su maduración y estado infeccioso son resistentes a variadas condiciones climáticas (22).

El periodo prepatente es de 9 a 16 días y patente de 19 a 61 días. Por otro lado, aún no se conoce en su totalidad al huésped definitivo de los microquistes (*S. masoni*), aunque se sugiere que el perro y otros cánidos representan dicha incógnita (3).

2.1.4. Epidemiología

Estudios epidemiológicos en distintas regiones geográficas han estimado valores de prevalencia de esta parasitosis que oscilan entre 90 a 100 % en alpacas, del 34 a 100 % en llamas y de 37 a 100 % en guanacos (1), hasta la fecha, no hay datos epidemiológicos sobre la enfermedad en vicuñas.

La edad es un factor que influye en la incidencia de la enfermedad ya que animales más viejos, al estar mayor tiempo expuestos a pastos potencialmente infectados, tienen mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad a diferencia de los jóvenes (23–25). Además, las razas de llamas de fibra larga, como la llama Ch'aku, demostraron mayor tasa de infección que aquellas de fibra corta, como la Q'ara, aunque se desconoce a qué podría deberse esta diferencia (23)

La presencia de perros pastores y los escasos métodos sanitarios contribuyen al desarrollo de esta enfermedad en los camélidos, esto fue demostrado por Romero et al. en 2017 (26), ya que se observó una prevalencia del 50% en llamas criadas con perros pastores y con pobre manejo sanitario en zonas rurales y una del 23 al 26% en llamas criadas en ausencia de los mismos y con mejor control sanitario (23), lo que supone que las buenas prácticas de manejo influyen directamente en la exposición de dichos camélidos frente a la Sarcocistiosis (22).

2.1.5. Lesiones

Se ha observado en infecciones experimentales que la distribución y número de los sarcoquistes dependen de factores como el número de esporoquistes consumidos, inmunidad del huésped y especie de *Sarcocystis spp.* Puede presentarse una miositis eosinofílica y presentar signos como recumbencia, falta de respuesta a estímulos, temblores musculares, aborto, hipotermia, entre otros (27). La mayoría de las infecciones naturales de *Sarcocystis spp.* son asintomáticas, sin embargo, en algunos casos, se pueden observar las lesiones patológicas en los tejidos afectados.

En el caso de *S. aucheniae*, en la necropsia pueden encontrarse en algunos casos áreas multifocales de lesiones caseosas, pálidas y estriadas en la musculatura del camélido (28). A nivel histológico, se presenta necrosis caseosa multifocal con histiocitos,

linfocitos y células gigantes (23). La necrosis se debe a la rápida multiplicación del parásito (17). Los microquistes ocasionados por *S. masoni* en miocardio se localizan únicamente en miocitos y no en células de Purkinje (28), por lo que no hay interrupción en la conducción de los impulsos eléctricos del corazón (1).

2.1.6. Diagnóstico

Aun no existen pruebas comerciales disponibles que permitan diagnosticar Sarcocistiosis en CS vivos, siendo la necropsia el único método para diagnóstico definitivo (29). Puede diagnosticarse con información epidemiológica de la zona, sin embargo, es un desafío ya que la enfermedad es asintomática y muchas veces se encuentra de manera generalizada en el organismo del animal.

Se han desarrollado métodos de diagnóstico serológico mediante la detección de anticuerpos contra *Sarcocystis* en el suero de llama (26,29). La prueba de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFAT) para determinar la seroprevalencia mediante el uso de antígenos procedentes de bradizoitos permitió la detección de anticuerpos anti *Sarcocystis* en el 96 % de sueros de llama de la provincia de Jujuy, Argentina. Sin embargo, hubo reactividad cruzada entre *Sarcocystis spp* (23).

Romero et al. (29) lograron desarrollar una prueba ELISA para detectar anticuerpos anti-Sarcocystis en suero de llamas mediante la utilización del antígeno proteico Sa23, que corresponde a una fracción soluble capaz de generar una respuesta inmunitaria siendo de 23 kDa de macroquistes que permitirá en un futuro evaluar el curso de la infección por *S aucheniae* (26)

La primera detección molecular de macroquistes se realizó mediante la amplificación del fragmento del gen 18S rARN mediante PCR convencional (reacción en cadena de polimerasa) (2,30). Los análisis filogenéticos de dicho fragmento revelaron que es una especie distinta a la que afecta a rumiantes. Posteriormente, se amplificó el mismo gen de llamas y guanacos, resultandos homólogos, lo que sugiere que la misma especie afecta a dichos camélidos (2).

El análisis molecular del ADN de *S. aucheniae* a partir de quistes es inviable como método de diagnóstico en animales vivos. Por otro lado, la detección de ADN en sangre

es más útil como herramienta de diagnóstico temprano, particularmente de la especie responsable de los macroquistes.

2.1.7. Obtención de ADN de muestras sanguíneas

El proceso de obtención o extracción de ADN, denominado así por las iniciales de ácido desoxirribonucleico, posee variantes de protocolo y emplea reactivos estandarizados, pudiendo emplearse kits comerciales disponibles en el mercado siguiendo indicaciones de proveedor. Cuando se trata de muestras de sangre, suelen emplearse soluciones para la lisis eritrocitaria y leucocitaria (31).

El primer paso suele ser la homogeneización celular y aislamiento nuclear del cual se extraerá el ADN, posteriormente, se extraen los núcleos con una solución detergente buffer (ejemplo: SDS) que lizará los núcleos y libera el ADN. El objetivo principal es aislar el ADN de materiales contaminantes, especialmente proteínas, entre las que se encuentran las nucleasas, mediante la agitación con fenol para desnaturalizarlas y precipitarlas; y del ARN (32). En el método de fenol-cloroformo, cuando se agita con estas sustancias, se consigue este paso. Debido a que el cloroformo y las soluciones buffer son inmiscibles, es decir, que no pueden mezclarse, al centrifugarse se separarán las fases, dejando al ADN y al ARN en la fase acuosa superior y a las proteínas entre ambas fases en forma de precipitado. Se decanta la fase acuosa y se realizan reiterados ciclos para eliminar toda la proteína (33). Para precipitar los ácidos nucleicos se agrega etanol frío y se forma una fase acuosa de ADN, esta se enrolla en un vidrio cilíndrico conforme se retira de la solución en la interfase que se encuentra entre el etanol y la solución salina (32). Para retirar el ARN contaminante, se emplea ribonucleasa que luego será lisada con proteasas y estas a su vez se eliminan mediante fenol para desnaturalizarlas. Finalmente, se precipita el ADN con etanol (32).

Por otro lado, el protocolo de los kits de extracción comerciales, como el empleado en el presente estudio, tiene una técnica más sencilla y rápida, permitiendo obtener ADN intacto y purificado de sangre. Las muestras se procesan en columnas dentro de tubos para microcentrífuga, obteniéndose ADN de muy buena calidad que puede emplearse en pruebas moleculares. El Kit de extracción de ADN en sangre (ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System) de la marca Promega consiste en 4 pasos, no incluye etanol (34):

- A. Honogeneización de la muestra para liberar su ADN.
- B. Unión entre el ADN y la columna de unión.
- C. Lavados para la eliminación de impurezas.
- D. Elución del ADN purificado resultante.

2.1.8. Gen 18S

Los ribosomas están formados por ribo nucleoproteínas, ARN ribosomal con proteínas ribosomales. Su estructura de un ribosoma eucariota es de 80S consta de una subunidad grande (60S) y otra pequeña (40S) (figura 7). El ARN ribosomal (ARNr) 18S conforma la subunidad pequeña del ARNr. Es útil ya que sus regiones flanqueantes evolucionan lentamente y son muy conservadas, además se encuentran repetidas en el genoma permitiendo de esta forma la extracción, amplificación y secuenciación de material genético, ello también facilita el empleo de primers universales (35). Es por ello que se emplea como diana para detectar la presencia de parásitos.

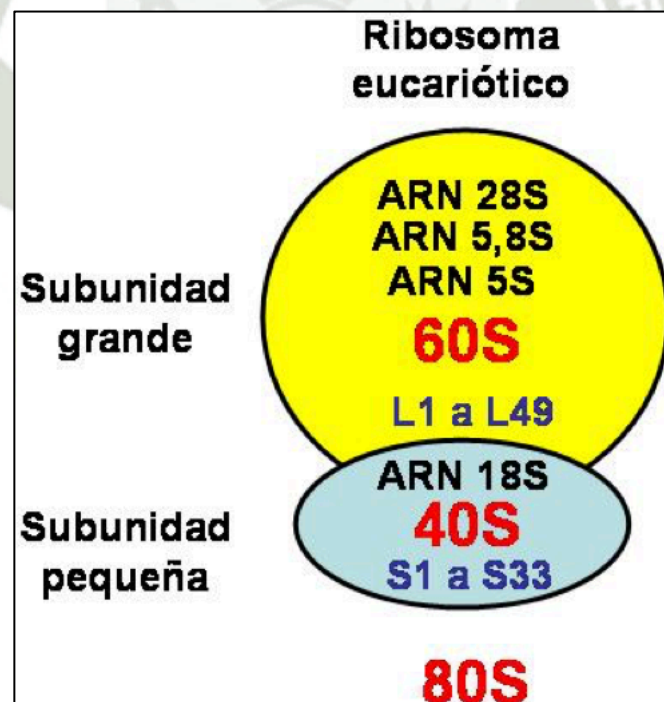


Ilustración 7: Subunidades de ribosomas eucariotas. (36)

2.1.9. ARNr 16S

Es un ARN que forma parte de los ribosomas mitocondriales. Este poli ribonucleótido se pliega y forma hélices. Es reconocida por ser un marcador universal ya

que se encuentra en todos los organismos conocidos. Su estructura se mantiene por largos periodos y posee variabilidad que permite diferencias especies o variedades. Al ser de 1500 nucleótidos, minimiza la variabilidad estadística. Es el responsable de codificar las pequeñas subunidades del ARN ribosomal que, mediante la traducción del ARN mensajero a proteínas, convierten los componentes celulares a partir de mensajes genéticos (37).

2.1.10. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en inglés (38), es una reacción enzimática *in vitro* que aprovecha la actividad de la enzima DNA-polimerasa, que se sintetiza de manera natural en ADN en las células (36). En la mayoría de trabajos con PCR se emplea una enzima especializada termoestable de 94kDa, aproximadamente, llamada Taq-polimerasa, obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus*, que permite amplificar una secuencia específica del ADN, copiando durante ciclos repetidos exactamente la secuencia inicial seleccionada (39). Esta enzima agrega nucleótidos en dirección 5'-3' a una velocidad de elongación de 2kb por minuto a temperaturas entre 72 y 75 grados Celsius, con presencia de iones de magnesio y deja extremos libres en 3'.

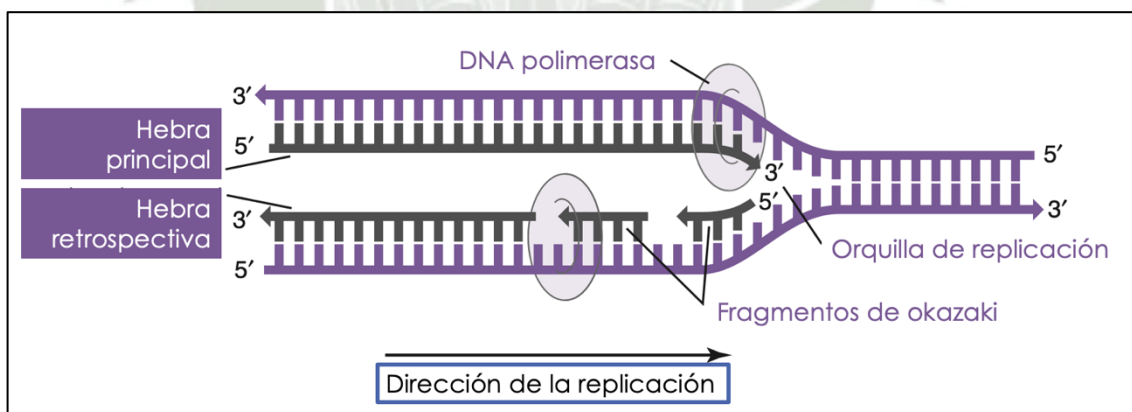


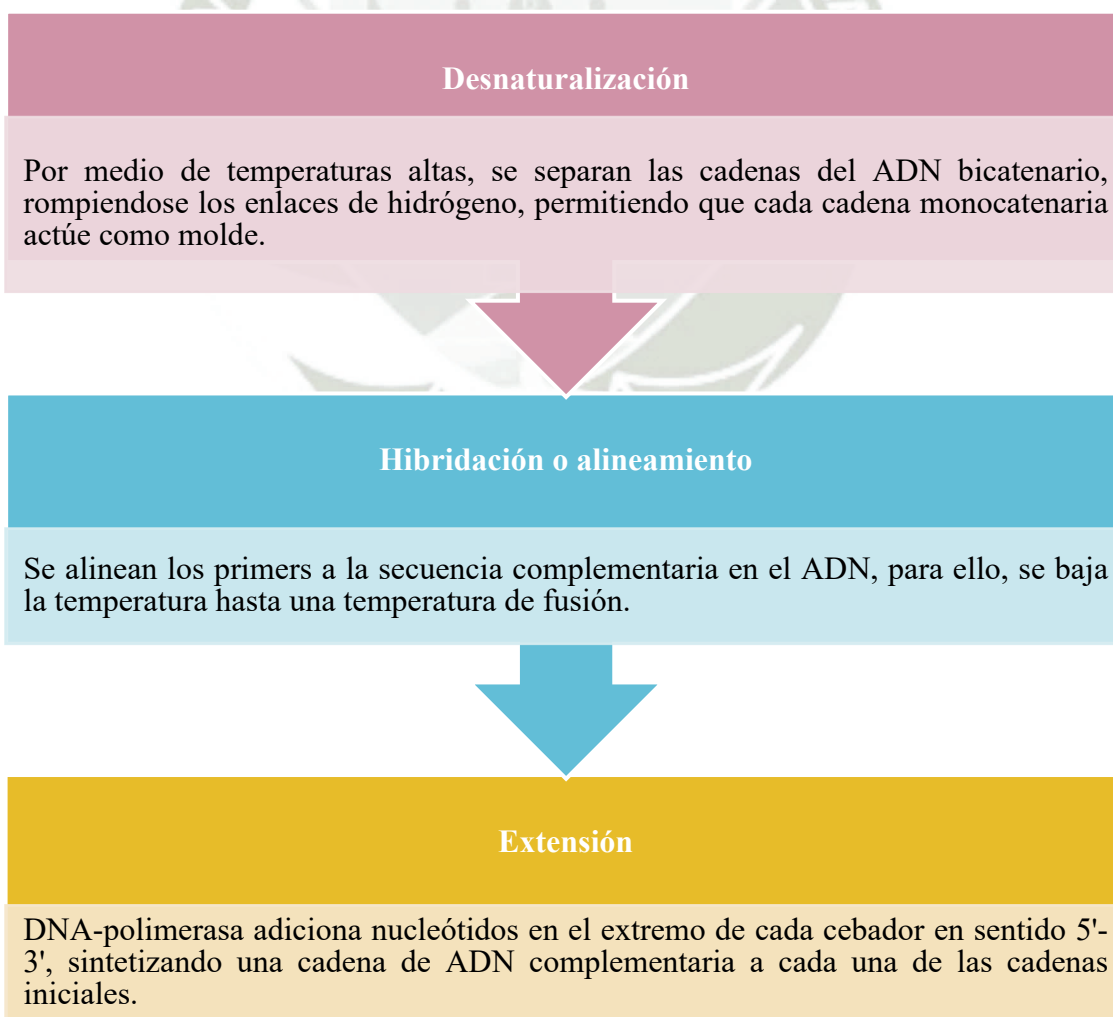
Ilustración 8: Replicación simultánea de ambas hebras de la doble hélice. Ambas hebras se leen en la dirección 3' a 5'. Una cadena orientada de 5' a 3' (la hebra retrospectiva) se lee de forma discontinua, con la polimerasa saltando hacia adelante y leyendo hacia la horquilla de replicación (40).

La enzima polimerasa añade nucleótidos complementarios en sentido 5' – 3' a la hebra molde, catalizando de esta manera la reacción de polimerización siendo resultante un fragmento de ADN bicatenario, es decir, de doble hélice. Para ello, se requieren

primers o cebadores que son secuencias de aproximadamente 20 pB (41) que son complementarias a los extremos 5' del fragmento que se desea amplificar, además, determinan el fragmento que se amplificará y son el punto donde se ancla la polimerasa al ADN. Es necesario que dichos primers se empleen en pareja:

- A. Forward: cebador denominado iniciador hacia adelante
- B. Reverse: cebador denominado iniciador reverso

Se realiza una desnaturalización inicial del DNA bicatenario por aumento de la temperatura, rompiéndose los puentes de hidrógeno permitiendo la obtención de ADN de cadena simple. Luego, se realiza la amplificación que consta de 3 pasos que se repiten entre 20 y 45 veces los ciclos hasta resultar en una acumulación exponencial del fragmento de DNA amplificado (39). La extensión final se realiza para que la polimerasa complete aquellos fragmentos incompletos. Cada ciclo tiene 3 etapas:



La amplificación es exponencial. Al finalizar la PCR, se obtienen abundantes copias de la secuencia deseada que está delimitada por los primers, siendo:

$$\text{número de copias resultantes} = 2^n$$

Donde:

n = número de ciclos

Se denomina PCR cualitativa cuando se emplea la PCR para determinar la presencia de un fragmento de ADN específico, por ejemplo, para identificar un patógeno. La PCR cuantitativa indica cuánto de dicho fragmento o secuencia específica se encuentra en la muestra, permitiendo la detección y su cuantificación (38).

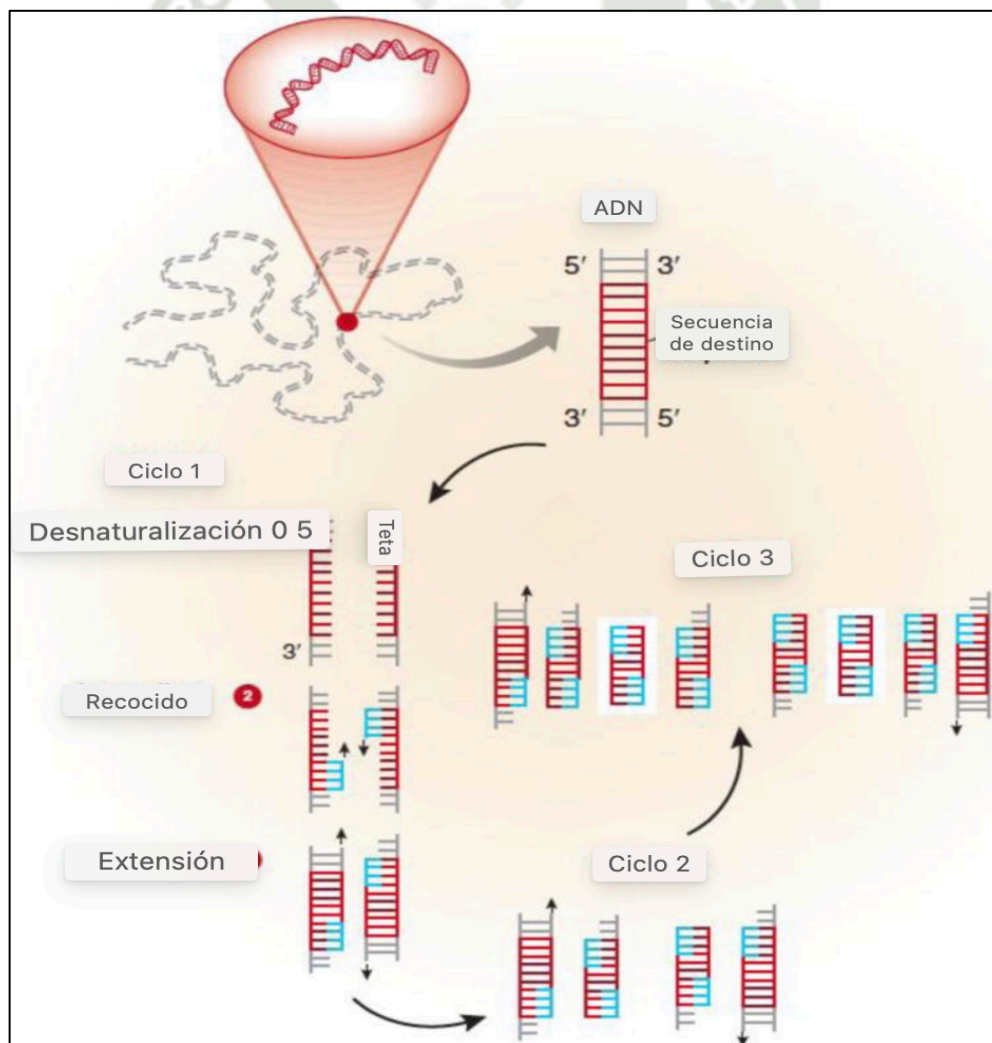


Ilustración 9: Presentación esquemática del principio de la PCR (38)

Se han desarrollado modificaciones del procedimiento anteriormente descrito, optimizando así las capacidades de diagnóstico de la PCR. A continuación, se describen algunas de ellas.

2.1.10.1. Nested PCR o PCR anidada

Se desarrolló en primera instancia para aumentar la sensibilidad de la PCR, siendo extremadamente alta en esta (39), mediante el empleo de 2 parejas de primers. En la primera ronda se emplea la técnica convencional con 2 primers más externos al fragmento deseado. Posteriormente, el resultado de la primera PCR se emplea como molde y se utiliza un par de cebadores internos al fragmento amplificado anteriormente, esta es una amplificación dual que eleva su sensibilidad. La probable contaminación cruzada que se da durante la transferencia del resultado de la primera ronda a otro tubo de reacción es la principal desventaja de esta técnica (39).

2.1.10.2. Seminested PCR o PCR semi-anidada

Este tipo de PCR es una variación en la anterior descrita, ya que, en lugar de emplear 2 parejas de primers, en la segunda ronda se repite uno de los primers de la primera ronda, haciendo un total de 3 primers.

2.1.10.3. PCR transcripción reversa (RT-PCR)

Se emplea para la detección de ARN.

2.1.10.4. PCR múltiple

Se emplean en el mismo tubo 2 o más parejas de primers específicos para diferentes ADN dianas, por lo que más de un ADN diana se puede detectar de manera simultánea, resultando en mayor eficacia para el diagnóstico de enfermedades mediante la supresión de la evaluación individual para cada ADN diana. Además puede usarse una PCR múltiple para incluir un control positivo de extracción de ADN y PCR en el caso de muestras que tengan ADN del hospedador y del patógeno, como la que se utilizó en esta investigación.

Existen principalmente 2 métodos para visualizar los productos de PCR.

- a. Se puede teñir con una solución colorante al producto de ADN que se amplificó (ver más adelante)
- b. Se puede etiquetar los primers o nucleótidos de la PCR con fluoróforos antes de amplificar el fragmento, permitiendo que las etiquetas sean incorporadas directamente en el producto de la PCR.

2.1.11. Electroforesis en geles de agarosa

Es el método más empleado para analizar el producto de la PCR. Esta técnica separa dicho producto en función de su tamaño. La agarosa es un polisacárido de alga marina que se gelatiniza al descender la temperatura después de disolverla con un amortiguador caliente.

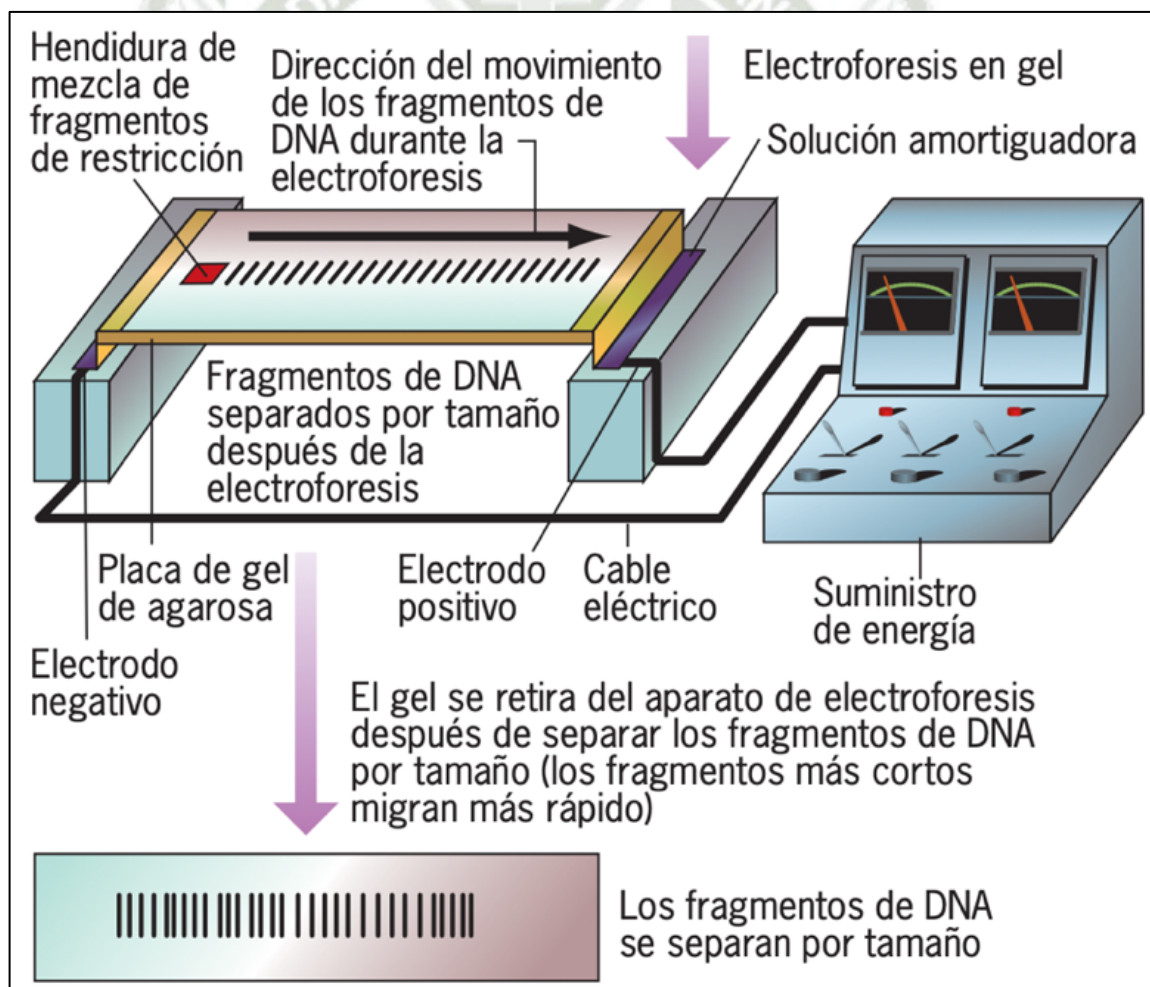


Ilustración 10: Separación de fragmentos de DNA por electroforesis en gel (32).

Para visualizar los fragmentos de ADN, se incluye en la matriz de agarosa un fluoróforo intercalante de ADN, o bien se empapa al gel en una solución de este fluoróforo luego de la corrida. El fluoróforo se intercala en la doble hélice y permite que las bandas de ADN denoten fluorescencia al observarse con radiación UV (32). El fluoróforo más usado en el pasado fue el bromuro de etidio, pero debido a sus efectos tóxicos y contaminantes del ambiente, actualmente se utilizan en la mayoría de los laboratorios sustancias más seguras.

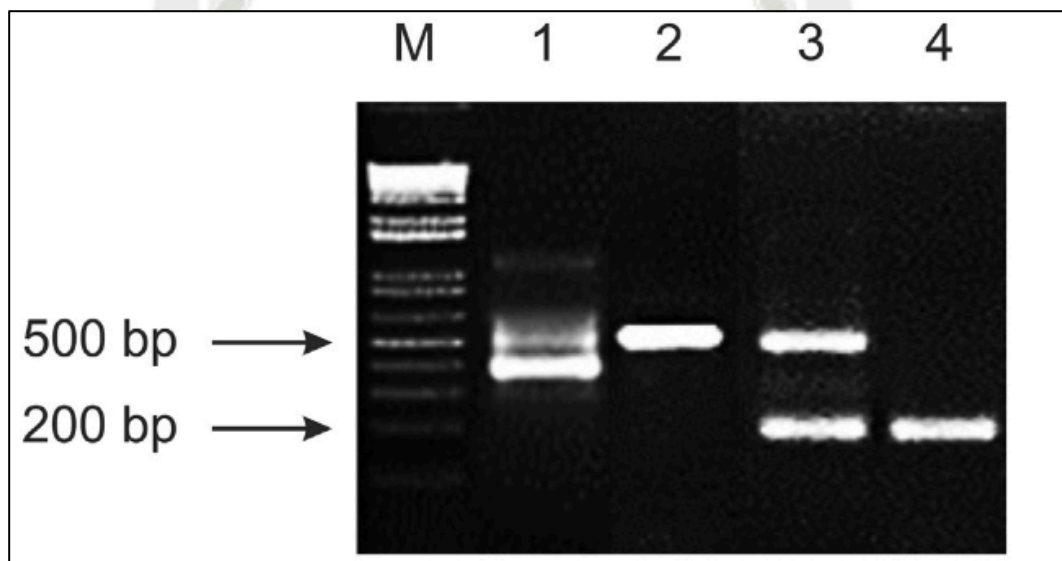


Ilustración 11: Detección molecular de ADN S. aucheniae por PCR semi-anidada. Se amplificaron fragmentos del gen 18S rRNA de S. aucheniae mediante PCR semi-anidada a partir de muestras de ADN de sangre de llama utilizando dos diferentes protocolos. Los carriles 1, 2 y 3 muestran resultados positivos, donde se ha obtenido una banda de 400 pB (calle 1) o de 550 pb (calles 2 y 3) correspondientes a S. aucheniae. En las calles 3 y 4 se agregaron a la mezcla primers para amplificar un fragmento del gen 16S de ARNr de CS, por lo que se obtiene una banda de 257 pb, correspondiente a ADN del hospedador. La calle 4 es negativa para S. aucheniae, por lo que solo se obtiene la banda correspondiente a ADN de llama (29).

2.2. Antecedentes de investigación

2.2.1. Análisis de tesis

Decker, C., 2019. “Avances en el conocimiento de la Sarcocistiosis de camélidos sudamericanos y desarrollo de herramientas para su control”.

En esta Tesis se enfocó en aumentar el conocimiento de la Sarcocistiosis de CS y en la búsqueda de herramientas para su control. Se desarrolló una PCR semi-anidada que detecta ADN de *S. aucheniae* con alta especificidad y sensibilidad. Con ella se pudo constatar por primera vez la presencia del parásito en la sangre de llamas, alpacas, guanacos y vicuñas. En un total de 225 muestras de sangre de llama recolectadas en Argentina y Bolivia, el 18,7 % resultaron positivas para *S. aucheniae*. No se encontró correlación entre detección molecular y edad, sexo o ubicación geográfica de los animales. Con este método, además, se detectó ADN de *S. aucheniae* en materia fecal de perros de Jujuy, apoyando la hipótesis que el perro es un hospedador definitivo del parásito. También se identificaron una serie de fracciones proteicas solubles en macroquistes de *S. aucheniae* que fueron reconocidas mayoritariamente por inmunoglobulinas IgG de llamas infestadas, lo cual las señala como candidatos para diagnóstico serológico que serán explorados a futuro. Asimismo, se hallaron evidencias de la transferencia pasiva de inmunoglobulinas IgG contra *S. aucheniae* a la cría. Finalmente, se secuenció y analizó el transcriptoma de bradizoítos de *S. aucheniae* para predecir: (i) el camino metabólico del glicosilfosfatidilinositol (GPI), (ii) el proteoma anclado por GPI y (iii) la toxina “sarcocistina”. Los GPIs tienen gran importancia en la biología de protozoos patógenos, y su síntesis es un potencial blanco terapéutico. Aquí, se identificaron 22 enzimas que participarían en la síntesis de una molécula de GPI compuesta por N-acetilglucosamina y tres manosas, y su transferencia a una proteína naciente. Por otra parte, las proteínas ancladas por GPI han sido caracterizadas en otros protozoos como altamente inmunogénicas y fueron empleadas como antígenos para diagnóstico serológico y vacunas. Se identificaron 25 proteínas ancladas por GPI, 6 de las cuales son especie-específicas y 13 son homólogas de las proteínas SAG de otros coccidios. Adicionalmente, se halló la proteína homóloga a la sarcocistina de *S. fayeri*, que posiblemente sea responsable de los cuadros de gastroenteritis mencionados. La presente Tesis aporta información original y relevante sobre *S. aucheniae*, un parásito prácticamente olvidado por la comunidad científica, así como herramientas para su

control, que pueden tener importantes implicancias para la explotación sustentable de CS y el fortalecimiento de las economías que dependen de este recurso (21).

Rojas, D., 2022. “Diagnóstico de *Sarcocystis aucheniae* por PCR semi-anidada en sangre de alpacas de la provincia de Huancavelica”.

El presente estudio tuvo como objetivo establecer la sensibilidad analítica y especificidad de la técnica molecular PCR semi-anidada para el diagnóstico de *S. aucheniae* en sangre de alpacas de la provincia de Huancavelica. Para determinar la sensibilidad analítica de la PCR semi-anidada se utilizó ADN genómico extraído de macroquistes de *S. aucheniae* con el que se realizó la prueba a concentraciones muy bajas (1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 1 pg, y 0.01 pg). La especificidad de la PCR semi-anidada se determinó al comparar la prueba molecular en sangre con el método de necropsia; para ello se colectó muestras de sangre de alpacas de Huancavelica (n=8) y de Cajamarca (n=7) de donde también se obtuvo ADN para análisis molecular, habiéndose inspeccionado previamente las carcasas de los animales. Se colectó 42 muestras adicionales de sangre de alpacas de Huancavelica con el fin de detectar el gen ARNr18S de *S. aucheniae* por PCR semi-anidada, teniendo como control positivo al ADN de macroquiste y como control negativo sangre de alpaca negativa al parásito. La sensibilidad analítica de la PCR semi-anidada tuvo como límite de detección 1 pg de ADN y la especificidad de la técnica fue de 80 %. El 32% de alpacas de Huancavelica fue positivo al parásito por PCR semi-anidada. Concluyeron que la PCR semi-anidada tuvo un buen límite de detección y alta especificidad para diagnosticar *S. aucheniae* en sangre de alpaca (35).

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

2.2.2. Análisis de trabajos de investigación

Carletti, T., et. al., 2013. “Molecular identification of *Sarcocystis aucheniae* as the macrocyst-forming parasite of llamas”.

Con el fin de verificar la identidad de las especies presentes en las ZEC de América del Sur, se amplificó por PCR el gen 18S rRNA completo y se secuenció a partir de ADN de macroquistes obtenido de tres llamas de los llanos andinos. Se llevó a cabo un análisis bayesiano filogenético utilizando las secuencias de ARNr 18S analizadas y disponibles de *Sarcocystis* spp. En el árbol construido, todas las nuevas secuencias del gen 18S rRNA segregadas en un solo clado junto con la secuencia del gen 18S rRNA reportada de una alpaca en Australia, lo que demuestra que el parásito aislado es *S. aucheniae*, y que este parásito infecta indiscriminadamente a ambos animales domésticos. SAC. Este trabajo representa la primera identificación molecular del agente causal de la Sarcocistiosis SAC en América del Sur, y puede contribuir al desarrollo de métodos de control para esta parasitosis desatendida (2).

Keywords: *Sarcocystis aucheniae*, Sarcocystosis, Macroscopic cyst, Molecular identification, Phylogenetic analysis, South American camelid

Regensburger, C., et al., 2015. "Morphological and Molecular Characteristics of *Sarcocystis aucheniae* Isolated from Meat of Guanaco (*Lama guanicoe*)".

El objetivo del presente estudio fue caracterizar morfológica y molecularmente *Sarcocystis* spp. produciendo quistes macroscópicos en guanacos (*Lama guanicoe*). Métodos: Se disecaron muestras de quistes macroscópicos de músculos de guanaco sacrificados en la provincia de Santa Cruz, Argentina. Las muestras fueron procesadas por microscopía electrónica de transmisión, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), estudios de clonación y secuenciación. Resultados: Las protuberancias villares de la pared del quiste eran irregulares con forma de "árbol" o "similar a una coliflor" que medían 3-4,5 μm de altura por 2,5-3,5 μm de ancho. Se obtuvo una secuencia génica completa de 18S rRNA consenso de 1875 pb y mostró la mayor identidad ($\geq 99\%$) con las secuencias de *S. aucheniae* notificadas en GenBank. La ultraestructura de la pared del quiste de quistes macroscópicos y el gen 18S rRNA obtenido de guanacos fueron idénticos y consistentes con las descripciones de *S. aucheniae*. Conclusión: Este estudio confirma que los guanacos están infectados por el mismo *Sarcocystis* spp. afectando a otras SAC,

denominadas *S. aucheniae*, y refuerzan la sugerencia de que la nominación de nuevas especies debe contener datos morfológicos y moleculares para alcanzar la validez. En el futuro, estos datos podrían ser útiles para obtener identificaciones adecuadas en la inspección post-mortem y útiles para mejorar la seguridad de la carne (42).

Martin, M. et. al., 2016. “Molecular detection of *Sarcocystis aucheniae* in the blood of llamas from Argentina”.

En esta investigación, se hipotetizó que es posible detectar ADN del parásito en la sangre de CS usando métodos moleculares. Para poner a prueba esta hipótesis, se diseñó una PCR semi-anidada que utiliza como blanco una región del gen 18S ARNr específica para *S. aucheniae*. Se optimizaron las condiciones de la PCR usando ADN genómico extraído de bradizoítos presentes en macroquistes. Se estableció un límite de detección de un parásito en 10 µl de sangre de llama, basado en muestras de ADN extraído de alícuotas de sangre de llama no infectada a las que se agregaron cantidades conocidas de bradizoítos de *S. aucheniae*. Más aún, la PCR semi-anidada permitió la detección de infecciones naturales por este parásito en muestras de sangre de llama de la Puna argentina. La amplificación específica de ADN de *S. aucheniae* fue corroborada por secuenciación de los productos de amplificación. Este es el primer reporte de la detección de *S. aucheniae* en sangre de llama. Además, este estudio contribuye una herramienta diagnóstica valiosa para estudios epidemiológicos y para la evaluación de la efectividad de medidas de control para esta parasitosis (43). **Palabras clave:** Sarcocistiosis; Camélidos sudamericanos; Diagnóstico molecular; PCR semi-anidada

Decker et. al., 2018. “Detection of *Sarcocystis aucheniae* in blood of llama using a duplex semi-nested PCR assay and its association with cyst infestation”.

Se diseñó una PCR dúplex semi-anidada para detectar simultáneamente ADN de parásitos y llamas en muestras de sangre del huésped. Regiones específicas de especie de S. Se amplificaron el gen *aucheniae*18S rRNA y el gen *Lama glama*16Smitochondrial,

produciendo bandas de 583 y 257 pb, respectivamente, y se separaron mediante electroforesis en gel. El método demostró ser altamente sensible, con un límite de detección inferior a un parásito por mililitro de sangre, y la inclusión de cebadores para detectar ADN específico de llama resultó útil como control metodológico. Las muestras de sangre recolectadas de llamas de Argentina y Bolivia (n=225) fueron analizadas por este método y el 18,7 % resultaron positivos para *S. aucheniae*. No se encontró correlación entre los resultados de PCR y la edad de la llama, el sexo o el hallazgo de quistes macroscópicos en la carne después del sacrificio. La falta de detección molecular en la sangre de algunas llamas que albergan macroquistes sugiere que la circulación del parásito en el torrente sanguíneo después del enquistamiento está por debajo del umbral de detección de la prueba o incluso está ausente, mientras que los resultados positivos de PCR en animales infestados con quistes sugieren que la exposición previa al parásito no impide infecciones posteriores. El método descrito puede ser útil para detectar focos activos de infección, evaluar la efectividad de tratamientos parasiticidas y para la vigilancia y rastreo de huéspedes definitivos (29).

Palabras clave: Microbiología, Biología molecular, Bioinformática



CAPITULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Localización del trabajo

3.1.1.1. Espacial

El muestreo de campo se realizó en el Centro de Desarrollo Alpaquero de Tocra (CEDAT) del Centro de Estudios y Promoción del Desarrollo del Sur (DESCOSUR), en el anexo de Tocra del distrito de Yanque, provincia de Caylloma, departamento de Arequipa. Geográficamente ubicada en las coordenadas 15.85315° S, 71.43420° O a una altitud de 4400 msnm.

El estudio molecular de ADN se realizó en el Laboratorio de Investigación de Biotecnología y Reproducción Animal del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María en el campus del fundo La Banda de Huasacache, localizado en el distrito de Hunter. Departamento de Arequipa, unificado geográficamente en -16.458238 , -71.565617 .

3.1.1.2. Temporal

El muestreo de sangre de alpaca se realizó durante un periodo de 10 meses entre julio del año 2023 a abril del 2024. El trabajo de laboratorio se realizó entre abril a agosto del 2024.

3.1.2. Materiales biológicos

Se emplearon muestras sanguíneas de alpacas.

3.1.3. Materiales de laboratorio

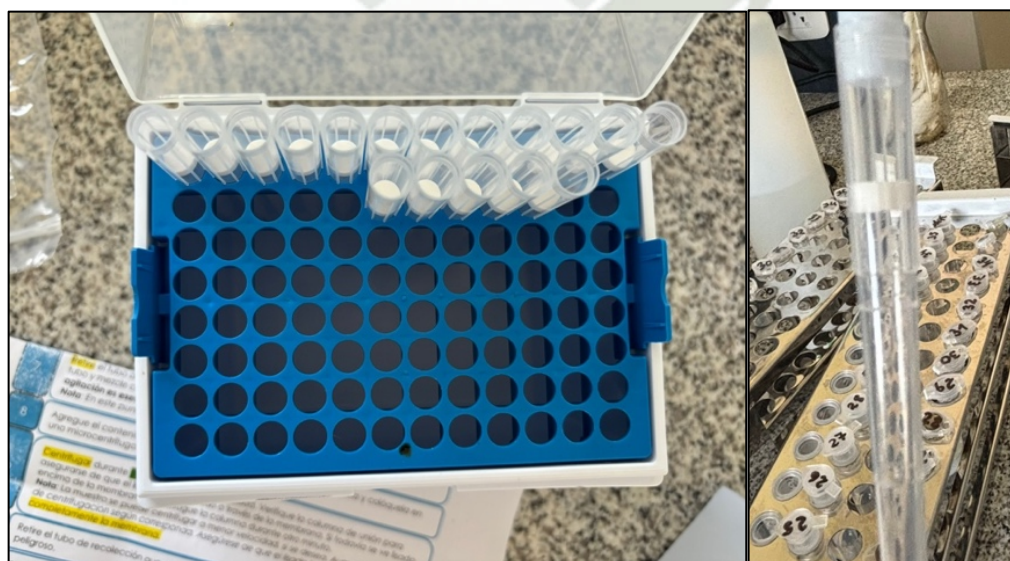
3.1.3.1. Para extracción de ADN

- Kit de extracción de ADN en sangre (ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System), marca Promega.
 - Buffer de lisis celular
 - Buffer de unión

- Solución de lavado
- Proteinasa K
- Agua libre de nucleasas
- Tubos colectores
- Mini columnas
- Micropipetas de 1000 μ L y 200 μ L.
- Tips con filtro de 1000 μ L y 200 μ L.
- Racks de laboratorio
- Tubos eppendorf de 2ml.



Fotografía 2: Izquierda a derecha: Kit de extracción de ADN de Promega, Reactivos para la extracción



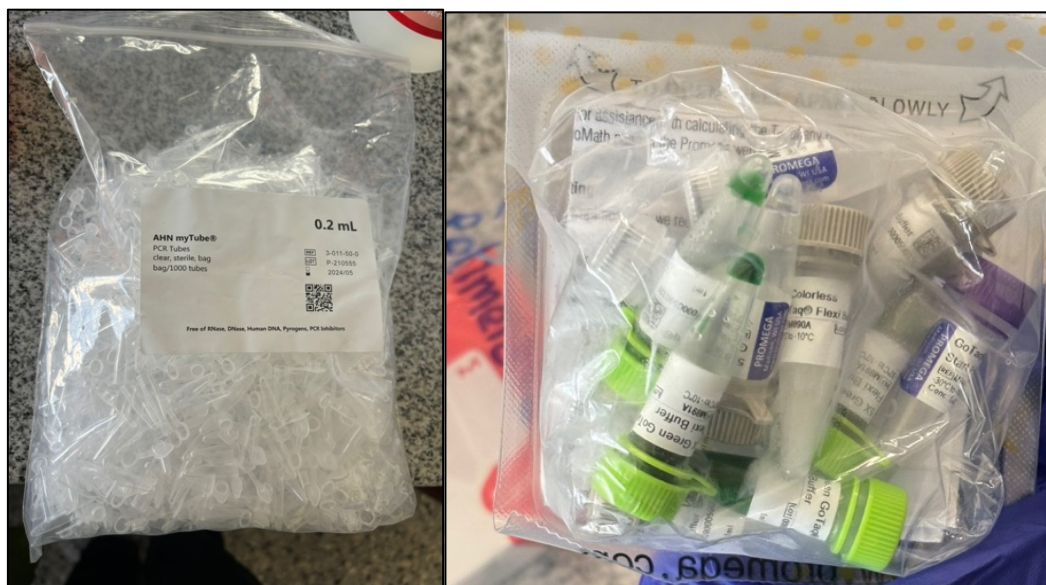
Fotografía 3: Izquierda a derecha: Tips con filtro de 1ml. Detalle del filtro



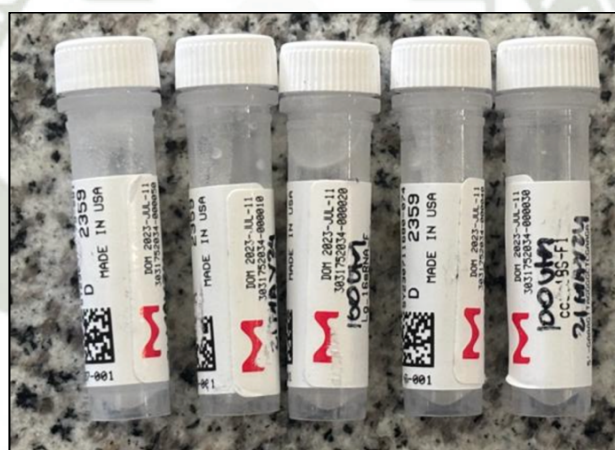
Fotografía 4: Pipeta de 1000 µL (superior) y pipeta de 200µL (inferior)

3.1.3.2. Para PCR

- Primer Ig_16SRNA_F.
- Primer Ig_16SRNA_F.
- Primer Sauch-R.
- Primer Cocc18S-F1.
- Primer Cocc18S-F2.
- Kit de GoTaq® G2 Hot Start Taq Polymerase, marca Promega.
 - o GoTaq® G2 Hot Start Taq Polymerase
 - o Buffer verde 5X
 - o Buffer sin color 5X
 - o MgCl₂
- dNTP mix, marca Promega.
- Agua libre de nucleasas.
- Micropipetas de 200 µL, 100 µL, 10 µL, 2 µL.
- Tips con filtro de 200 µL y 100 µL, 10 µL.
- Racks de laboratorio.
- Tubos eppendorf para PCR de 200 µL



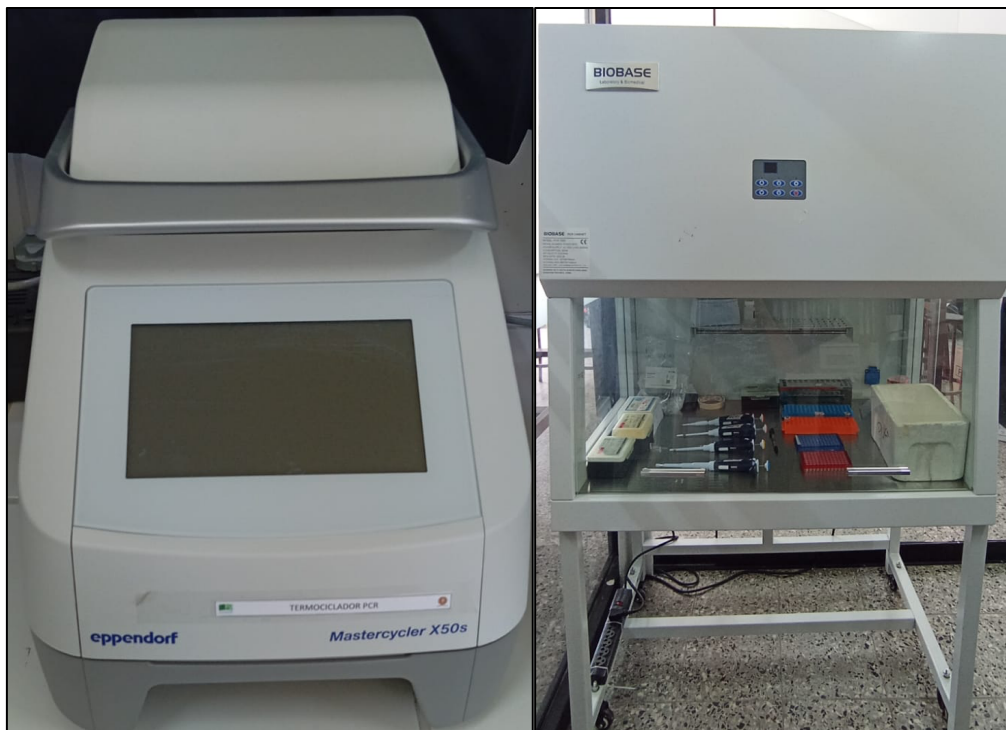
Fotografía 5: Izquierda a derecha: Tubos eppendorf para PCR de 200 μ L Reactivos de Kit de GoTaq® G2 Hot Start Taq Polymerase, marca Promega



Fotografía 6: Primers o cebadores requeridos para PCR



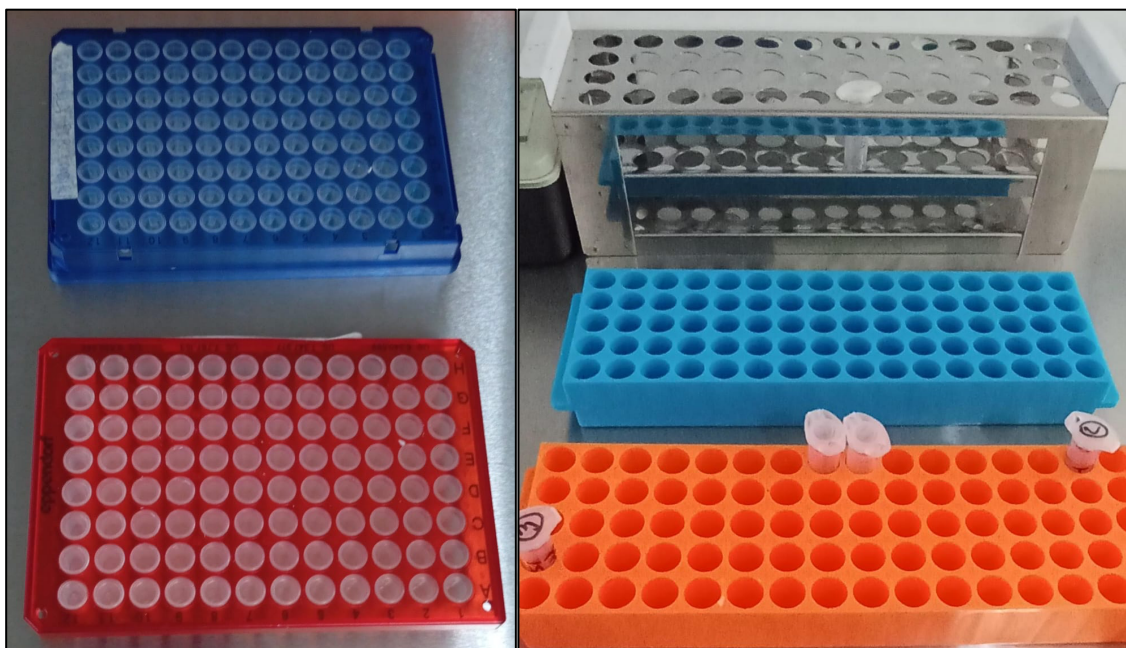
Fotografía 7: Reactivos requeridos para PCR (de izquierda a derecha: dNTP mix, GoTaq Hot start polymerase, 5X green flexi buffer, MgCl₂)



Fotografía 8: Izquierda a derecha: Termociclador marca Eppendorf. Cabina de Flujo laminar



Fotografía 9: Izquierda a derecha: Pipeta de 1000 µL, pipeta de 200µL, pipeta de 10µL, pipeta de 2µL



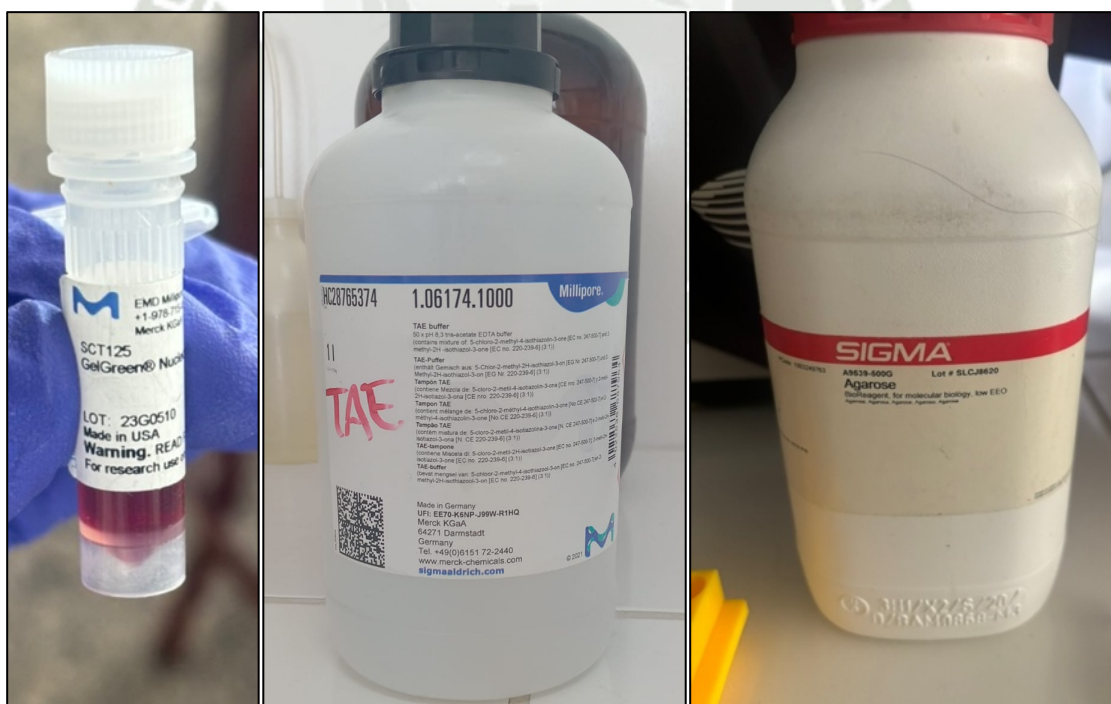
Fotografía 10: Izquierda a derecha: Racks para microtubos eppendorf de PCR. Racks para tubos eppendorf de 2ml

3.1.3.3. Para electroforesis

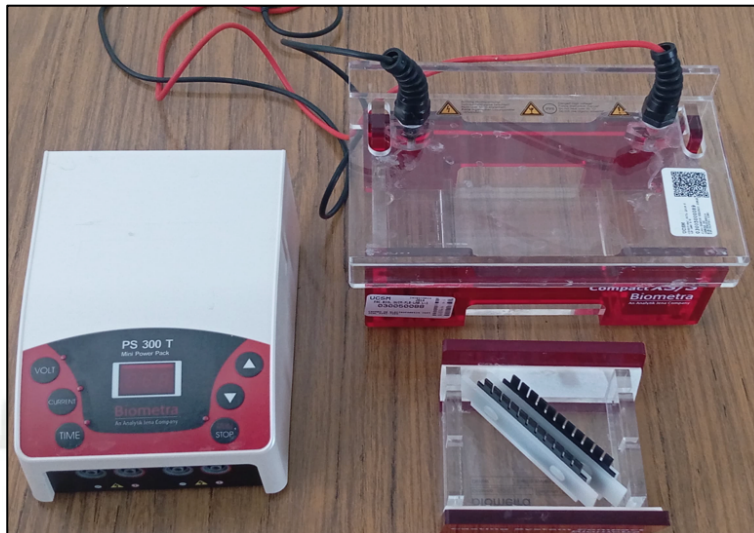
- Buffer TAE 50X.
- Agua destilada.
- GelGreen® Nucleic Acid Stain 10000X Water, marca Merck
- Agarosa
- Marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder, marca Promega.
- Blue/Orange Loading Dye 6X, marca Promega.
- Agua libre de nucleasas
- Micropipeta de 10 μ L y 5 μ L.
- Tips con filtro de 10 μ L.
- Racks de laboratorio.
- Matraz Erlenmeyer de 250ml
- Probeta graduada de 100ml.
- Fiola de 1L.



Fotografía 11: Probeta graduada de 100ml, matraz Erlenmeyer de 250ml, tips con filtro de 10 uL, pipeta de 5 uL y agarosa



Fotografía 12: Izquierda a derecha: GelGreen nucleic acid stain 10000X. Buffer TAE 50X. Agarosa



Fotografía 13: Cámara de electroforesis junto con fuente de poder



Fotografía 14: Microondas

3.1.3.4. Para visualización de geles de agarosa

- Transiluminador de luz UV



Fotografía 15: Transiluminador de luz UV

3.1.4. Materiales de campo

3.1.4.1. Extracción de muestras sanguíneas

- Tubos vacutainer con citrato de sodio (tapa celeste).
- Sistema vacutainer.
- Agujas vacutainer.
- Algodón.
- Alcohol 70%
- Agua oxigenada.
- Racks para tubos.
- Termómetro.
- Cooler con gel packs.
- Maletín.
- Marcador indeleble.
- Marcador de ganado.

3.1.5. Equipos y maquinarias

- Cámara de flujo laminar.
- Vórtex.
- Microcentrífuga.
- Baño termostatzado.
- Cámara de electroforesis horizontal.
- Refrigeradora.
- Congeladora.

3.1.6. Otros materiales

- Lejia
- Papel toalla.
- Bata de laboratorio.
- Cinta masking blanca.
- Marcador indeleble grueso y delgado.
- Bolsas herméticas.
- Papel parafilm

3.1.7. Indumentaria y equipo de protección personal

- Guantes de nitrilo.
- Bata de laboratorio.
- Barbijo.
- Mameluco.
- Botas.
- Gorro.

3.2. Métodos

3.2.1. Muestreo

3.2.1.1. Universo

Según el IV Censo Nacional Agropecuario (CENAGRO), la población de alpacas a nivel nacional se encuentra distribuida en 17 departamentos, donde los de mayor producción son Puno con 1459903 ejemplares, Cusco con 545454 ejemplares y Arequipa con 468392 ejemplares (44).

3.2.1.2. Tamaño de muestra

Para el cálculo del tamaño de muestra, se determinó un 90% de confianza, por lo tanto, el error aleatorio tolerado es del 10%, empleándose la fórmula para poblaciones de más de 10000 ejemplares, siendo la siguiente:

$$n = \frac{Z^2 * p * q}{e^2}$$

Donde:

n = tamaño de muestra

Z = valor estándar de confiabilidad (90%)

p = Probabilidad de que ocurra el evento estudiado (90%).

q = Probabilidad de que no ocurra el evento estudiado (10%)

e = Error de estimación máximo aceptado (10%)

Reemplazando:

$$n = \frac{1.65^2 * 0.9 * 0.1}{0.1^2}$$

$$n = \frac{0.245025}{0.01}$$

$$n = 25$$

Por el tipo de investigación, se consideró 38 animales machos de diferentes edades que representan las unidades experimentales, observaciones o repeticiones de estudio, de los cuales se realizó un trabajo de investigación transversal mensual, haciendo un total de 281 muestras de sangre entera.

3.2.1.3. Procedimiento de muestreo

Mediante un método aleatorio simple, se seleccionaron 38 animales machos, clínicamente sanos para el desarrollo de la presente investigación.

3.2.1.3.1. Toma de muestras sanguíneas

Se visitó de manera periódicamente, cada 27 a 30 días, en entre los meses de julio 2023 a abril 2024, y se recolectaron 281 muestras de sangre de alpacas del Centro de Desarrollo Alpaquero de Tocra (CEDAT) del Centro de Estudios y Promoción del Desarrollo del Sur (DESCOSUR), en el distrito de Yanque, provincia de Caylloma, departamento de Arequipa a una altitud de 4400 msnm. En las instalaciones se realizó lo siguiente:

1. Se movilizó a la majada de machos hacia las instalaciones de trabajo que contaba con corrales de aparto y aislamiento. Se distribuyó los animales en corrales de aislamiento para facilitar su manejo, identificación y toma de muestra de sangre.
2. Se sujetó a cada alpaca y se verificó el número de identificación del arete para anotarlos en fichas de registro, verificando la inclusión del animal en el estudio
3. Se realizó la antisepsia de la zona para punción yugular y procedio a su localización Hay dos localizaciones:
 - a. Región caudoventral cervical, palpando las láminas o procesos ventrales de las vértebras cervicales, siendo los más prominentes C5 y C6. Se palpa con dedo pulgar y se desliza hacia la depresión medial donde se encuentra

la vena yugular entre el músculo esternocéfálico y el proceso ventral (45). Se realizan pulsos de presión para facilitar su identificación y la punción se realiza inmediatamente craneal al lugar de compresión en un ángulo de 45° , aproximadamente, al plano cutáneo. La ventaja es que la piel es de 5mm de grosor aproximadamente y que el cuello es estable si el animal mueve la cabeza, La desventaja radica en que la carótida y la yugular son muy próximas, el operador debe estar más cerca al suelo y en peligro potencial.

- b. A nivel de la mandíbula, 3 a 4 cm del ángulo mandibular. Se incide en piel, músculo platisma y, algunas veces, glándula salival parótida (45). La ventaja es que la vena se encuentra en un plano más superficial que el músculo esternocéfálico y no tan próxima a carótida, como lo es en la región caudoventral del cuello. La desventaja es que el animal puede mover la cabeza si no está correctamente sujetado y que la piel es de 1cm de grosor, aproximadamente.

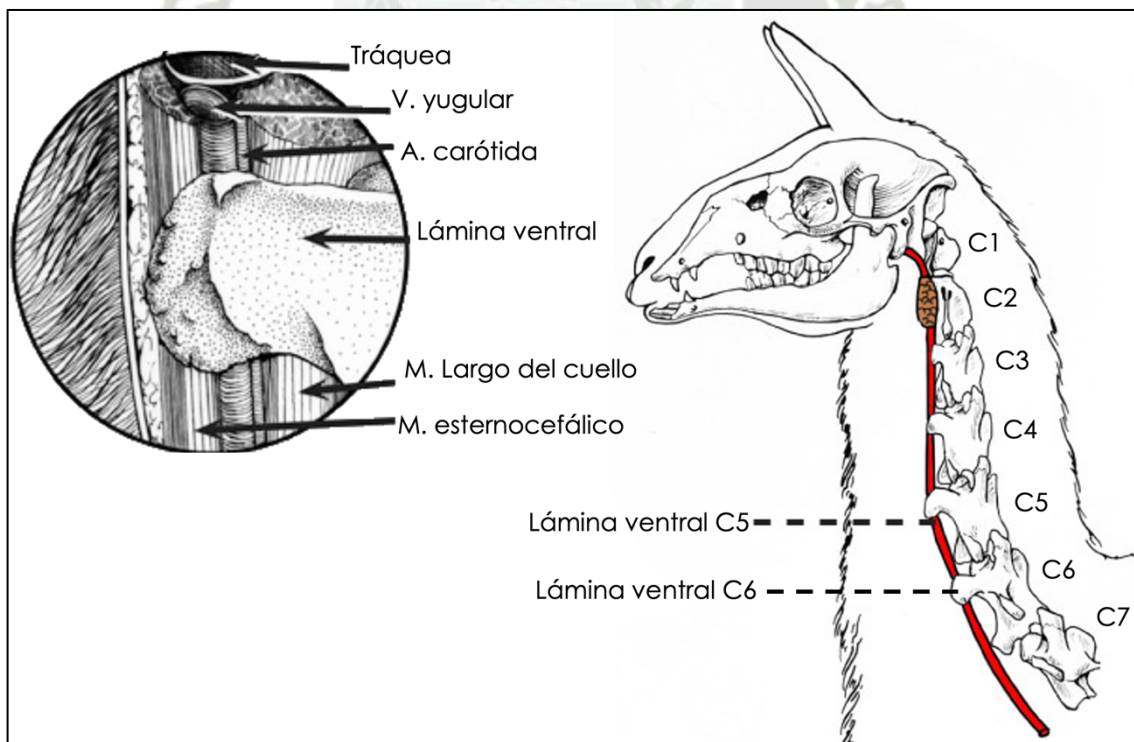


Ilustración 12: Lugar de punción a la altura de vértebras cervicales 5 y 6. Adaptado de (45)

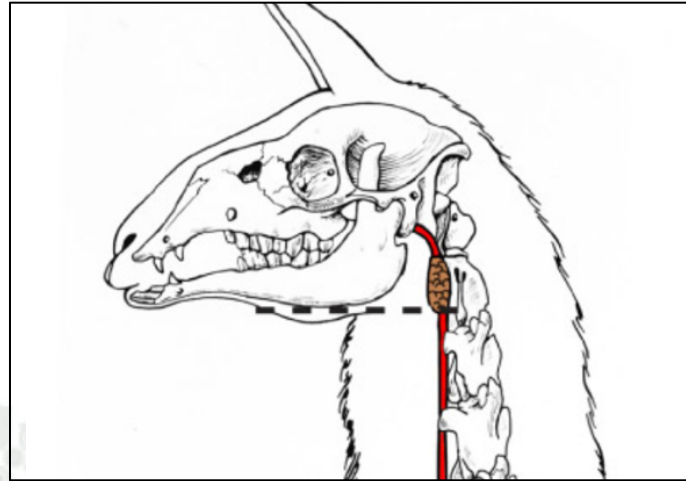


Ilustración 13: Lugar de punción en ángulo mandibular, se representó a la glándula salival parótida (45)

4. La sangre venosa de alpaca posee mayores concentraciones de oxihemoglobina (45) lo que le da un color más rojo. Se distingue de la arterial por el flujo pulsátil.
5. Para la localización se palpó con el pulgar de la mano no dominante la lámina ventral de C6 o C5 y se apoyó el resto de dedos en el ángulo del cuello.
6. Se armó el sistema vacutainer y se realizó la venopunción con el bisel de la aguja hacia dorsal y se dirigió la aguja hacia la cabeza del animal.
7. Luego, se colocó el tubo vacutainer con anticoagulante de citrato de sodio.
8. Se homogeneizó cada muestra y se conservó a 4 °C en gradillas.
9. Se señaló cada alpaca muestreada con marcador para ganado.
10. Al finalizar, se movilizaron a las alpacas hacia su corral de pastoreo.



Fotografía 16: Izquierda a derecha: Ingreso al centro de desarrollo alpaquero de Toca. Corrales de aparte y aislamiento de alpacas



Fotografía 17: : Izquierda a derecha: Alpacas ingresando a corrales. Alpacas ubicadas dentro de corrales de aislamiento en grupos de 7 individuos como máximo



Fotografía 18: Distribución de las alpacas en corrales de aislamiento para mejor manejo



Fotografía 19: Indumentaria necesaria para campo



Fotografía 20: Izquierda a derecha: Maletín de campo. Materiales para toma de muestras sanguíneas



Fotografía 21: Izquierda a derecha: Marcador de ganado. Señalización en la frente de alpacas que fueron muestreadas. Alpaca señalizada



Fotografía 22: Izquierda a derecha: Visualización de arete de alpaca. Registro de número de arete, fecha y otros



Fotografía 23: Izquierda a derecha: Sujeción correcta de alpaca. Inmovilización de alpaca para toma de muestra sanguínea de yugular



Fotografía 24: Izquierda a derecha: Localización de vena yugular. Punción para toma de muestra sanguínea de vena yugular



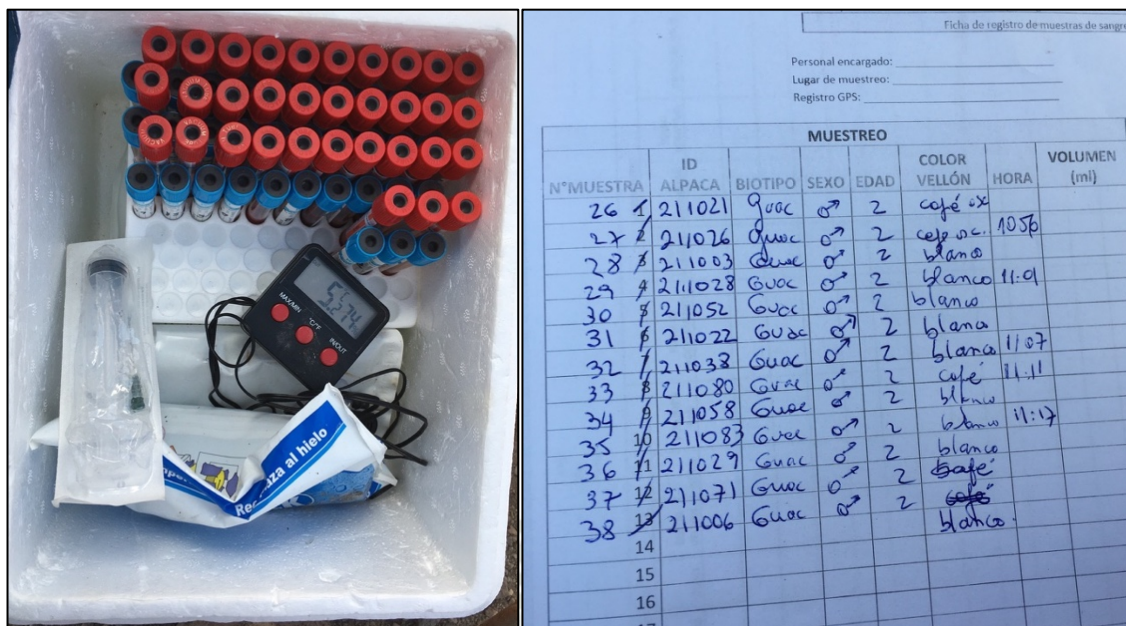
Fotografía 25: Izquierda a derecha: Localización de vena yugular en alpaca suri. Toma de muestra sanguínea en tubo Vacutainer con tapa celeste



*Fotografía 26: Izquierda a derecha: Antisepsia de la zona yugular con alcohol.
Colocación de aguja de Vacutainer en yugular junto con capuchón*



*Fotografía 27: Izquierda a derecha: Colocación de tubo con anticoagulante en sistema .
Toma de muestra. La sangre fluye por presión negativa del sistema*



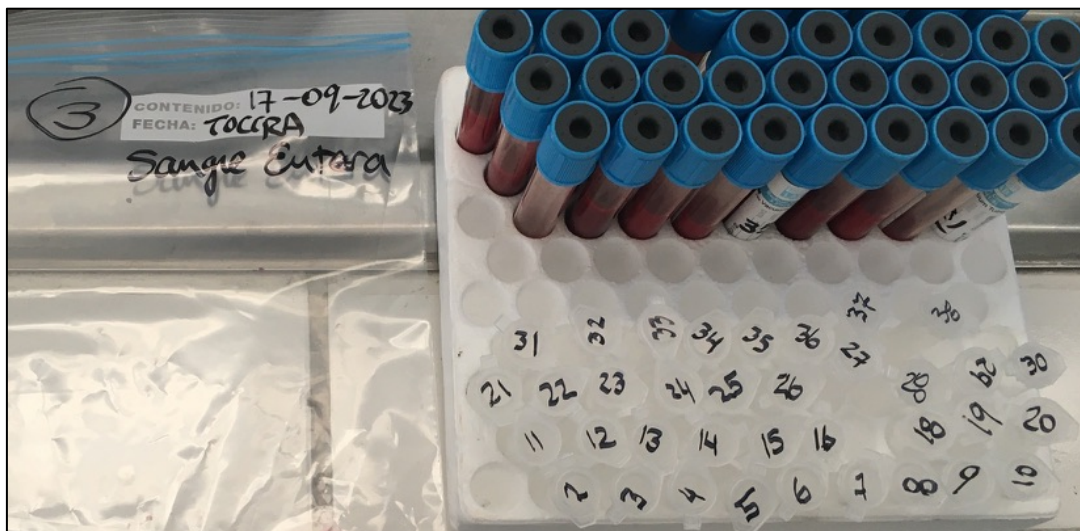
Fotografía 28: Izquierda a derecha: Almacenamiento de muestras con geles refrigerantes. Ficha de registro de campo llena



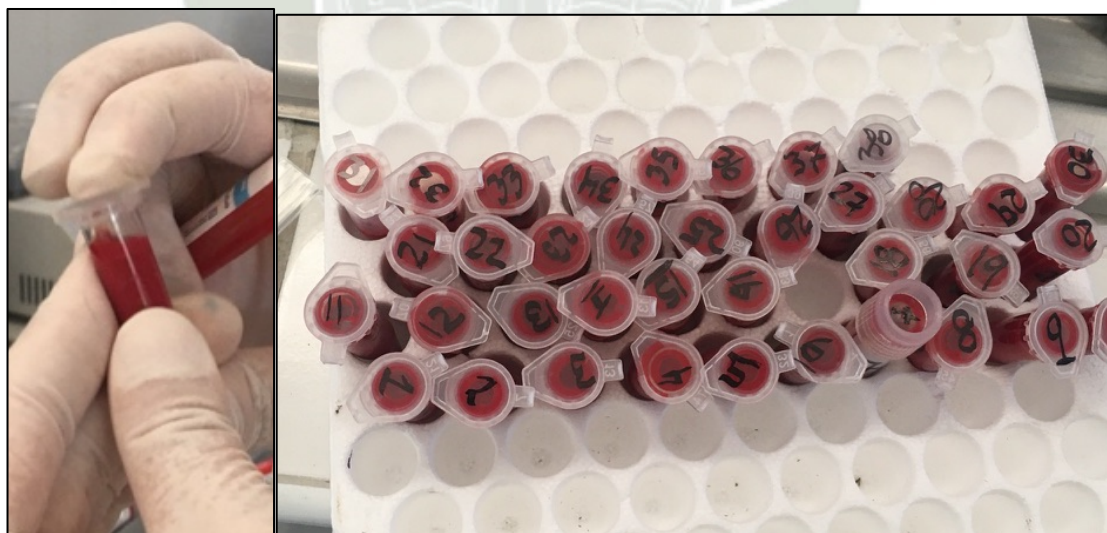
Fotografía 29: Izquierda a derecha: Liberación de alpacas de corrales. Alpacas siendo dirigidas a zona de pastoreo

3.2.2.1.1. Almacenamiento de las muestras

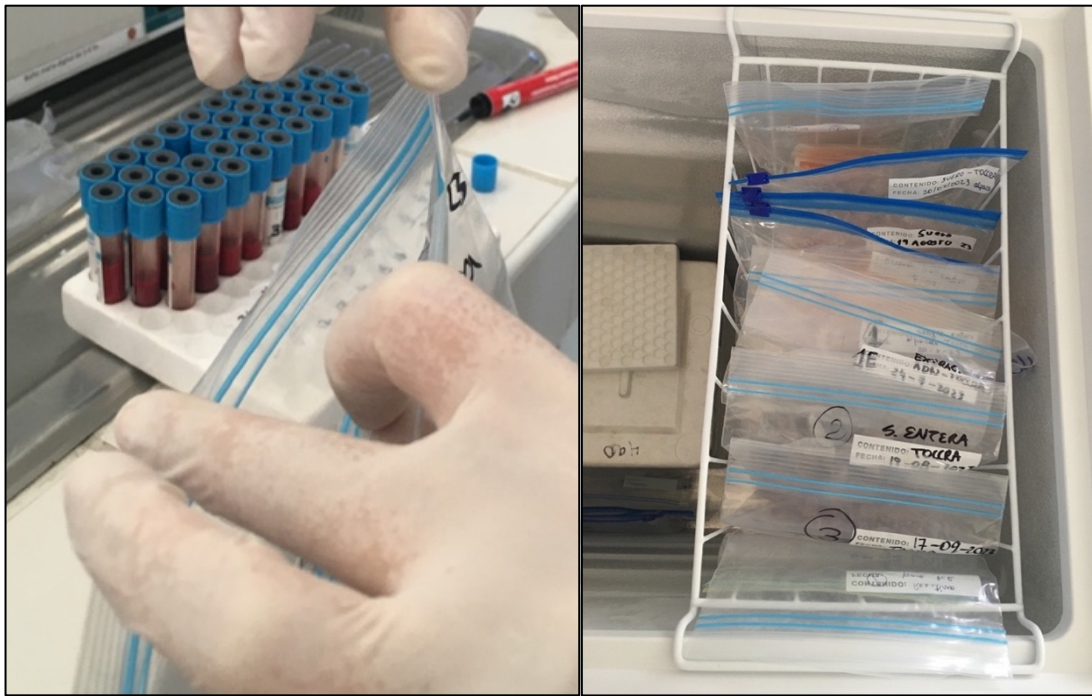
Las muestras sanguíneas se colocaron en tubos eppendorf de 2 ml con su respectivo rótulo, posteriormente se colocaron en bolsas herméticas para ser refrigeradas a -20°C .



Fotografía 30: Tubos Vacutainer con muestras de las alpacas y tubos eppendorf de 2ml rotulados



Fotografía 31: Izquierda a derecha: Muestra sanguínea en tubo vacutainer rotulado. Muestras rotuladas



Fotografía 32: Izquierda a derecha: Colocación de tubos eppendorf en bolsa hermética. Congelación de muestras en bolsas individuales por mes

3.2.2. Métodos de evaluación

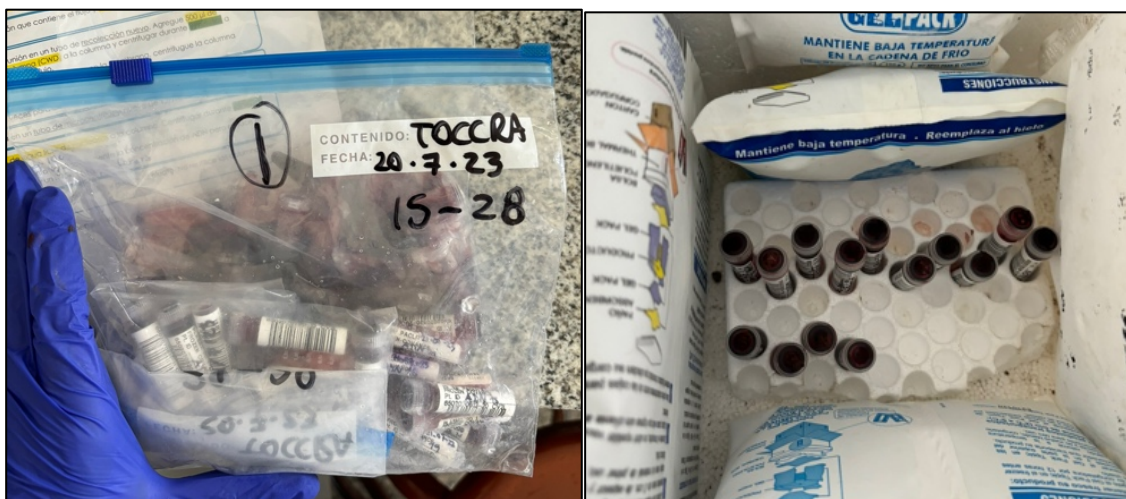
3.2.2.1. Metodología de la experimentación

3.2.2.1.1. Extracción de ADN

Se empleó el kit de extracción “ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System” para 100 muestras y se siguió el protocolo indicado por la empresa fabricante. A continuación, se detalla dicho procedimiento.

1. Se mezcló la muestra de sangre durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente. Si la sangre se había congelado, primero se descongeló completamente.
2. Se rotularon con marcador permanente y cinta los tubos de microcentrífuga de 1,5ml según el código de las muestras.
3. Se colocó 20 μ l de solución de proteinasa K (PK) en un tubo de microcentrífuga de 1,5ml.
4. Se agregó 200 μ l de sangre al tubo que contiene la solución de proteinasa K (PK) y se mezcló durante 10 segundos en vórtex.

5. Se agregó 200 μ l de tampón de lisis celular (CLD) al tubo. Se mezcló durante 10 segundos en vórtex. Este paso de agitación se considera esencial para obtener buenos resultados.
6. Se incubó a 56°C en durante 10 minutos en baño termostatzado.
7. Se rotularon las columnas de unión ReliaPrep™ y se colocaron en un tubo de recolección vacío.
8. Se retiró el tubo de la incubación y se agregó 250 μ l de tampón de unión (BBA), luego, se mezcló durante 10 segundos con vórtex. Este paso de agitación es esencial. En este punto, es importante que el lisado sea de color verde oscuro.
9. Se agregó el contenido del tubo a la columna de unión y se colocó en una microcentrífuga contrapesando cada columna. Se centrifugó durante 1 minuto a 12000 rpm (revoluciones por minuto).
10. Se verificó que el lisado haya pasado completamente a través de la columna de unión. De ser el caso que todavía se viera lisado encima de la membrana, se debe centrifugar durante otro minuto.
11. Se retiraron las columnas de la microcentrífuga y se desechó el líquido como residuo peligroso.
12. La columna de unión se colocó en un tubo de recolección nuevo y se agregó 500 μ l de solución de lavado de columna (CWD) a la columna. Luego, se centrifugó durante 3 minutos a 12000 rpm y al terminar, se desechó el líquido. Si quedaba algo de la solución de lavado en la membrana, se centrifugó la columna durante un minuto más.
13. Se repitió el paso 11 dos veces para un total de tres lavados.
14. Al terminar los lavados, se colocó la columna en un tubo de microcentrífuga nuevo de 1,5 ml debidamente rotulado.
15. Se agregó 100 μ l de agua libre de nucleasas a la columna, el rango es de 50 a 200 μ l. Posteriormente, se centrifugó durante 1 minuto a 12000 rpm.
16. Se desechó la columna de unión y se guardó el eluato completamente cerrado en bolsas ziploc a -20 °C hasta su próximo uso.



Fotografía 33: Izquierda a derecha: Muestras congeladas del mes de julio 2023.
Descongelamiento gradual de muestras .



Fotografía 34: Calentamiento de muestras a 56 grados celsius



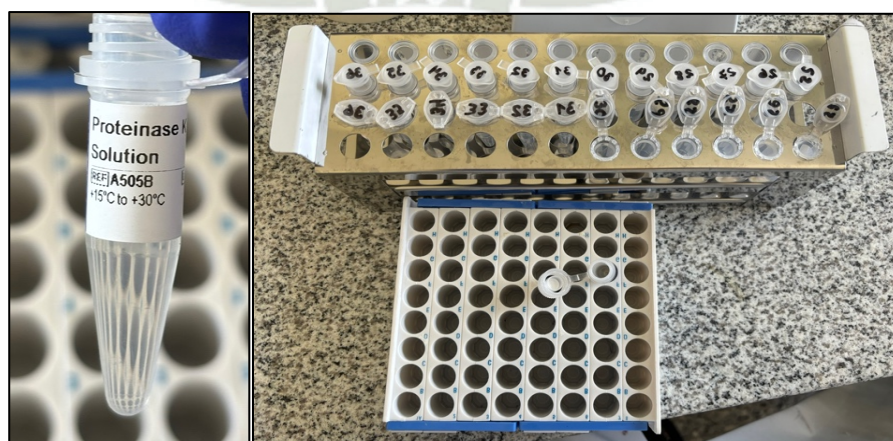
Fotografía 35: Muestras por extraer ADN con sus respectivos tubos eppendorf para mezcla



Fotografía 36: Izquierda a derecha: Tubos colectores para lavados y tubos de eppendorf para elución. Columnas de kit de extracción en tubos colectores



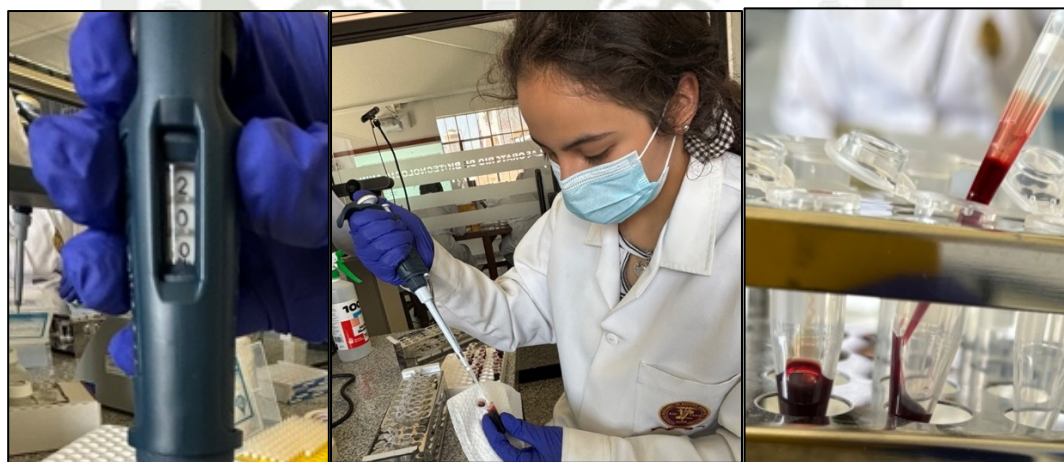
Fotografía 37: Izquierda a derecha: Rótulo de tubos eppendorf. Cinta adhesiva en tubo eppendorf. Tubo rotulado



Fotografía 38: Izquierda a derecha: Proteinasa K. Tubos eppendorf con proteinasa K



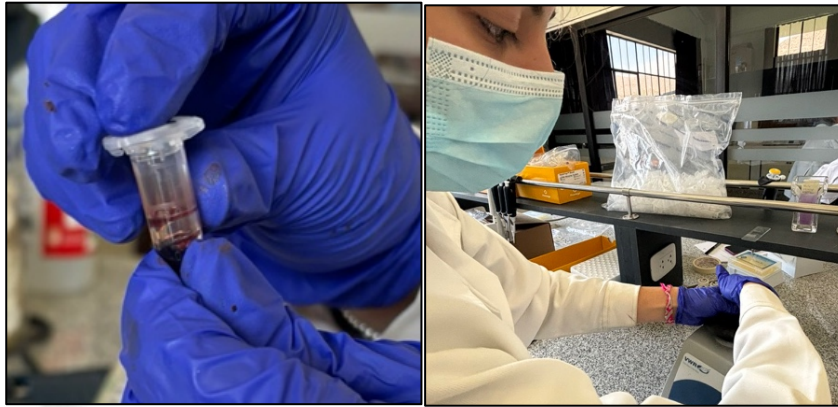
Fotografía 39: Izquierda a derecha: Extracción de proteinasa K. Colocación de proteinasa K en tubos eppendorf



Fotografía 40: Izquierda a derecha: Micropipeta señalada en 200 microlitro. Extracción de muestra sanguínea. Colocación de muestra sanguínea en tubo eppendorf



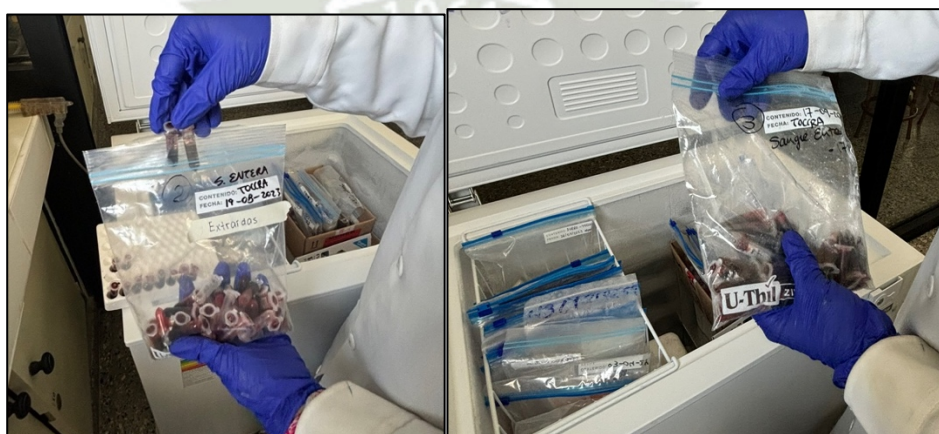
Fotografía 41: Izquierda a derecha: Extracción de buffer de lisis ceular. Colocación de buffer de lisis en tubos eppendorf



Fotografía 42: Izquierda a derecha: Cerrado de tubo eppendorf. Vortex de la mezcla



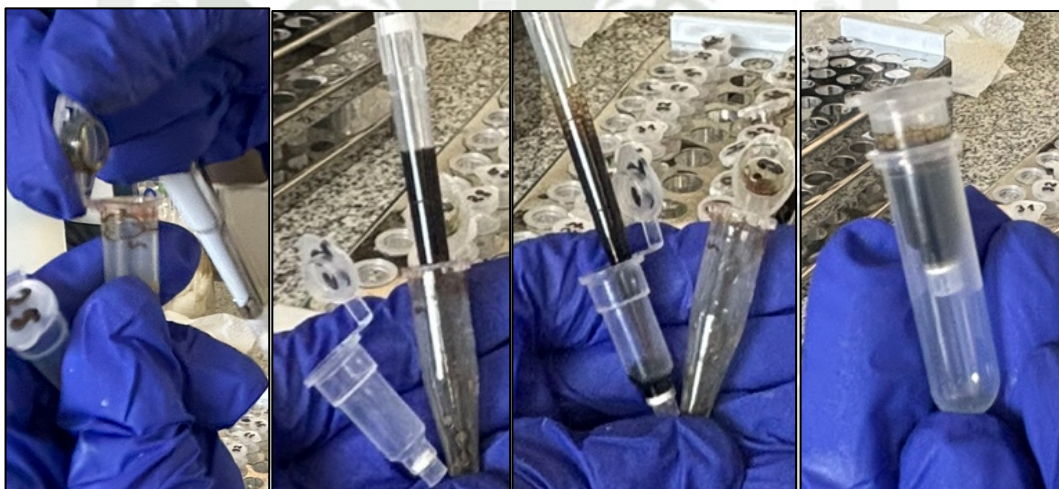
Fotografía 43: Izquierda a derecha: Colocación de tubos eppendorf en baño termostatzado. Programación



Fotografía 44: Izquierda a derecha: Devolución de muestras. Cierre hermético s



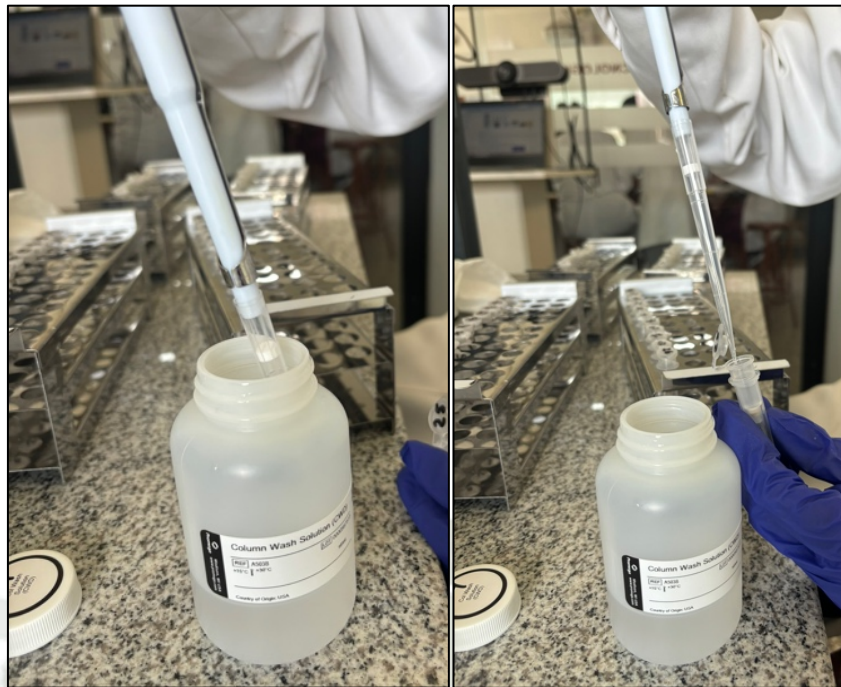
Fotografía 45: Izquierda a derecha: Extracción de buffer de unión. Colocación en tubo eppendorf correspondiente. Vortex de la mezcla



Fotografía 46: Izquierda a derecha: Apertura de tubo eppendorf con cuidado, procurando no tocar el interior de la tapa. Extracción de mezcla, Colocación de la mezcla en la columna. Columna en tubo colector



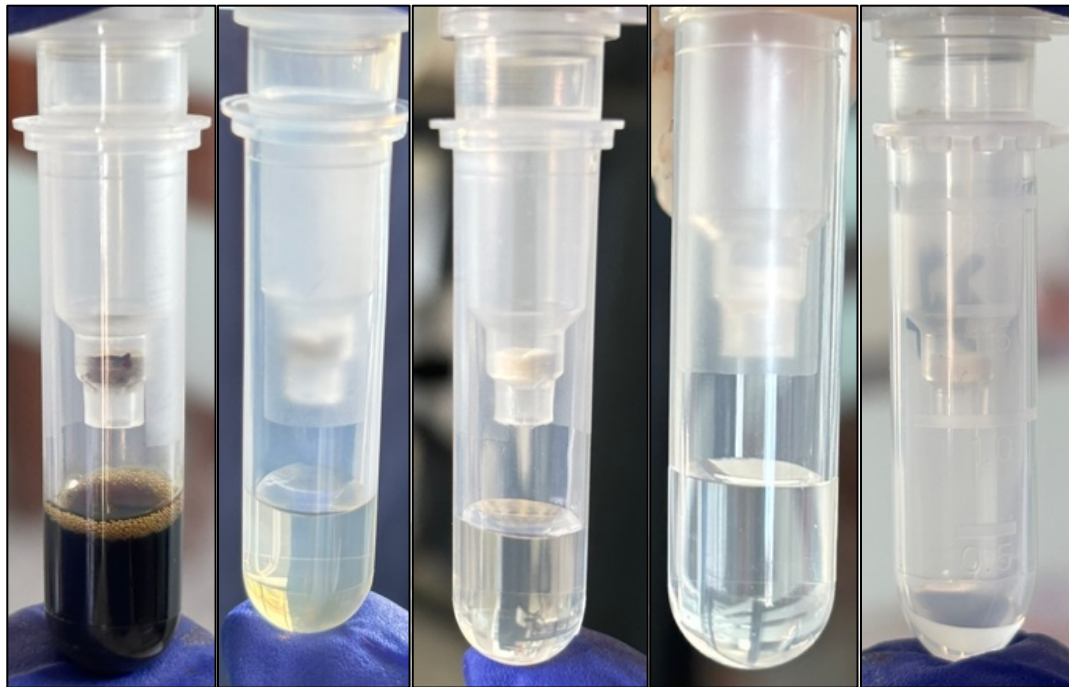
Fotografía 47: Izquierda a derecha: Programación. Tiempo de centrifugado



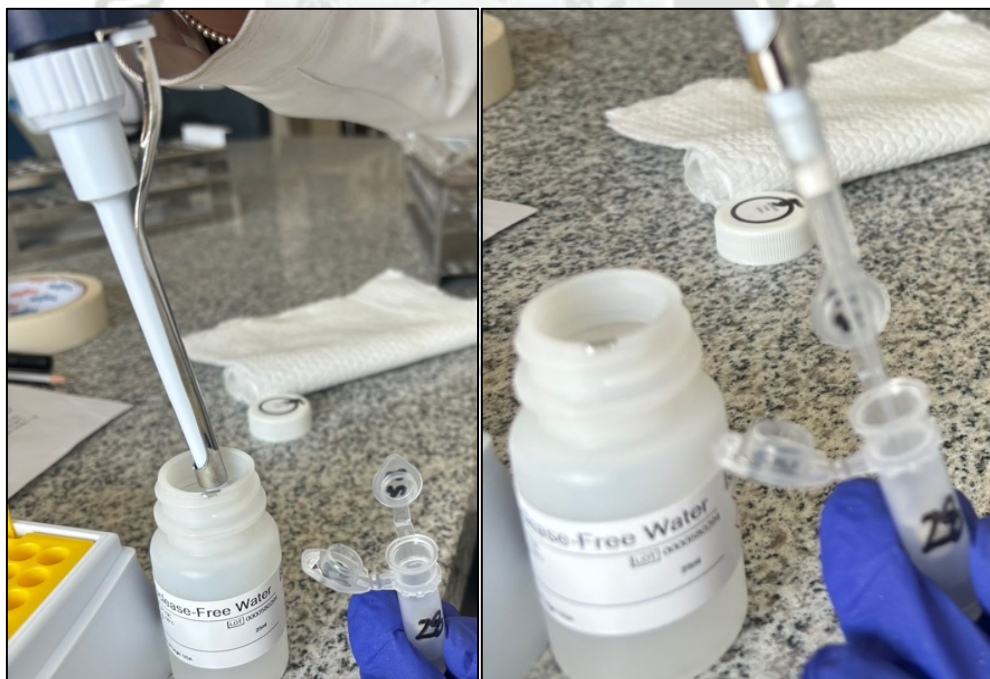
Fotografía 48: Izquierda a derecha: Buffer de lavado. Colocación de buffer en columna



Fotografía 49: Izquierda a derecha: Colocación de tubo y columna en centrifuga contrapesando. Cerrado de tapa de microcentrifuga



Fotografía 50: Izquierda a derecha: Antes del primer lavado. Primer lavado. Segundo Lavado. Tercer lavado. ADN eluido en tubo eppendorf



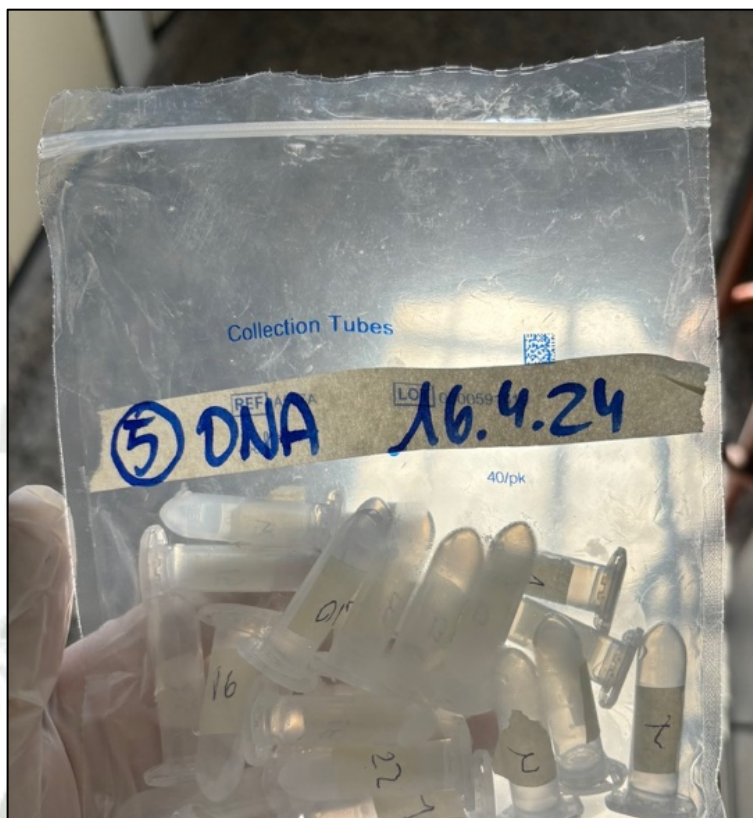
Fotografía 51: Izquierda a derecha: Agua libre de nucleasas para eluir ADN obtenido. Colocación de agua libre de nucleasas en columna



Fotografía 52: Izquierda a derecha: Membrana después del primer lavado. Tubo y columna después de elusión. Membrana después de eluir. ADN eluido



Fotografía 53: Izquierda a derecha: Tubos eppendorf con columnas colocadas en centrifuga contrapesadas. Otra forma de contrapesar los tubos



Fotografía 54: ADN eluido en bolsa hermética lista para congelación hasta su uso

Tabla 5: Causas de problemas frecuentes por mal procesamiento o manejo (34)

PROBLEMA	CAUSA
Formación de coágulos y lisado no atravesó la columna.	Sangre indebidamente homogeneizada. Es imprescindible que la sangre se homogeneice antes de agregar la proteinasa K y tampón de lisis.
	La muestra no fue agitada después de agregar el tampón de lisis.
El buffer de lavado no atravesó la columna.	No se centrifugó el tiempo suficiente. Debe ser durante 1 minuto.
	Insuficiente fuerza G. Debe ser de al menos $12\ 000 \times G$.

Bajo rendimiento de ADN	La sangre con bajos niveles de leucocitos. Se debería verificar mediante hemocitómetro. Número inferior de 4×10^6 /ml bajará rendimiento.
	La sangre no se resuspendió lo suficiente. Debe ser durante al menos 10 minutos en un agitador o vórtex.
	La sangre no era fresca. Las muestras que fueron almacenadas a 2 a 5 °C por más de 5 días pueden tener rendimientos reducidos.
	Lisis incompleta. Debe ser mínimo 10 segundos después de agregar el tampón o buffer de lisis. Si después del calentamiento, la mezcla sangre/buffer de lisis no tiene un color verde oscuro, la lisis fue incompleta.
	La solución de unión no fue mezclada adecuadamente con el lisado. Debe agitarse durante al menos 10 segundos después de agregar el buffer de unión al lisado calentado.
ADN degradado	Recolección y/o almacenamiento inadecuado de sangre.
	Múltiples ciclos de congelación y descongelación del ADN purificado.

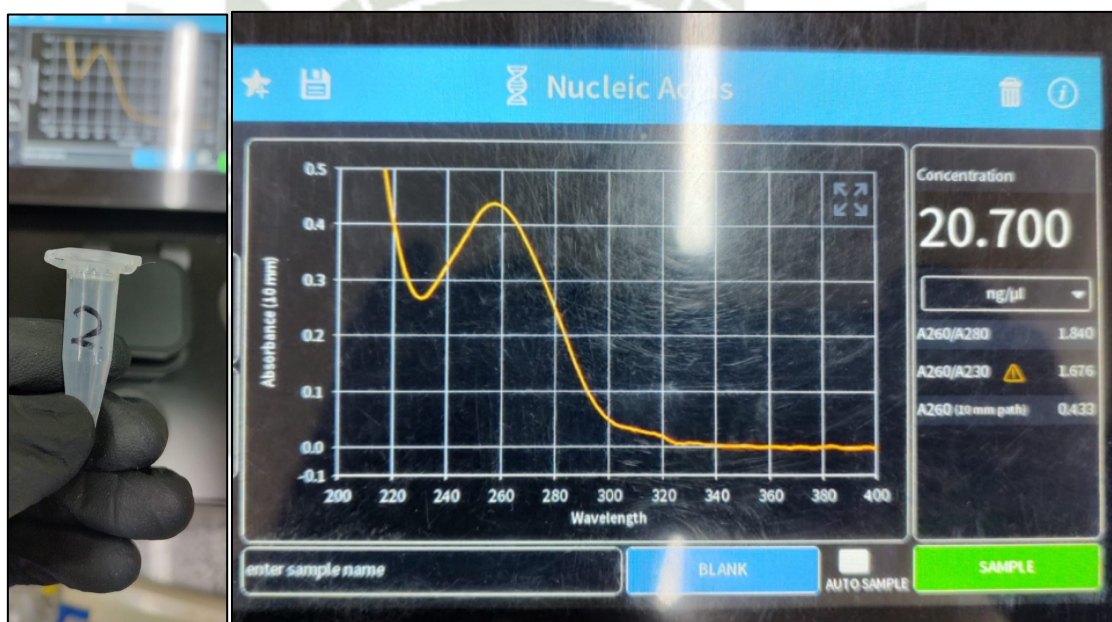
3.2.2.1.2. Medición de la concentración de ADN y su grado de pureza

Se tomaron, por un método aleatorizado simple, 2 tubos eppendorf con ADN extraído y se realizó su medición de concentración mediante el uso de NanoDrop. También se realizó la medición de concentración del control positivo a ADN de *S. aucheniae*. Se cuantificaron y determinaron los grados de pureza según su absorbancia a 260 nm y a partir de los índices 260/280 y 260/230 utilizando un espectrofotómetro (UV – Nanodrop).

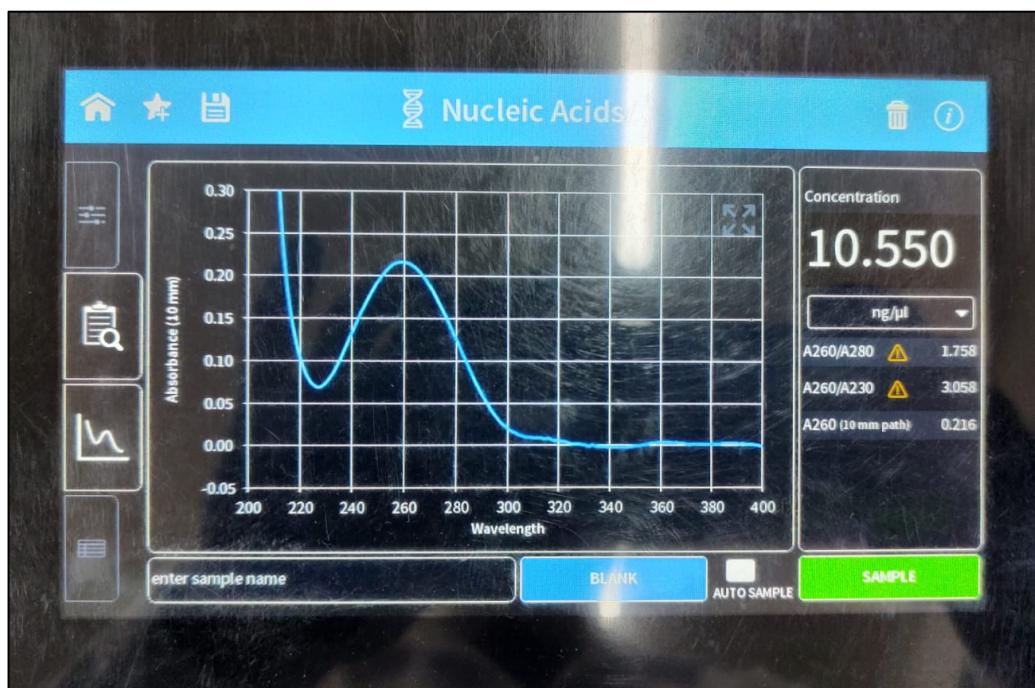
La concentración de ácidos nucleicos se determina al medir su absorbancia con un espectrofotómetro a 260nm ya que ellos absorben la luz con mayor intensidad. La cantidad de ácidos nucleicos es proporcional a la cantidad de luz absorbida.

La relación 260nm/280nm se emplea para evaluar la pureza del ADN, si dicha relación es similar a 1.8 en ADN se clasifica como “Pura”, si es menor, indica contaminación por proteínas ya que se absorben a 280nm (46) Los ácidos nucleicos se miden a 260nm y las proteínas a 280nm

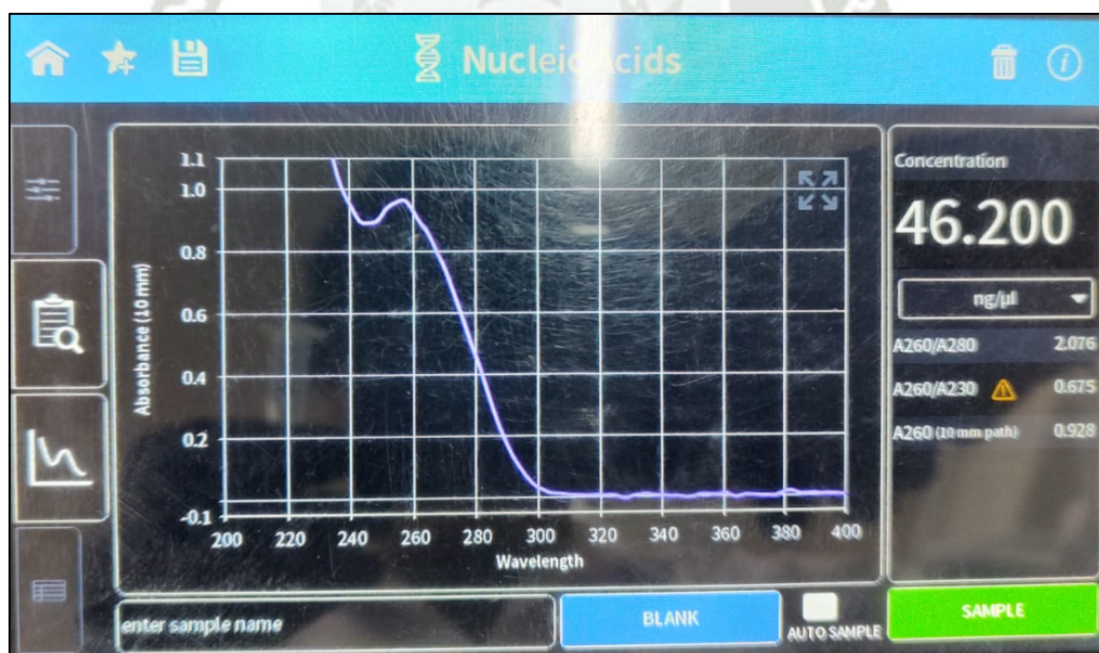
La relación 260nm/230nm es una medida secundaria a la pureza, y suelen ser superiores a la de 260nm/280nm, estando entre 2.0 y 2.2. Si es inferior, indica presencia de contaminantes que se absorben a 230nm. A 230nm se miden sustancias químicas.



Fotografía 55: Izquierda a derecha: muestra 2. Concentración mediante nanodrop de la muestra 2 del mes de julio 2023



Fotografía 56: Concentración mediante nanodrop de la muestra 28 del mes de diciembre 2023



Fotografía 57: Concentración mediante nanodrop del control positivo a ADN de *S. aucheniae*

3.2.2.1.3. Pruebas previas al análisis de muestras de sangre

Antes de analizar las muestras problema, primero se realizaron experimentos para comprobar la detección de ADN de *S. aucheniae*, su límite de detección y límite de

detección del ADN de alpaca. Se realizaron 3 experimentos, los cuales se detallan a continuación:

A. Puesta a punto 1: Primers

Se probaron los primers para la detección de ADN de *S. aucheniae* y de ADN de alpaca con muestras de controles positivos a dicho parásito y controles negativos correspondientes a agua libre de nucleasas, siendo el NTC (No Template Control).

B. Puesta a punto 2: límite de detección de ADN de *S. aucheniae*

Consistió en evaluar y determinar el límite de detección de ADN del parásito *S. aucheniae*. Para dicha prueba, se midió la concentración del control positivo mediante el uso de nanodrop, obteniéndose 46.2 ng/ul. Se realizaron 6 diluciones de manera progresiva de 1:10.

C. Puesta a punto 3: límite de detección de ADN de alpacas

Esta prueba consistió en hallar el límite de detección de ADN de alpacas, al igual que en el la prueba 2 , se cuantificó la concentración de ADN mediante nanodrop y se obtuvo 20.7 ng/ul. Se realizaron 6 diluciones de manera progresiva de 1:10.

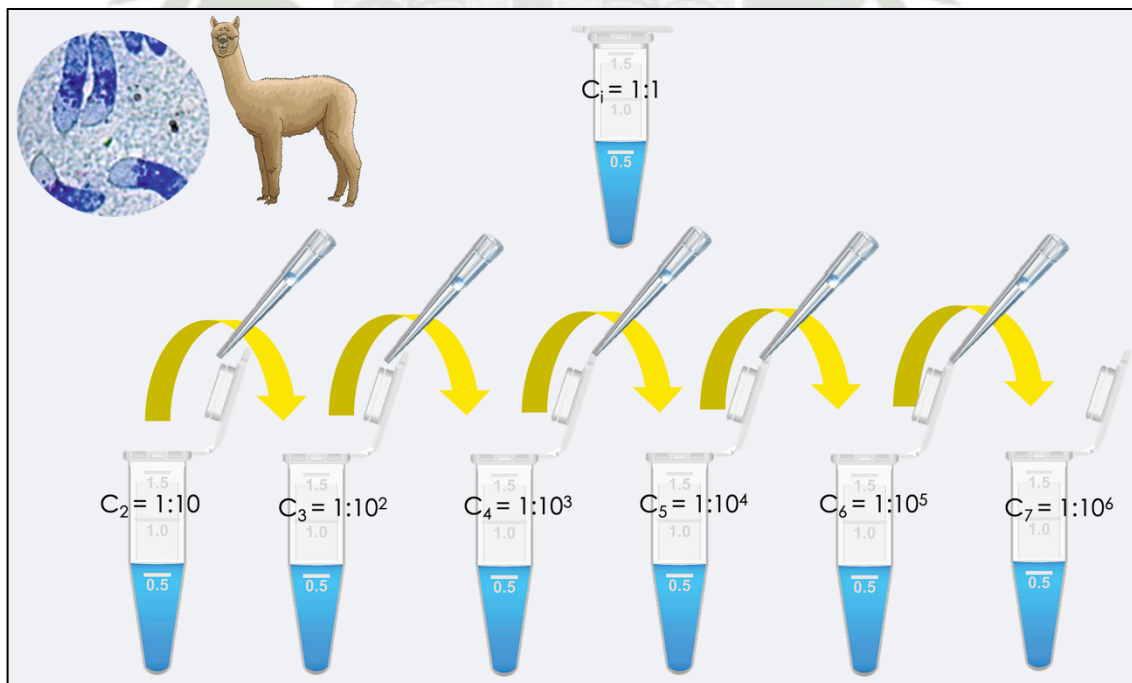


Ilustración 14: representación de esquema de diluciones empleadas para límites de detección. C=concentraciones inicial y de 2 a 7. Dichas concentraciones se obtienen de las diluciones a partir de la concentración inicial.

3.2.2.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizaron dos rondas de PCR consecutivas en un esquema semianidado, para amplificar un fragmento de 583 pb del gen codificante de la subunidad 18S ribosomal de *S. aucheniae*. Se realizan 2 rondas ya que, la parasitemia al ser muy baja, no alcanzaría la sensibilidad de una única ronda de PCR, es por ello que la segunda ronda permite reamplificar más producto para que se pueda visualizar en el gel mediante un transiluminador. Al ser una PCR semi-anidada, se contaron con 3 primers o cebadores para *S. aucheniae*, repitiéndose el cebador Reverse (Sauch-R) y los Forward son distintos (cocc18S-F1 y cocc18S-F2). Además, se utilizaron cebadores para el gen 16S de alpaca, esto se realizó para tener un control positivo de la reacción ya que, si se realizó adecuadamente la extracción de ADN, se espera encontrar producto. Las reacciones de la primera y segunda ronda se llevaron a cabo en un volumen final de 13 μ L.

Tabla 6: Concentración de primers de Sigma-Aldrich. Adaptado del certificado de análisis de primers de Sigma-Aldrich

Primer	μ g	Nmol	μ l para 100 μ M
Cocc18s-f2	243.2	39.3	393
Lg_16srna_f	327.3	53.2	531
Cocc18s-f1	284.1	45.4	454
Sauch-r	327.1	46.6	465
Lg_16srna_r	327.7	54.9	549

Tabla 7: Secuenciación de los primers y tamaños de gen que amplifican (29)

Ronda	Primer	Secuencia	Tamaño de gen
PRIMERA	cocc18S-F1	GAAAGTTAGGGGCTCGAAGA	730 pB
	Sauch-R	CCAATCCATACTTGGAAAAAC GG	

SEGUNDA	Lg_16sRNA_ F	AAGGAACTCGGCAAACACGA	257 pB
	Lg_16sRNA_ R	ATTTGTTTCATCCCCGCCTCT	
	cocc18S-F2	-GACGGAAGGGCACCACCAGG-	583 pB
	Sauch-R	CCAATCCATACTTGGAAAAAC GG	
	Lg_16sRNA_ F	AAGGAACTCGGCAAACACGA	257 pB
	Lg_16sRNA_ R	ATTTGTTTCATCCCCGCCTCT	

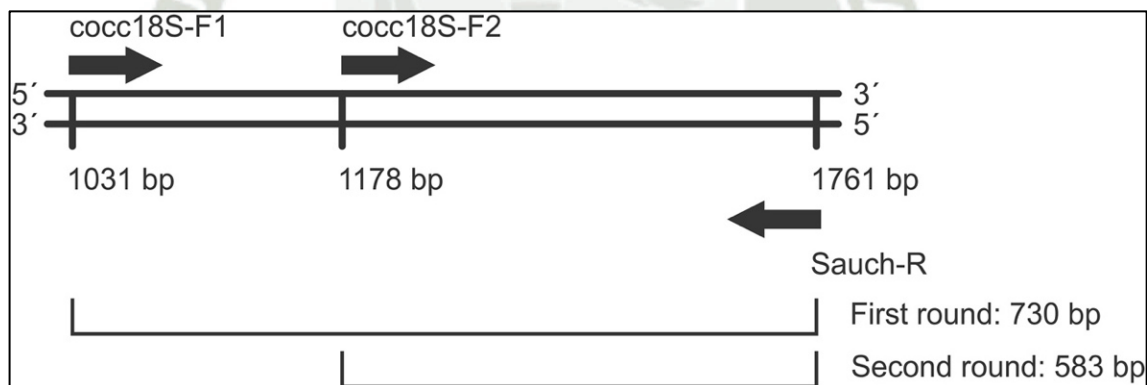


Ilustración 15: esquema de PCR semi-anidada dúplex para la amplificación del gen 18S rARN de *S. aucheniae* (29)

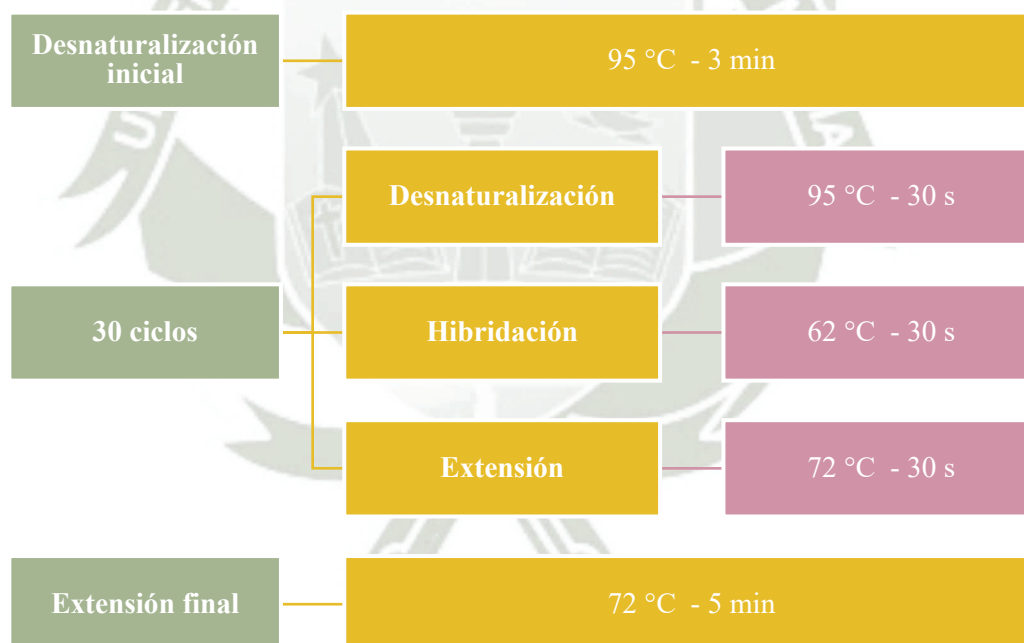
Se empleó el kit de reactivos de GoTaq® G2 Hot Start Taq Polymerase de la empresa Promega, que incluían buffer verde y buffer sin color, ambas de concentración 5X, MgCl₂ y la enzima propiamente. Además, se emplearon los primers lg_16SRNA_F y lg_16SRNA_F para DNA de alpaca; y se emplearon primers para DNA de *S. aucheniae*: Sauch-R y Cocc18S-F1 o Cocc18S-F2 para primera y segunda ronda, respectivamente. Finalmente, se empleó el dNTP mix 10mM de la empresa Promega y agua libre de nucleasas.

1. El procedimiento se realizó en una cabina de flujo laminar.
2. Se prepararon los primers según las indicaciones del fabricante y se alicuotaron en tubos eppendorf debidamente rotulados para conservarlos a -20°C.
3. Se calcularon las cantidades de los reactivos por utilizar según el número de muestras por analizar, considerando un control negativo conocido denominado NTC (No-Template Control) con el fin de monitorear si existió contaminación por los productos de amplificación; y se consideró un control positivo para *S. aucheniae*. Posteriormente, se agregó el 10% a dicha cantidad.
4. Se preparó un Master mix con los reactivos necesarios en un tubo eppendorf rotulado con Mx1 para la primera ronda. Las cantidades se detallan en la tabla 8.

Tabla 8: Cantidades de reactivos necesarios por muestra para Master mix de primera ronda

Reactivo	Concentración requerida	Cantidad requerida (µl)
Agua libre de nucleasas		6.8
5X - Green	1X	2.6
MgCl ₂	2mM	1.0
Cocc18S -F1	0.4µM	0.5
Sauch-R	0.4µM	0.5
Lg_16SRNA_F	0.1µM	0.1
Lg_16SRNA_R	0.1µM	0.1
Dntp	2mM	0.3
Taq polimerasa	0.4U/reacción	0.1
Total (µl)		12

5. Se homogeneizó en vórtex y luego se centrifugó brevemente a máxima potencia.
6. Luego, se colocó 12µl de Master Mix 1 en cada microtubo para PCR rotulado y 1 µl de la muestra de interés, NTC y control positivo. Este procedimiento se repitió en cada microtubo.
7. Los microtubos se colocaron en el termociclador y se programaron las temperaturas y tiempo para cada paso, siendo las condiciones de ciclado las siguientes:
 - a. Desnaturalización a 95 °C por 3 minutos
 - b. 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 62 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos
 - c. Período de extensión final de 5 minutos a 72 °C.



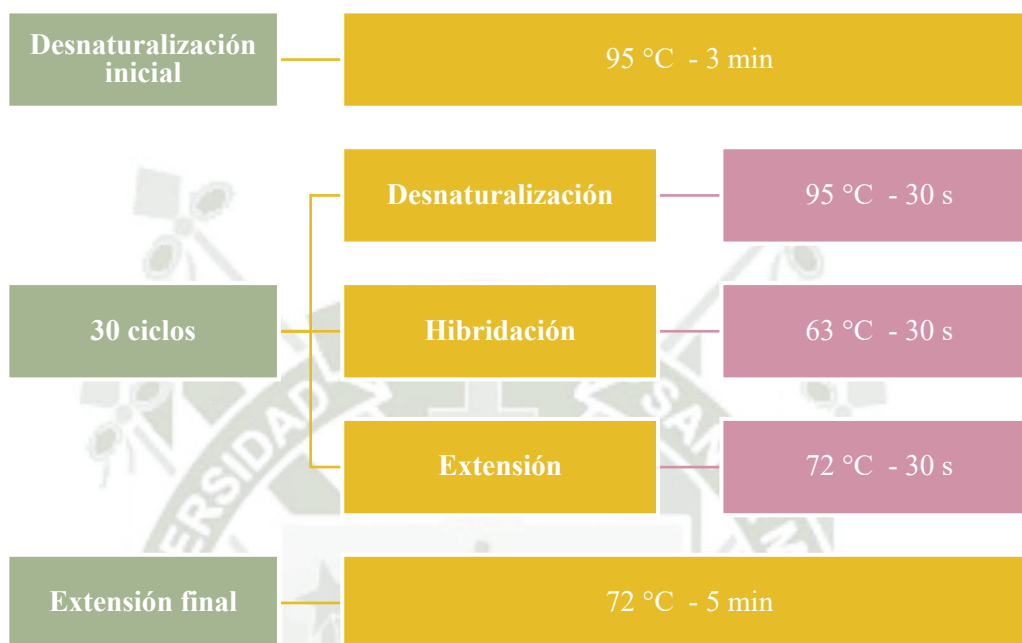
8. Para la segunda ronda, se preparó un Master Mix con los reactivos necesarios en un tubo eppendorf rotulado con Mx2 para la primera ronda. Las cantidades se detallan en la tabla 9.

Tabla 9: Cantidades de reactivos necesarios por muestra para Master mix de segunda ronda

Reactivo	Concentración requerida	Cantidad requerida (µl)
Agua libre de nucleasas		6.8
5X - Green	1X	2.6
MgCl ₂	2mM	1.0
Cocc18S -F2	0.4µM	0.5
Sauch-R	0.4µM	0.5
Lg_16SRNA_F	0.1µM	0.1
Lg_16SRNA_R	0.1µM	0.1
dNTP	2mM	0.3
Taq polimerasa	0.4U/reacción	0.1
Total (µl)		12

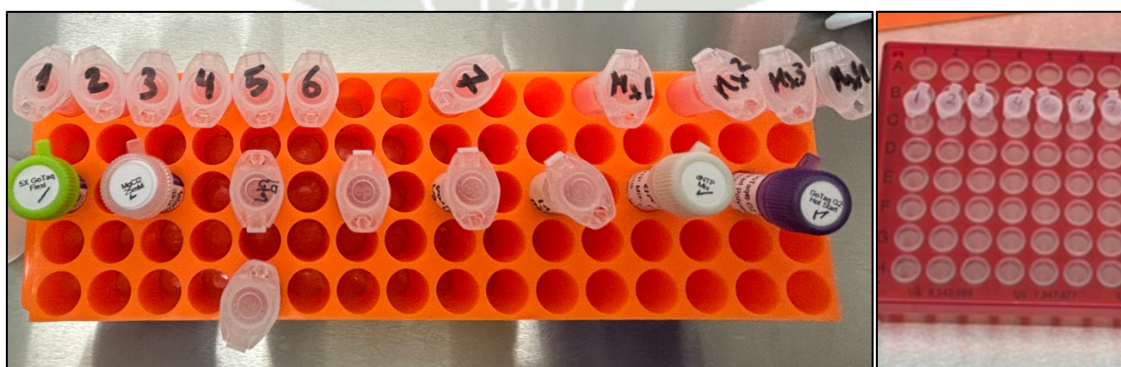
9. Se homogeneizó en vórtex y luego se centrifugó brevemente a máxima potencia.
10. Luego, se colocó 12µl de Master Mix 2 en cada microtubo para PCR rotulado para la segunda ronda.
11. En un área diferente, se colocó 1 µl del amplicón de la primera ronda correspondiente a cada muestra de interés, NTC y control positivo. Este procedimiento se repitió en cada microtubo.
12. Los microtubos se colocaron en el termociclador y se programaron las temperaturas y tiempo para cada paso, siendo las condiciones de ciclado las siguientes:
 - a. Desnaturalización a 95 °C por 3 minutos

- b. 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 63 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos
- c. Período de extensión final de 5 minutos a 72 °C.

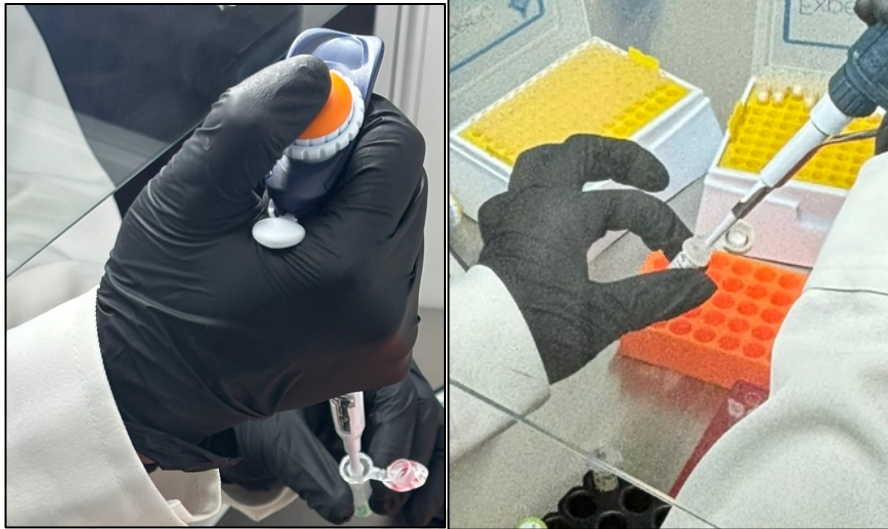


13. Los productos de amplificación de la segunda ronda se llevaron a otro ambiente para realizar la electroforesis.

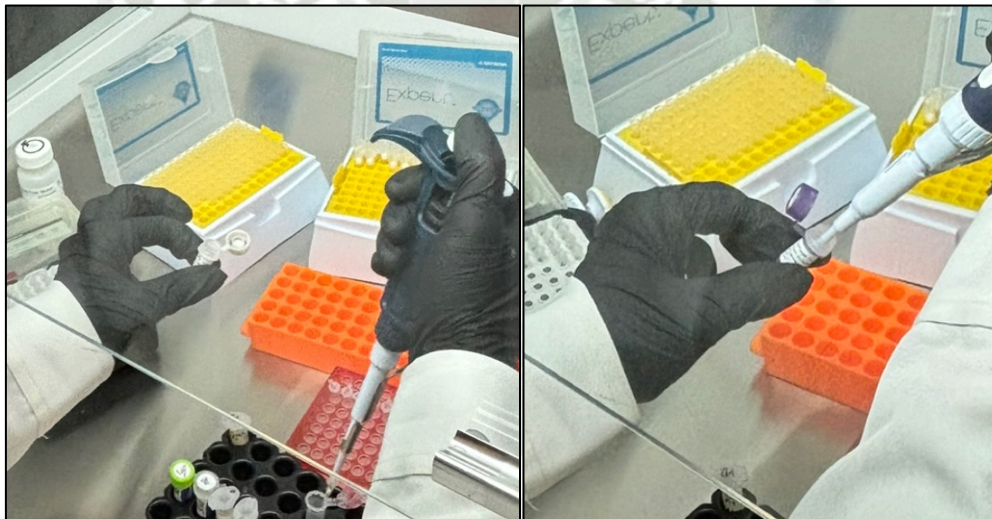
14. Se realizó la desinfección de todas las superficies con lejía y con agua limpiadora de RNAsas para reducir la contaminación por amplicones.



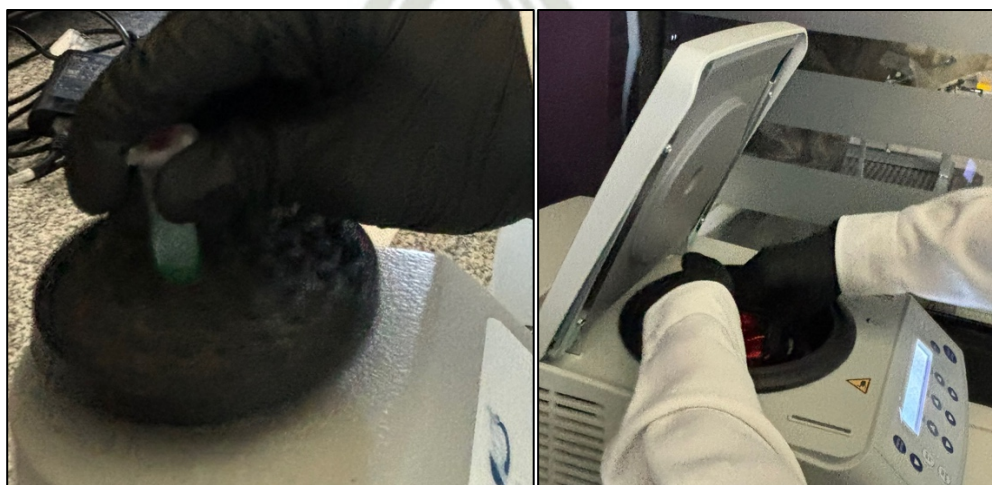
Fotografía 58: Izquierda a derecha: Reactivos necesarios para master mix (5X green, MgCl₂, Primer Cocc18S-F1, Primer Sauch-R, Primer Lg_16SRNA-F, Primer Lg_16SRNA-R, dNTP, taq polimerasa). Rack para microtubos para PCR rotulados



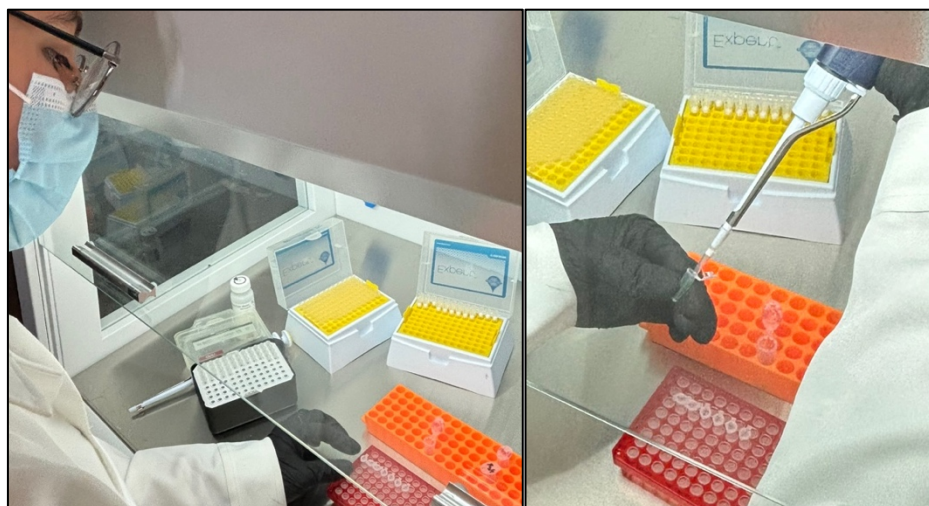
Fotografía 59: Izquierda a derecha: Colocación de 5X green. Extracción de MgCl₂



Fotografía 60: Izquierda a derecha: Colocación de dNTP. Extracción de taq polimerasa



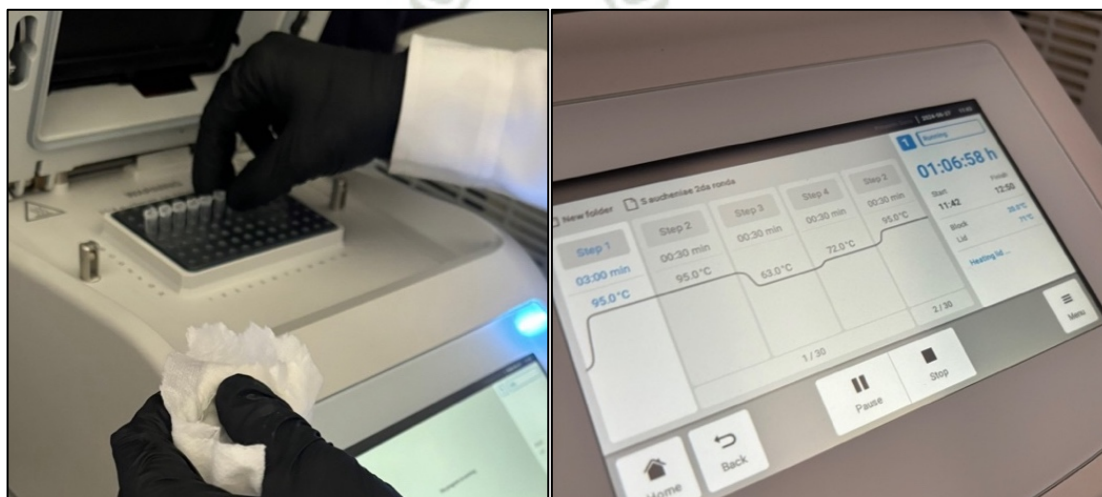
Fotografía 61: Izquierda a derecha: Vortex. Spin-down en microcentrífuga



Fotografía 62: Izquierda a derecha: Cerrado de tubos para PCR. Colocación de master mix en cada tubo para PCR



Fotografía 63: Izquierda a derecha: Extracción de amplicón de primera ronda en otro ambiente. Colocación de amplicón en master mix para la segunda ronda



Fotografía 64: Izquierda a derecha: Colocacion de microtubos para pCR en termociclador. Programación de condiciones de termociclado

3.2.2.1.5. Preparación de geles de agarosa

Se preparó geles de agarosa con concentración de 2% con buffer TAE. A continuación, se detalla dicho procedimiento.

1. Se realizó el cálculo para tener una concentración final de TAE 1X a partir de una concentración 50X según el volumen requerido, se empleó la siguiente fórmula:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Donde:

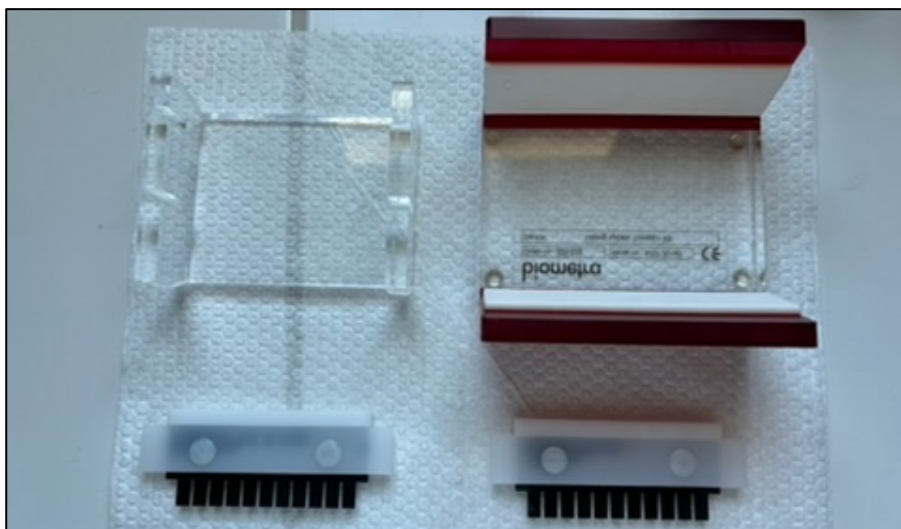
C_1 = concentración inicial

C_2 = concentración final

V_1 = volumen inicial

V_2 = volumen final

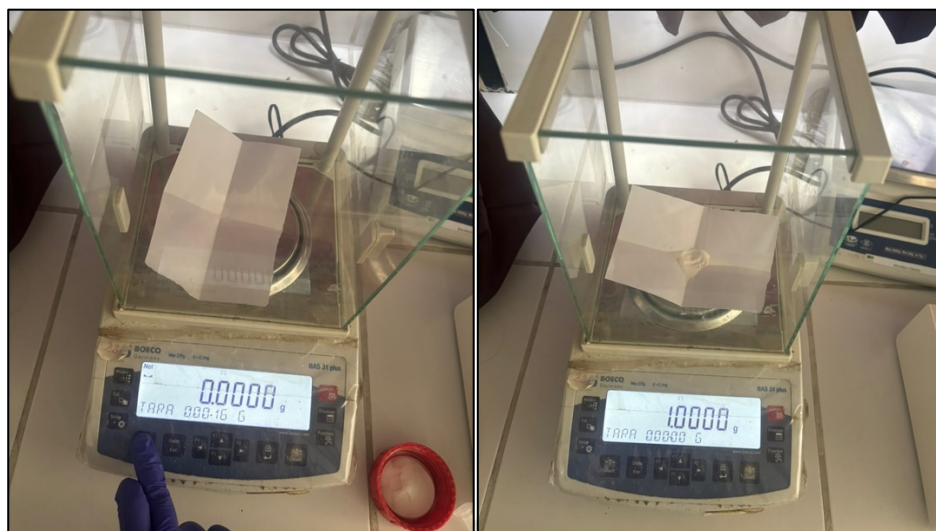
2. Para el gel de agarosa de concentración de 2%, se pesó 1g de agarosa en una balanza analítica y se midió 50ml de buffer TAE 1X.
3. Se colocó ambos reactivos en un matraz Erlenmeyer y se calentó en microondas por ciclos hasta obtener una mezcla transparente.
4. Se homogeneizó la mezcla sobre una superficie plana para evitar la formación de burbujas.
5. Luego, se agregó 3 μ L de reactivo Gel Green a la mezcla y se homogeneizó nuevamente.
6. Posteriormente, se vertió el contenido en la placa de gel de agarosa de electroforesis armada procurando no formar burbujas, luego se colocó 2 peines de 11 dientes.
7. Se cubrió hasta que el gel se torne opaco y sólido.



Fotografía 65: Partes de la placa para preparación de geles de agarosa, en la parte inferior se aprecian peines de 11 dientes



Fotografía 66: Izquierda a derecha: Buffer TAE 1X, Medición de buffer TAE 1X en probeta graduada



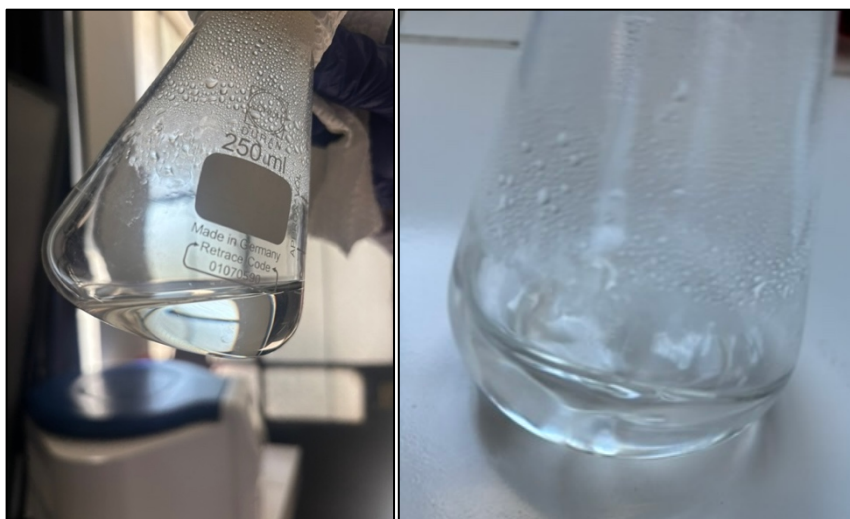
Fotografía 67: Izquierda a derecha: Taraje de papel. Pesaje de 1g de agarosa



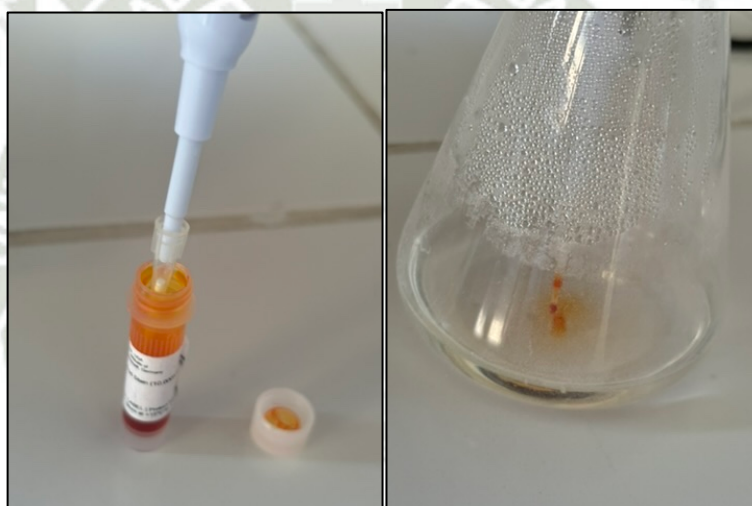
Fotografía 68: Izquierda a derecha: Colocación de buffer TAE 1x en matraz.
Agregación de agarosa al matraz



Fotografía 69: Calentamiento en microondas de mezcla



Fotografía 70: Izquierda a derecha: Mezcla transparente. Mezclado sobre superficie



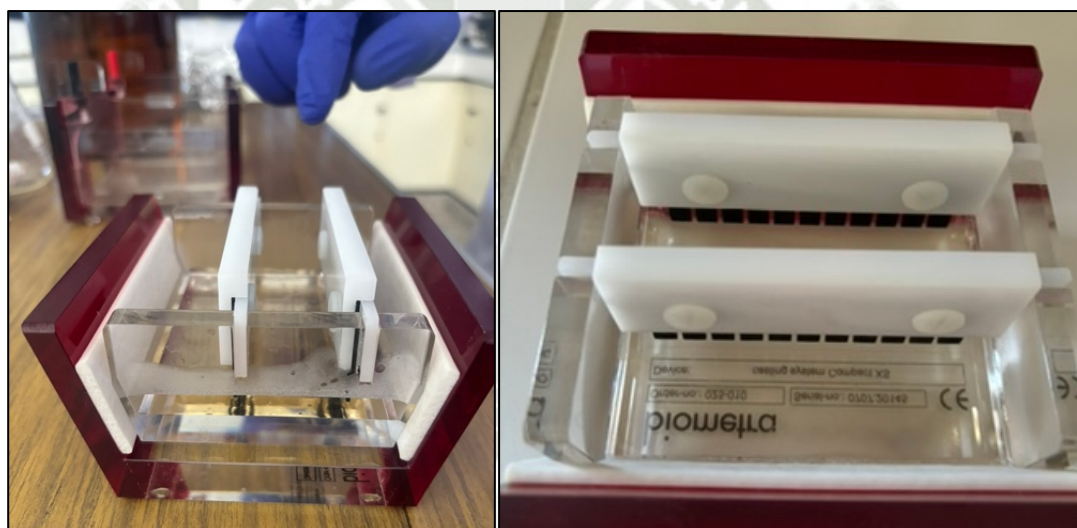
Fotografía 71: Izquierda a derecha: Gel Green. Adición de gel green a la mezcla



Fotografía 72: Izquierda a derecha: Mezclado. Armado de placa para gel



Fotografía 73: Izquierda a derecha: Vertido de mezcla en placa para gel. Colocación de peines



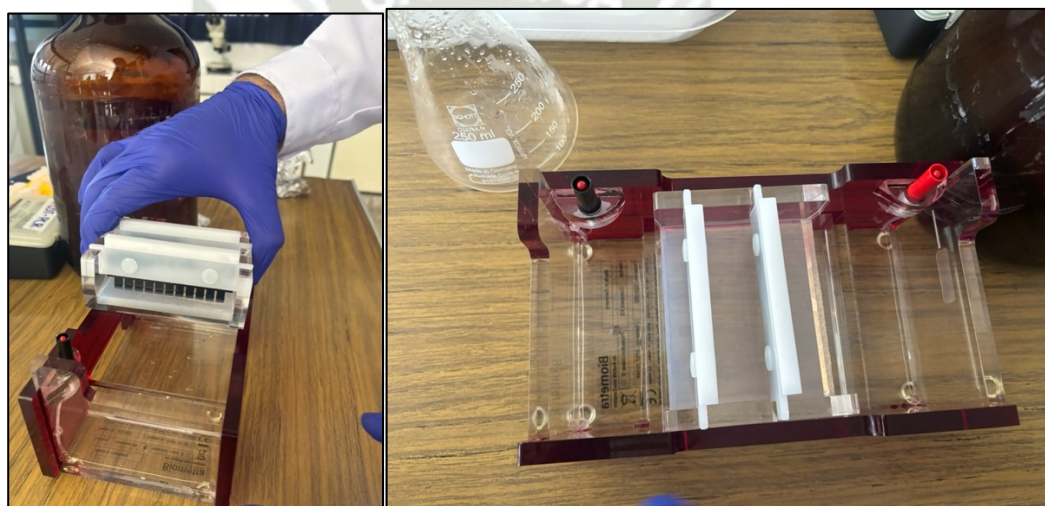
Fotografía 74: Izquierda a derecha: Posición de los peines. Reposo de gel de agarosa

3.2.2.1.6. Electroforesis

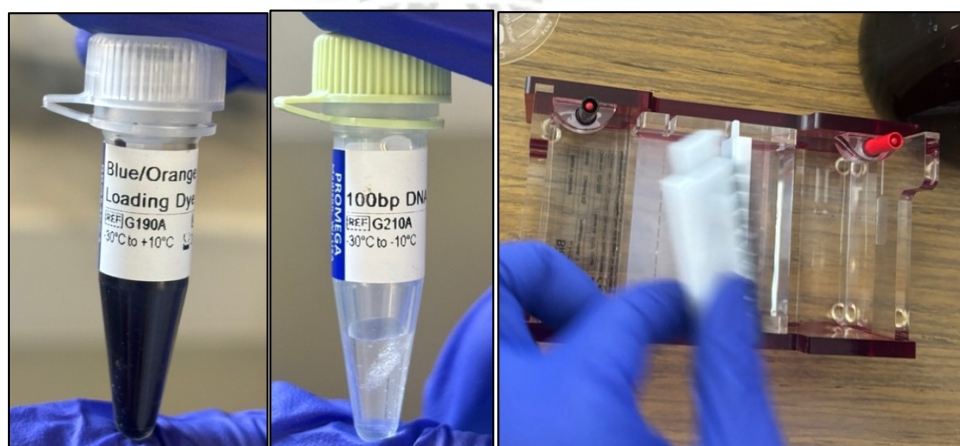
Al haber 22 wells en el gel de agarosa, se analizaron 18 muestras de sangre, un control positivo a *S. aucheniae* y un NTC (no-template control) correspondiente a agua libre de nucleasas.

1. Se colocó el gel de agarosa dentro de la cámara de electroforesis con buffer TAE 1X hasta cubrirlo, de tal forma que los peines se ubiquen próximos al lado negativo para permitir la corrida hacia el positivo.
2. Se retiraron los peines.

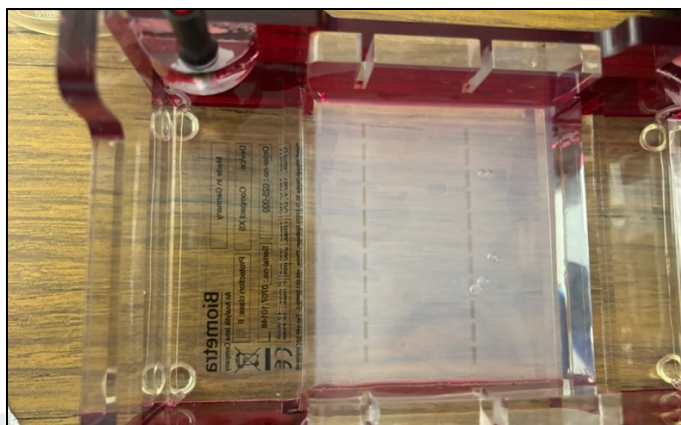
3. En un papel parafilm, se colocó 1 μL de Loading Dye 6x. Luego se agregó 5 μL del amplicón de segunda ronda y se mezcló hasta homogeneizar.
4. Para el marcador de peso molecular, se empleó 2 μL de agua libre de nucleasas, 3 μL de Ladder 100bp y 1 μL loading Dye.
5. Se sembró cuidadosamente la muestra en su well correspondiente del gel, procurando no perforarlo.
6. Se conectó la cámara a la fuente de poder, se colocó la tapa y se cubrió con papel aluminio.
7. Se programó a 80V durante 30 minutos.
8. Concluido el tiempo, se realizó la visualización.



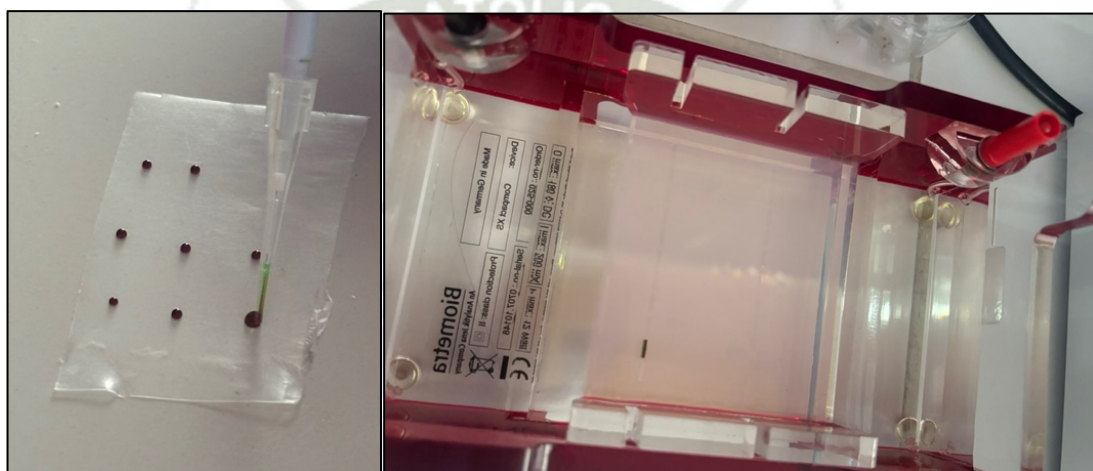
Fotografía 75: Izquierda a derecha: Colocación de placa de gel en cámara de electroforesis horizontal. Orientación de los peines dentro de cámara



Fotografía 76: Izquierda a derecha: Blue/orange buffer de carga. Marcador de peso molecular. Retiro de peines de gel de agarosa dentro de cámara de electroforesis



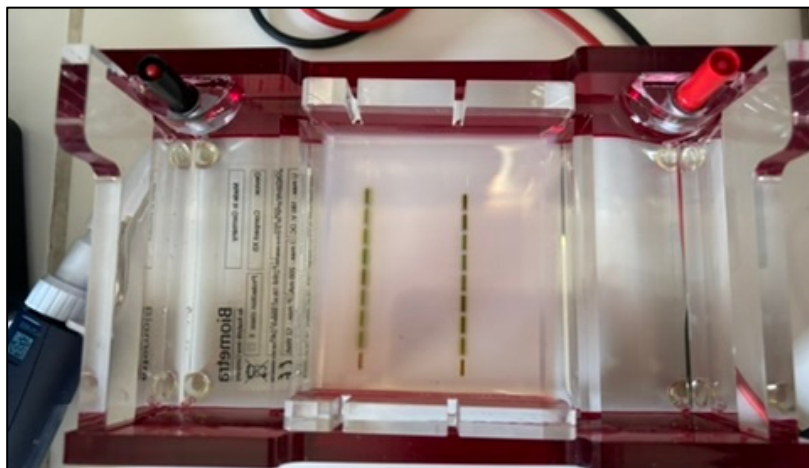
Fotografía 77: Gel de agarosa sin peines, se aprecian muy bien los pocillos o wells



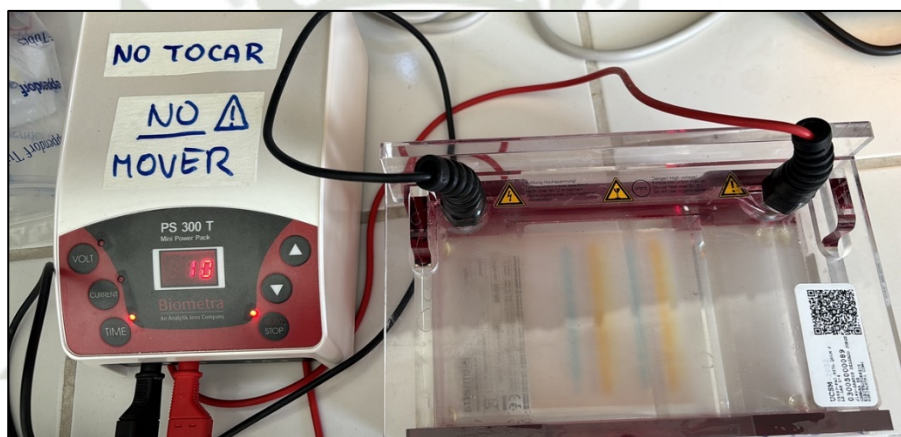
Fotografía 78: Izquierda a derecha: colocación de 1 microlitro de buffer de carga. Sembrado de amplicones en well correspondiente



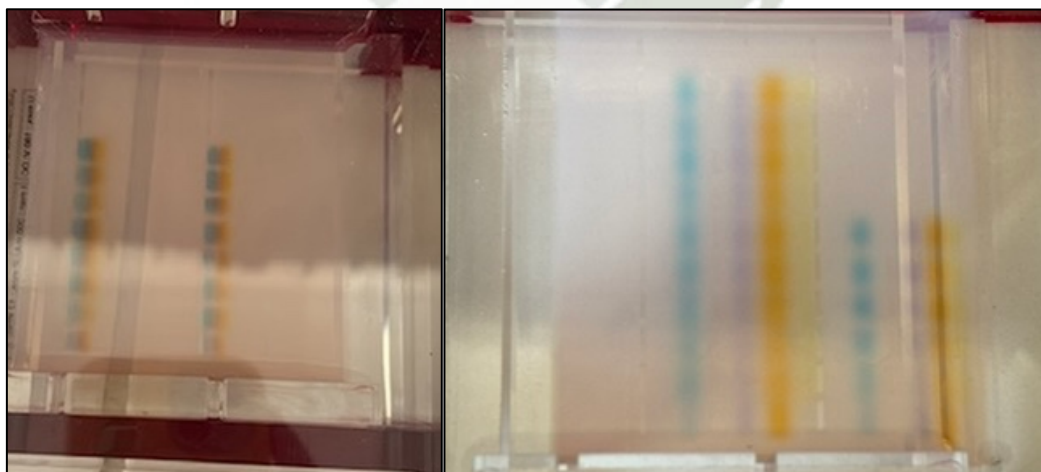
Fotografía 79: Izquierda a derecha: Forma de sembrado en gel. Sembrado de pocillos



Fotografía 80: Gel con todas las muestras sembradas



Fotografía 81: Cámara de electroforesis horizontal cerrada



Fotografía 82: Izquierda a derecha: Frente de corrida de electroforesis. Frente de corrida transcurrido más tiempo

3.2.2.1.7. Visualización

Se retiró el gel de agarosa de la cámara de electroforesis y se colocó en el transiluminador UV para poder visualizar el resultado. Se percató en cada gel que el control positivo tuviese bandas correspondientes a ADN de *S. aucheniae* y a ADN de alpaca; además, se observó que el carril del NTC no tuviese bandas y se anotaron los resultados.

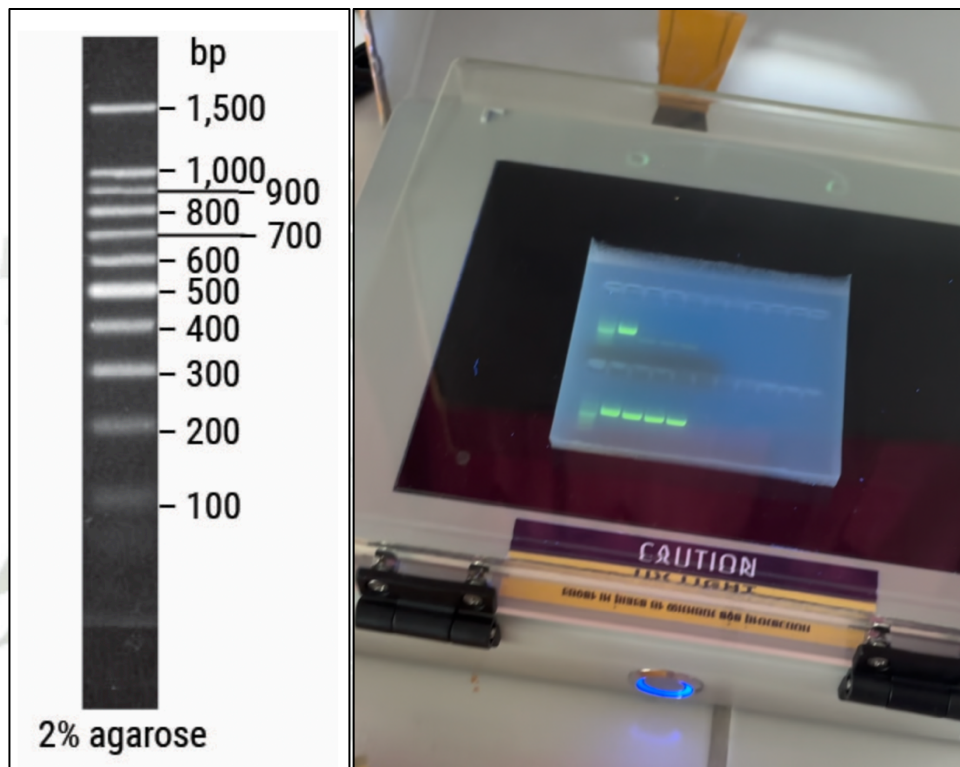


Ilustración 16: Izquierda a derecha: Marcador de 100pb marca promega corrido en gel de agarosa 2% (47) Visualización de gel de agarosa en transiluminador UV.

La positividad de una muestra ante el ADN del parásito *S. aucheniae* se da por la presencia de una banda correspondiente a 550pb, aproximadamente, que, en el marcador de peso molecular de 100pb, es la banda con mayor luminiscencia. Además, se debe visualizar una banda de 250pb, aproximadamente, correspondientes al ADN de alpaca, de esta manera se corrobora la correcta extracción de ADN de la muestra. Es decir, un carril con presencia de 2 bandas, una de 550pb y otra de 250pb corresponde a un resultado positivo; y una única banda de 250pb indica un resultado negativo. Es imprescindible que el carril del NTC no tenga presencia de bandas, esto comprueba que no hubo contaminación por amplicones durante el procesamiento de la muestra.

3.2.2.2. Metodología de análisis

3.2.2.2.1. Correlación lineal entre 2 variables

Con los valores obtenidos de las condiciones climáticas, se evaluó la correlación entre el número de animales de 2 años positivos a ADN de *S. aucheniae* por PCR con las precipitaciones y temperatura máxima media. Además se evaluó la correlación entre el porcentaje (%) de animales de todas las edades positivos a ADN de *S. aucheniae* por PCR con las precipitaciones y temperatura máxima media.

Se reconoció si había relación mediante el coeficiente de correlación lineal de Pearson (r) de las siguientes parejas:

- Animales positivos y temperatura máxima media
- Porcentaje de animales positivos y temperatura máxima media
- Animales positivos y precipitaciones pluviales
- Porcentaje de animales positivos y precipitaciones pluviales

Se establecieron las variables independientes o explicativas en el eje X (temperatura media máxima y precipitaciones pluviales) y las variables dependientes o explicadas en el eje Y (cantidad de animales positivos y porcentaje de animales positivos).

La fórmula empleada de correlación lineal de Pearson (r) fue la siguiente:

$$r = \frac{S_{xy}}{S_x * S_y}$$

Donde:

r = coeficiente de correlación lineal de Pearson de dos variables

S_{xy} = covarianza entre dos variables

S_x = desviación típica de X

S_y = desviación típica de Y

$$S_{xy} = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{n}$$

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n} - \bar{x}^2}$$

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum y_i^2}{n} - \bar{y}^2}$$

Donde:

x_i = valores de la variable X

y_i = valores de la variable Y

\bar{x} = promedio de X

\bar{y} = promedio de Y

n = número de pares de la muestra

Tabla 10: clasificación del grado de correlación entre variables (48)

VALOR DE R	FUERZA DE CORRELACIÓN
$0.0 < r < 0.1$	No hay correlación
$0.1 < r < 0.3$	Poca correlación
$0.3 < r < 0.5$	Correlación media
$0.5 < r < 0.7$	Correlación alta
$0.7 < r < 1$	Correlación muy alta

3.2.2.2.1.1. Correlación lineal entre temperatura máxima media y los animales positivos

Tabla 11: Temperatura máxima media por meses y Cantidad de animales positivos

	Temperatura Máx. Media (°C)	Número de positivos
Julio, 2023	13	2
Agosto, 2023	13	0
Setiembre, 2023	15	1

Octubre, 2023	15	0
Noviembre, 2023	15	0
Diciembre, 2023	15	2
Enero, 2024	14	1
Febrero, 2024	2	0
Marzo, 2024	12	1
Abril, 2024	14	2

3.2.2.2.1.2. Correlación lineal entre temperatura máxima media y el porcentaje de Animales positivos

Tabla 12: Temperatura máxima media por meses y Porcentaje de animales positivos

	Temperatura Máx. Media (°C)	% positivos
Julio, 2023	13	13.16
Agosto, 2023	13	0.00
Setiembre, 2023	15	2.70
Octubre, 2023	15	0.00
Noviembre, 2023	15	0.00
Diciembre, 2023	15	10.00
Enero, 2024	14	5.00
Febrero, 2024	12	0.00
Marzo, 2024	12	5.00

Abril, 2024

14

12.5

3.2.2.2.1.3. Correlación lineal entre precipitaciones pluviales y Animales positivos

Tabla 13: Precipitaciones pluviales por meses y Cantidad de animales positivos

	Precipitaciones (mm/mes)	Número de Positivos
Julio, 2023	0	2
Agosto, 2023	0	0
Setiembre, 2023	0	1
Octubre, 2023	18	0
Noviembre, 2023	15	0
Diciembre, 2023	56	2
Enero, 2024	102	1
Febrero, 2024	110	0
Marzo, 2024	104	1
Abril, 2024	30	2

3.2.2.2.1.4. Correlación lineal entre precipitaciones pluviales y porcentaje de Animales positivos

Tabla 14: Precipitaciones pluviales por meses Porcentaje de animales positivos

	Precipitaciones (mm/mes)	% positivos
Julio, 2023	0	13.16
Agosto, 2023	0	0.00
Setiembre, 2023	0	2.70

Octubre, 2023	18	0.00
Noviembre, 2023	15	0.00
Diciembre, 2023	56	10.00
Enero, 2024	102	5.00
Febrero, 2024	110	0.00
Marzo, 2024	104	5.00
Abril, 2024	30	12.5

3.2.2.2. Estadística no paramétrica

Al ser variables cualitativas, se emplean pruebas de estadística no paramétrica para evaluar si un animal de 2 años tiene la misma probabilidad de infectarse que un animal mayor a 3 años en el periodo de 5 meses. Al ser una tabla de 2 x 2, posee solo 1 grado de libertad. Cuando se estimó las frecuencias estimadas con base a las observadas en la tabla de contingencia, se obtuvieron valores por debajo de 5. En la prueba de chi cuadrado, todos los valores de frecuencias estimadas deben ser superiores a 5, de lo contrario, el resultado no sería tan confiable. Es por ello que se empleó otra prueba para superar la limitación del bajo tamaño muestral, se recurrió a la prueba de probabilidad exacta de Fisher, cuya fórmula es:

$$p = \frac{(A + B)! * (C + D)! * (A + C)! * (B + D)!}{N! * A! * B! * C! * D!}$$

Donde:

p = probabilidad exacta de Fisher

! = factorial

Las variables deben ser cualitativas, con un número total entre 10 a 90 individuos. Indica la independencia de las variables entre sí. Al hablar de probabilidades, los valores van de 0 a 1. Se arman tablas de contingencia:

Tabla 15: Tabla de contingencia

	1	2	TOTAL
1	A	B	A+B
2	C	D	C+D
TOTAL	A+C	B+D	N

En el presente estudio, se armaron las tablas de contingencia hasta que una de las variables con menor valor de las celdillas fue igual a 0 y se realizaron las combinaciones sin alterar los valores marginales, siendo esta la distribución con más desequilibrio. La prueba de Fisher encuentra que combinaciones serían más extremas que la observada. Se calcularon las probabilidades exactas de cada tabla y se sumaron.

	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
2 AÑOS	3	18	21
>3 AÑOS	2	13	15
TOTAL	5	31	36

$$p = \frac{(21)! * (15)! * (5)! * (31)!}{36! * 3! * 18! * 2! * 13!}$$

$$P1 = 0.37$$

	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
2 AÑOS	4	17	21
>3 AÑOS	1	14	15
TOTAL	5	31	36

$$p = \frac{(21)! * (15)! * (5)! * (31)!}{36! * 4! * 17! * 1! * 14!}$$

$$P2 = 0.24$$

POSITIVO NEGATIVO TOTAL

2 AÑOS	5	16	21
>3 AÑOS	0	15	15
TOTAL	5	31	36

$$p = \frac{(21)! * (15)! * (5)! * (31)!}{36! * 5! * 16! * 0! * 15!}$$

$$P3 = 0.05$$

$$P = 0.66$$

3.2.2.3. **Recopilación de la información**

3.2.2.3.1. **En el campo**

Se recolectaron muestras sanguíneas para el procesamiento y formulación de base de datos y matrices correspondientes.

3.2.2.3.2. **En el laboratorio**

Se procesaron y analizaron dichas muestras en el laboratorio de Biotecnología y Reproducción Animal del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María ubicado en el fundo La Banda de Huasache en el distrito de Hunter – Arequipa.

3.2.2.3.3. **En la biblioteca**

Se realizó la revisión bibliográfica de libros, tratados y artículos científicos de revistas sobre el tema en mención. Además, se empleó la biblioteca virtual de la UCSM para recopilar información relacionada al tema. Se consideró el impacto científico de los mismos, además de considerar su fecha de publicación o realización.

3.2.2.3.4. En otros ambientes generadores de la información científica

Consulta con expertos en el tema, revisión de páginas web, revistas indexadas y otros.

3.3. Variables de respuesta

3.3.1. Variables independientes o conocidas

- a) Tiempo
- b) Categoría
- c) Factores climáticos

3.3.2. Variables dependientes o de predicción

- a) Presencia de ADN de *S. aucheniae* en sangre de alpacas.

3.3.3. Cuadro de observaciones a registra

TIPO	VARIABLES	INDICADOR
INDEPENDIENTE	Tiempo	- Cada 27 a 30 días
	Categoría	- Tuis mayor - Adulto
	Factores climáticos	- Precipitación pluvial - Temperatura máxima y mínima
DEPENDIENTE	Presencia de ADN de <i>S. aucheniae</i> en sangre	- Positivo - Negativo

3.4. Evaluación estadística

3.4.1. Diseño Experimental

3.4.1.1. Unidades experimentales

Cada alpaca macho sometida a evaluación se consideró como una unidad experimental, repetición u observación de estudio, a la cual se ha hecho una toma de muestra de sangre entera cada 27 a 30 días por un lapso de 10 meses.

3.4.1.2. Análisis estadístico

Dado a que las variables estadísticas fueron cualitativas, se analizaron mediante tablas de distribución de frecuencias que reporten frecuencias observadas, relativas y porcentuales que se graficaron en tablas de resultados.

3.4.1.2.1. Análisis de varianza

Las variables cualitativas se evaluaron mediante la prueba de probabilidad exacta de Fisher. Se evaluó la correlación entre las variables mediante la correlación de Pearson.

3.4.1.2.2. Análisis de significancia

El nivel de significancia para las pruebas estadísticas será de $\alpha = 0,05$ (nivel de significancia).



CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Resultados de geles de agarosa de pruebas de puesta a punto

En la prueba 1 se probaron los primers de *S. aucheniae* con muestras de controles positivos a dicho parásito y con controles negativos (NTC). Se realizó electroforesis horizontal de los amplicones tanto de la primera como de la segunda ronda, obteniéndose la ilustración 17 y comprobando así la detección de *S. aucheniae*.

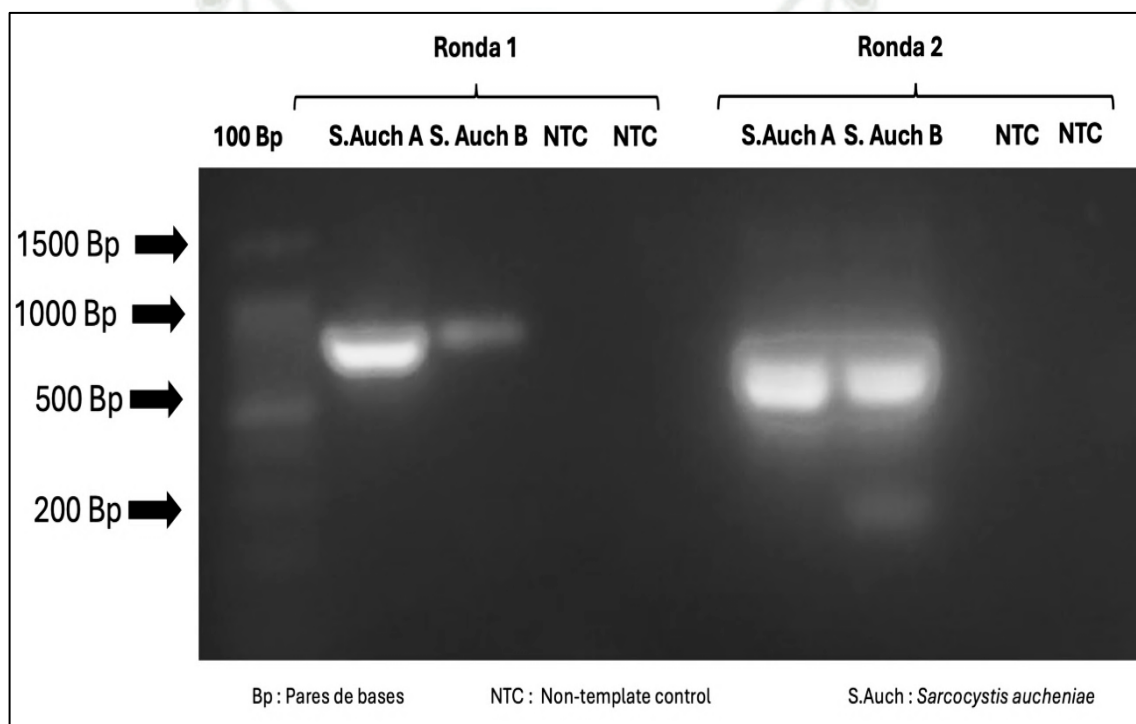


Ilustración 17: Puesta a punto 1: Prueba de primers para la detección de ADN de *S. aucheniae*

Luego, se realizó la puesta a punto 2 de límite de detección de ADN del parásito *S. aucheniae*. Para dicha prueba, se midió la concentración del control positivo mediante el uso de nanodrop, obteniéndose 46.2 ng/ul. Se realizaron 6 diluciones de manera progresiva de 1:10. Se realizó electroforesis de los amplicones tanto de la primera como de la segunda ronda y se obtuvo la ilustración 18. El límite de detección para las condiciones en las que se dio el presente trabajo fue de 460Fg, ya que en la última dilución

de 46 Fg no se obtuvo banda positiva. Se realizó el triplicado de este experimento para verificar los resultados.

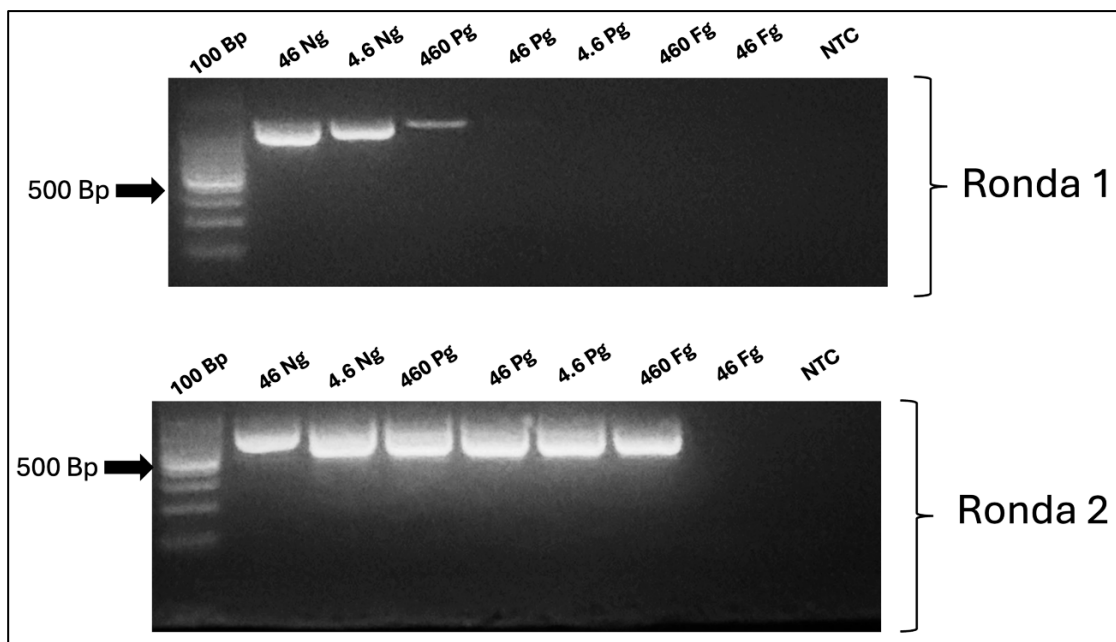


Ilustración 18: Puesta a punto 2: Límite de detección de ADN de S. aucheniae.

La prueba 3 consistió en hallar el límite de detección de ADN de alpacas, al igual que en el experimento 2, se cuantificó la concentración de ADN mediante nanodrop y se obtuvo 20.7 ng/ul. Se realizaron 6 diluciones de manera progresiva de 1:10. Se realizó electroforesis de los amplicones tanto de la primera como de la segunda ronda y se obtuvo la ilustración 19. El límite de detección para las condiciones en las que se dio el presente trabajo fue de 207pg, ya que a partir de la tercera dilución no se obtuvieron bandas positivas. Se realizó el triplicado de este experimento para verificar los resultados.

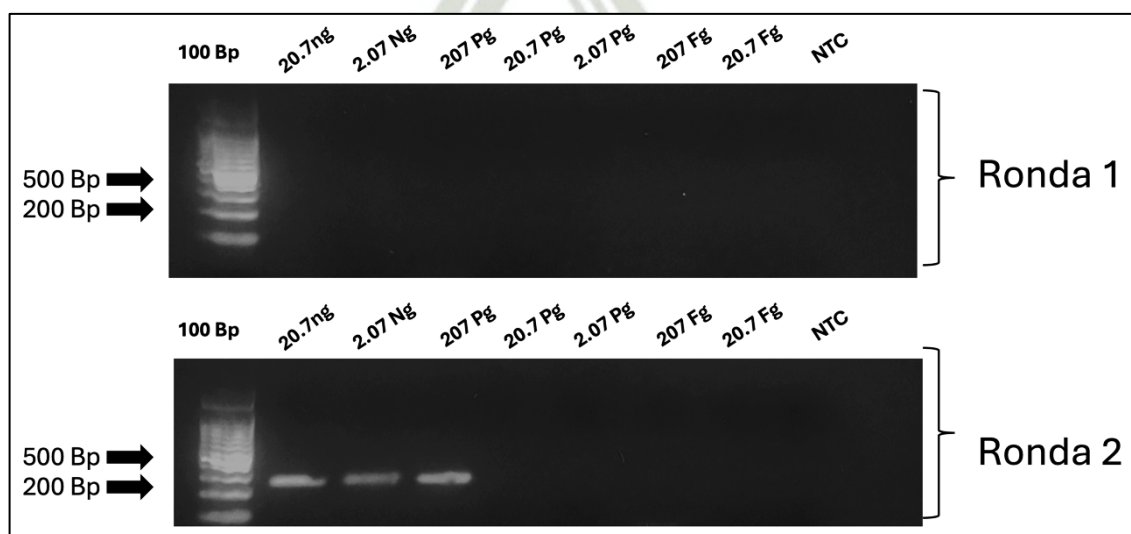
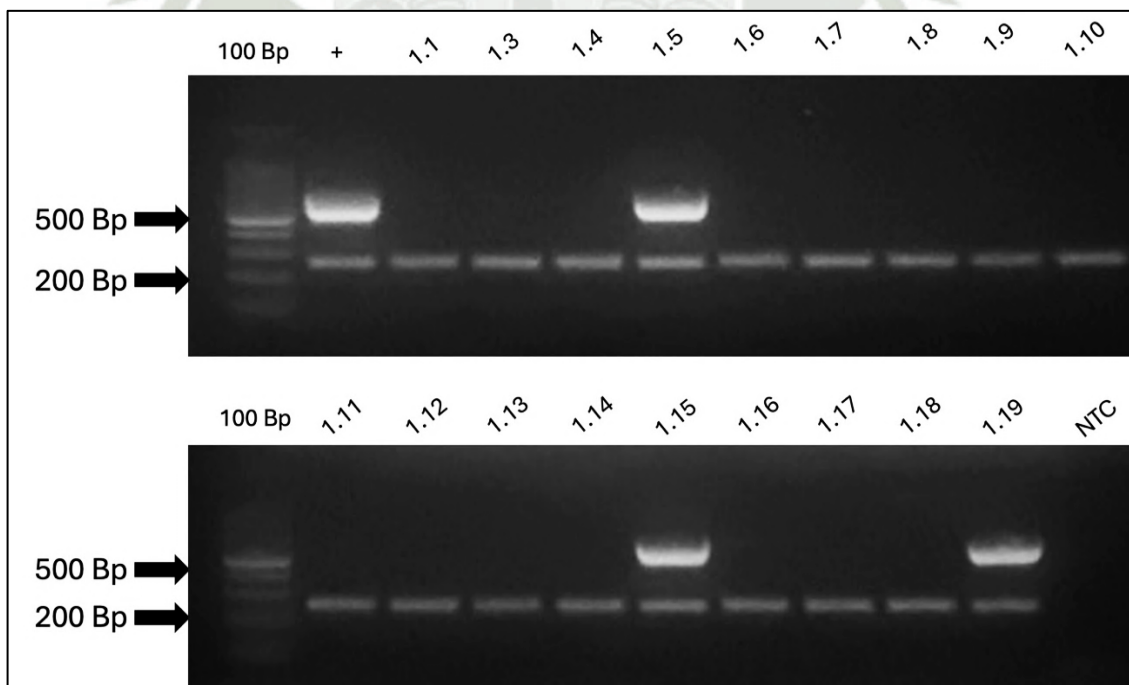


Ilustración 19: Puesta a punto 3: Límite de detección de ADN de alpaca

Resultados de geles de agarosa de muestras de sangre

Al terminar los experimentos y sus réplicas, el siguiente paso fue analizar muestras de sangre obtenida de las alpacas de CEDAT en Tocra de DESCOSUR. Para ello se procesaron un total de 281 muestras. De los 38 animales inicialmente muestreados, 16 de estos completaron el ciclo de 10 meses de muestreo. El resto de los machos fueron retirados paulatinamente, ya que debieron ir al beneficio. De cada animal se recolectó una muestra sanguínea de la vena yugular, repitiendo los muestreos por 2 (n=1), 3 (n=1), 5 (n=16), 9 (n=4) o 10 (n=16) meses, de acuerdo a la disponibilidad de los animales, durante el periodo julio 2023 a abril 2024. Los resultados obtenidos por macho y por mes se pueden observar en la Matriz de datos de resultados de PCR en capítulo Anexo de esta Tesis.

Con respecto a la electroforesis, solo se procesaron amplicones de la segunda ronda. En cada uno de los geles, un carril fue para el control positivo y otro para el control negativo, además, el primer carril de cada fila era correspondiente al marcador de peso molecular de 100pb.



*Ilustración 20: Resultado de muestras del primer mes de muestreo. La calle correspondiente a la alpaca número 5, 15 y 19 son positivas a *S. aucheniae* ya que presentan una banda de 500bp, aproximadamente. Todas las muestras dieron positivo a sangre de alpaca, lo que indica una correcta extracción de ADN*

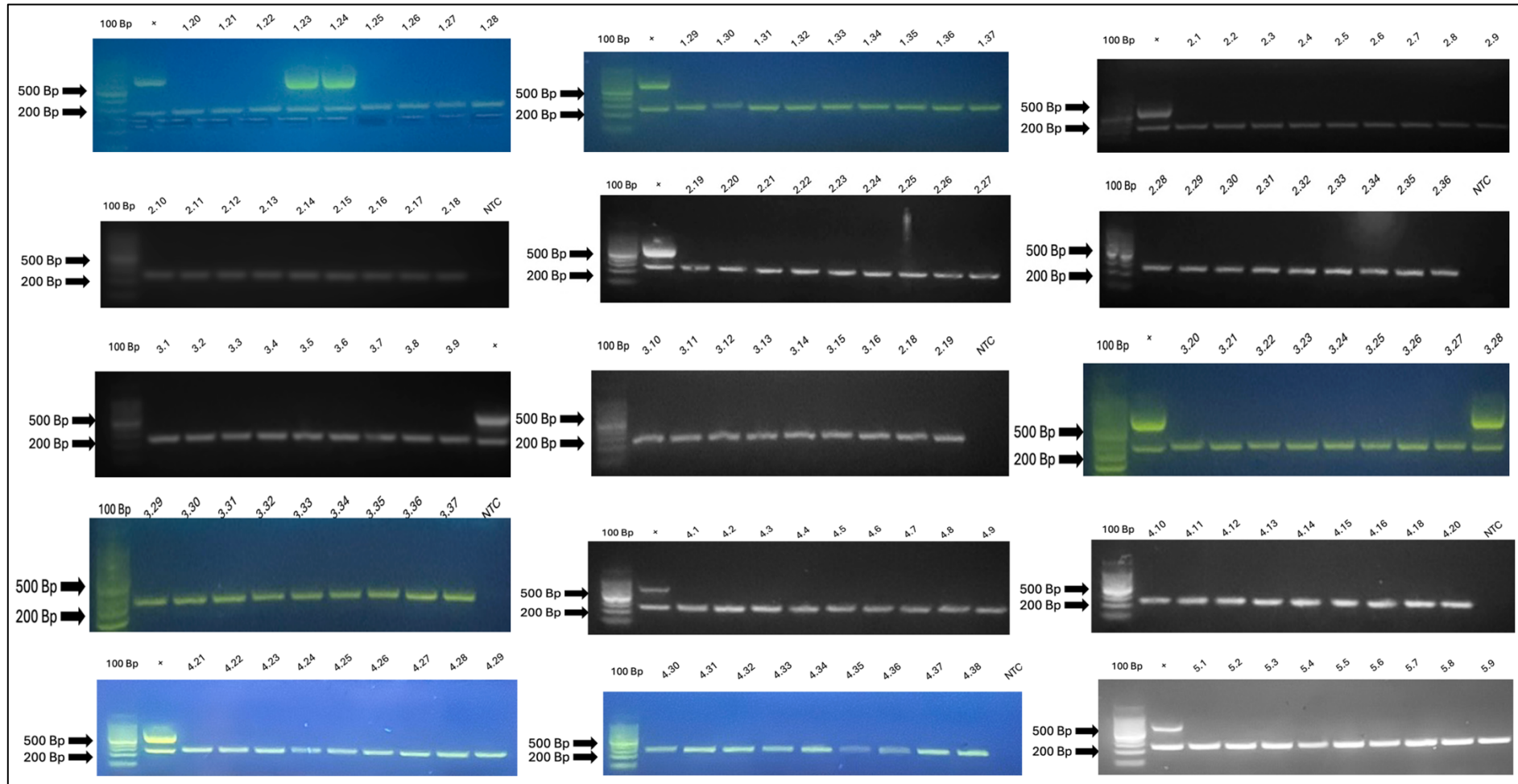


Ilustración 21: Resultados de muestras de sangre. Se detalla con n.m. siendo n=número de muestreo y m=muestra. Todas las muestras dieron positivo a sangre de alpaca, lo que indica una correcta extracción de ADN

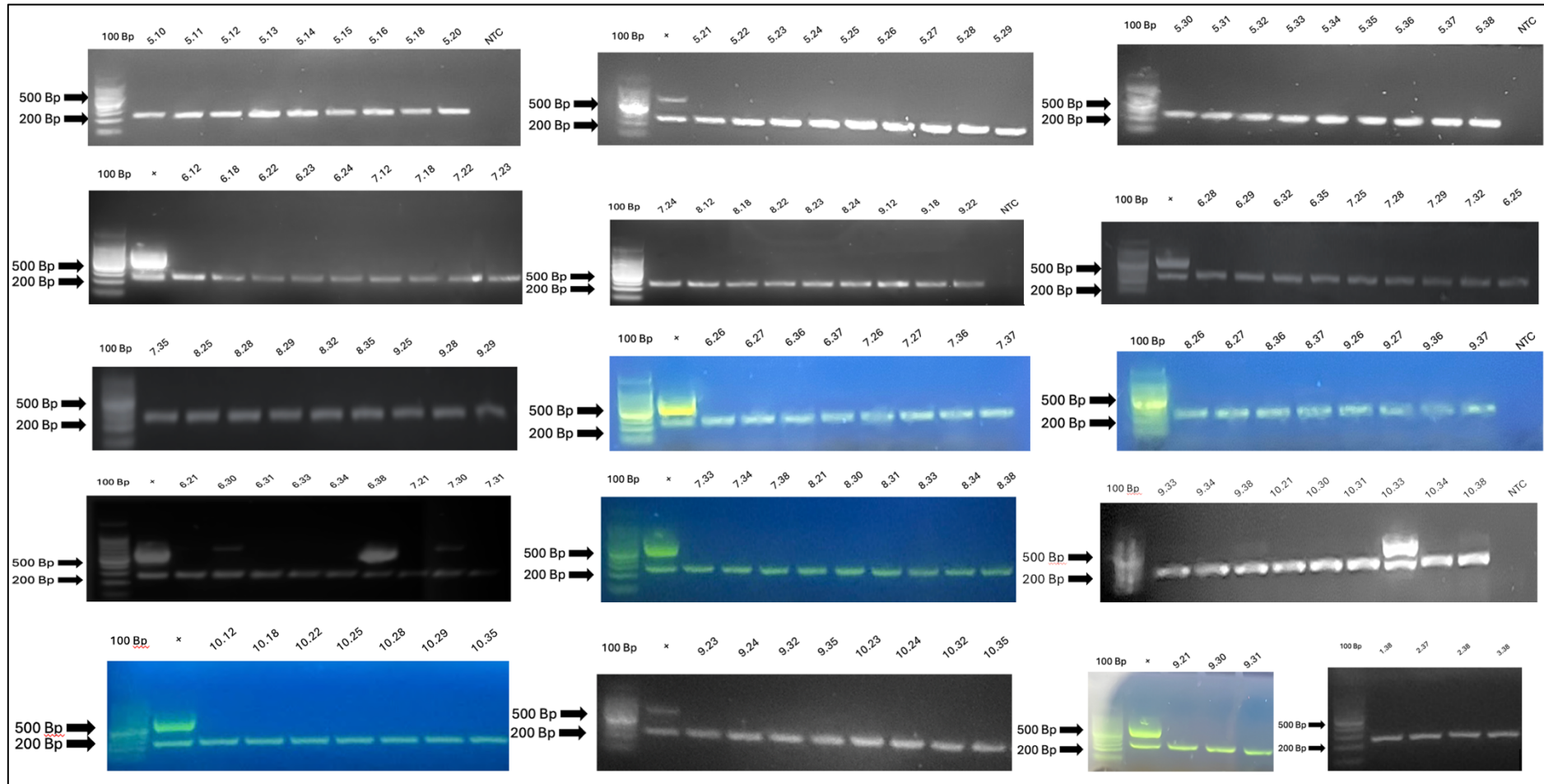


Ilustración 22: Resultados de muestras de sangre. Se detalla con n.m. siendo n=número de muestreo y m=muestra. Todas las muestras dieron positivo a sangre de alpaca, lo que indica una correcta extracción de ADN.

4.1.2. Fluctuaciones de la presencia de ADN de *S. aucheniae* determinado por PCR

Fluctuación mensual de la detección molecular de ADN de *S. aucheniae* en sangre de alpacas mayores a 3 años de edad en el periodo julio a noviembre 2023

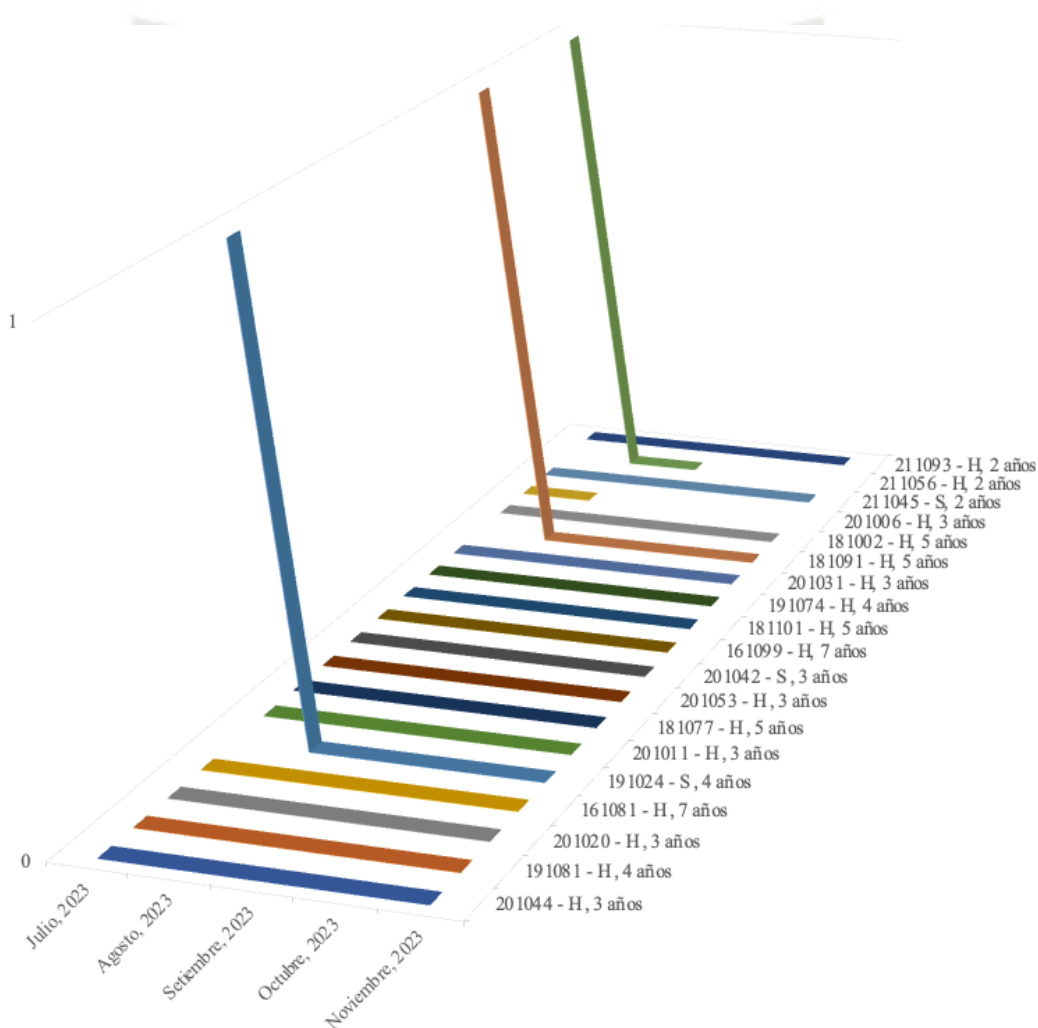


Gráfico 1: Fluctuación mensual de la detección molecular de ADN en sangre de alpacas mayores a 3 años de edad en el periodo de julio a noviembre, 2023. 1=positivo y 0=negativo. H= Huacaya y S=suri.

Fluctuación mensual de la detección molecular de ADN de *S. aucheniae* en sangre de alpacas de 2 años de edad en el periodo julio 2023 a abril 2024

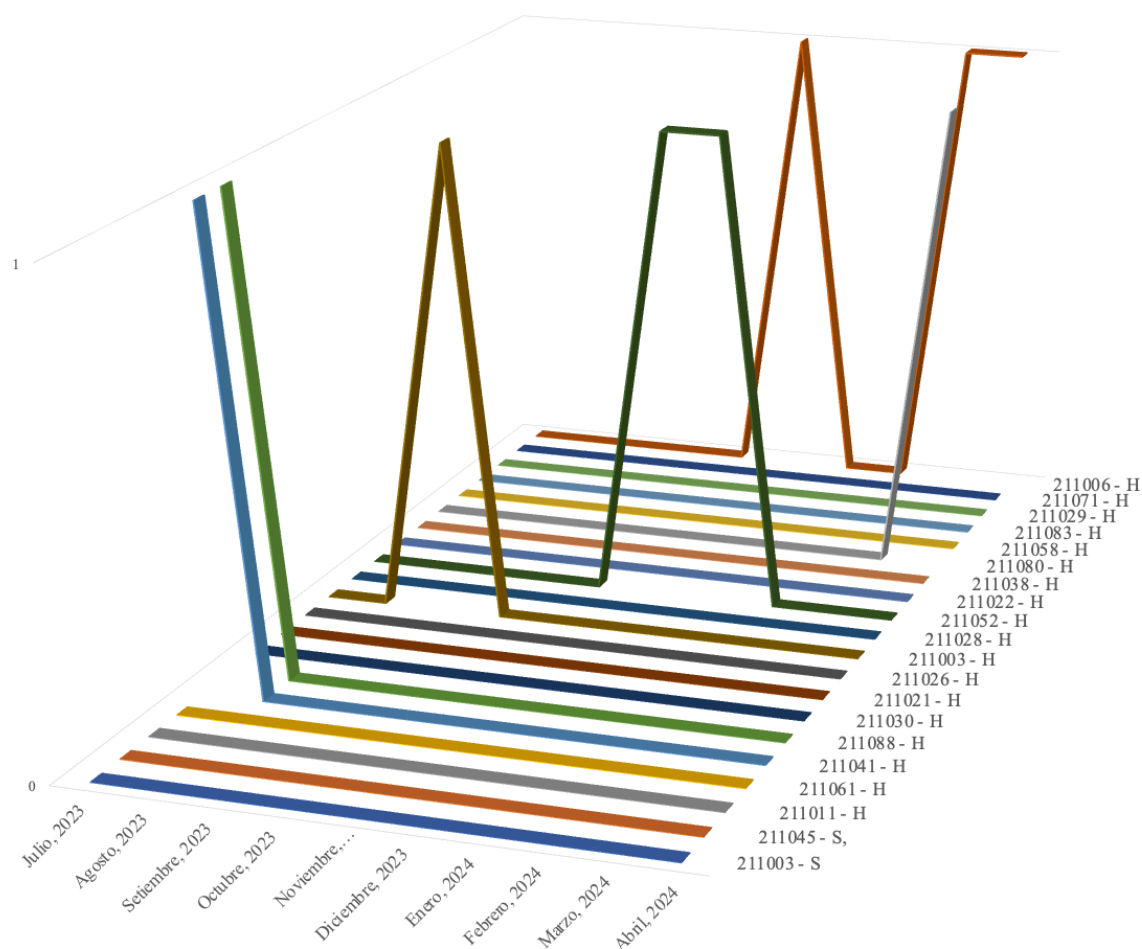


Gráfico 2: Fluctuación mensual de la detección molecular de ADN de *S. aucheniae* en sangre de alpacas de 2 años de edad en el periodo de julio 2023 a abril 2024. 1=positivo y 0=negativo. H= Huacaya y S=suri.

4.1.2.1. Fluctuación individual de alpacas en el tiempo que fueron positivas a ADN de *S. aucheniae* en algún momento del estudio

211056 - Huacaya Café, Macho, 2 años

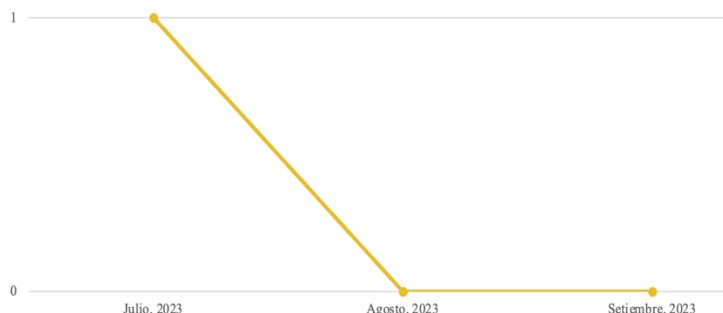


Gráfico 3: Fluctuación en el tiempo de alpaca 211056 que fue positiva a ADN de *S. aucheniae* en julio 2023. 1=positivo y 0=negativo

191024 - Suri Blanco, Macho, 4 años

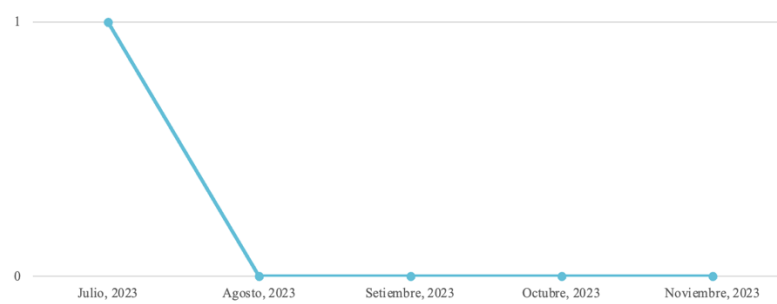


Gráfico 4: Fluctuación en el tiempo de alpaca 191024 que fue positiva a ADN de *S. aucheniae* en julio 2023. 1=positivo y 0=negativo

181091 - Huacaya Blanco, Macho, 5 años

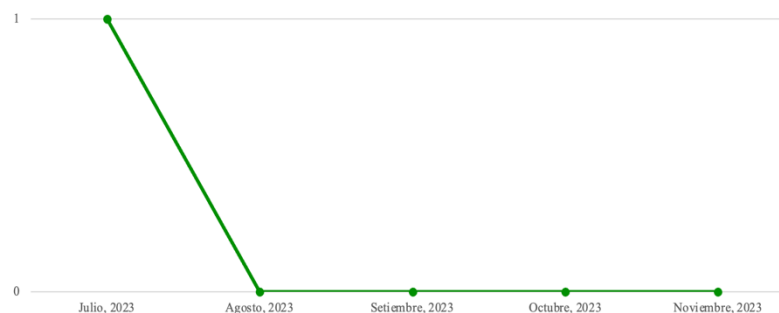


Gráfico 5: Fluctuación en el tiempo de alpaca 181091 que fue positiva a ADN de *S. aucheniae* en julio 2023. 1=positivo y 0=negativo

211041 - Huacaya Blanco, Macho, 2 años

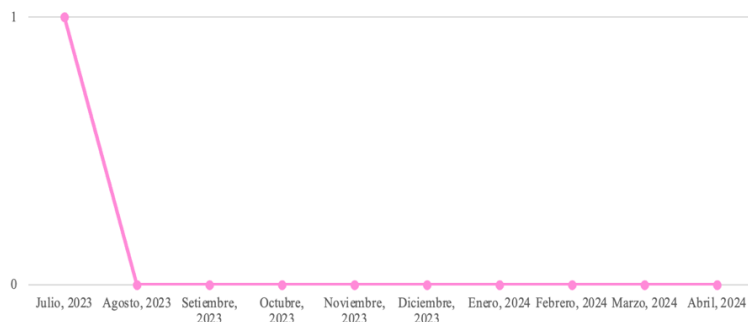


Gráfico 6: Fluctuación en el tiempo de alpaca 211041 que fue positiva a ADN de *S. aucheniae* en julio 2023. 1=positivo y 0=negativo

211088 - Huacaya Blanco, Macho, 2 años

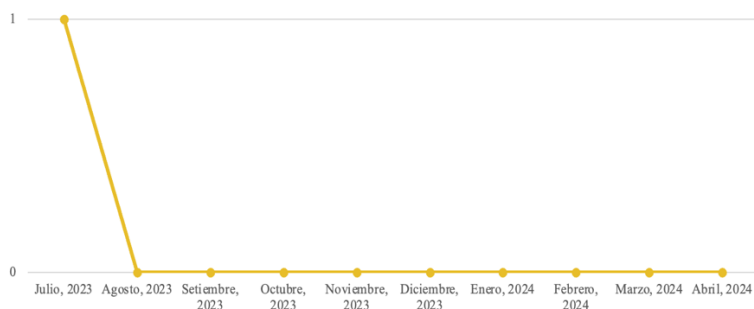


Gráfico 7: Fluctuación en el tiempo de alpaca 211088 que fue positiva a ADN de *S. aucheniae* en julio 2023. 1=positivo y 0=negativo

211003 - Huacaya Blanco, Macho, 2 años

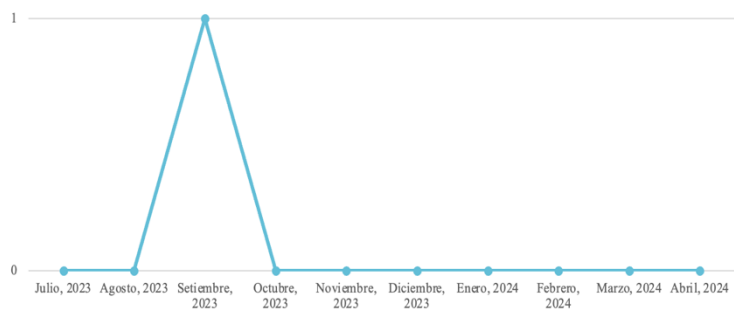


Gráfico 8: Fluctuación en el tiempo de alpaca 211003 que fue positiva a ADN de *S. aucheniae* en septiembre 2023. 1=positivo y 0=negativo

211052 - Huacaya Blanco, Macho, 2 años

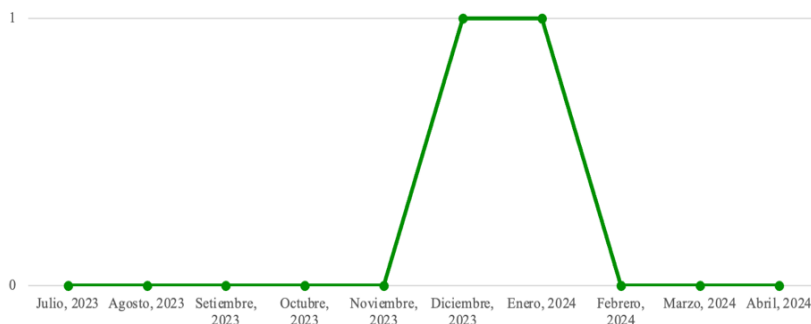


Gráfico 9: Fluctuación en el tiempo de alpaca 211052 que fue positiva a ADN de *S. aucheniae* en diciembre 2023 y enero 2024. 1=positivo y 0=negativo

211080 - Huacaya Café, Macho, 2 años

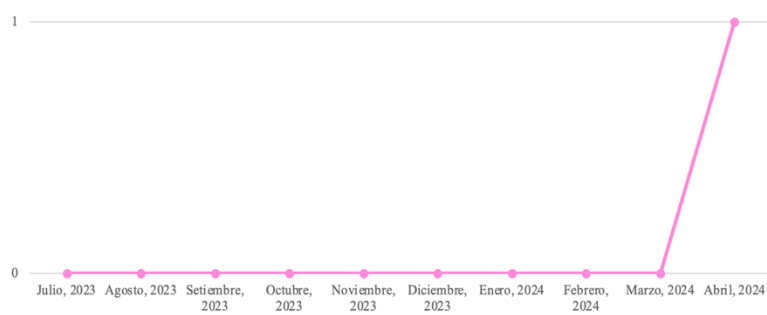


Gráfico 10: Fluctuación en el tiempo de alpaca 211080 que fue positiva a ADN de *S. aucheniae* en abril 2024. 1=positivo y 0=negativo

211006 - Huacaya Blanco, Macho, 2 años

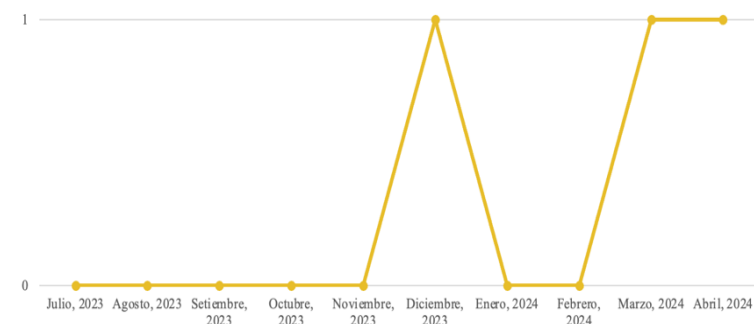
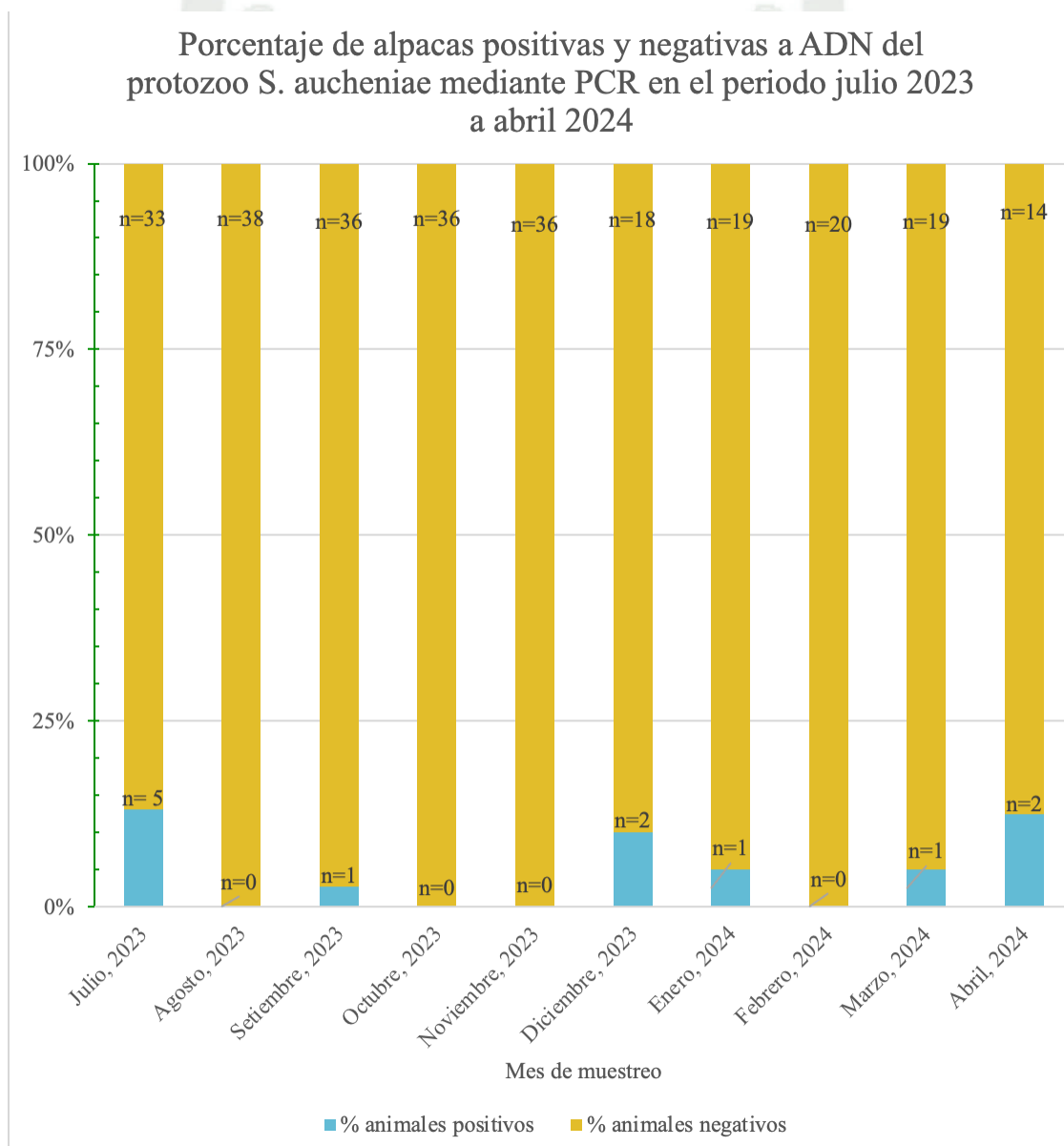


Gráfico 11: Fluctuación en el tiempo de alpaca 21006 que fue positiva a ADN de *S. aucheniae* en diciembre 2023, marzo y abril 2024. 1=positivo y 0=negativo

4.1.3. Estadística

Al finalizar con los análisis de laboratorio, se obtuvieron y realizaron tablas de frecuencias observadas, relativas y porcentuales. Se obtuvieron 12 muestras positivas al ADN del protozoo *S. aucheniae* por PCR de un total de 281 muestras analizadas, representando el 4.3%. Siendo 9 animales positivos de los 38 que fueron objeto de estudio, representando el 24% de los animales. Las tablas de frecuencias observadas se detallan en el anexo estadístico.



*Gráfico 12: Porcentaje de alpacas positivas y negativas a ADN de *S. aucheniae* por prueba molecular de PCR distribuido de manera mensual en el periodo julio 2023 a abril 2024, se detalla el valor numérico de las muestras que fueron positivas y negativas encima de cada columna del color correspondiente*

Las condiciones climáticas del periodo de muestreo de julio 2023 a abril 2024, se obtuvieron ajustando las normales climáticas promedio que obtuvo SENAMHI en el periodo 1991 a 2020 (49) con el valor promedio de las anomalías presentadas en los meses correspondientes (50). Por condiciones geográficas igualitarias de trabajo y cercanía al lugar de trabajo, se seleccionó los datos de la estación de Pillones ubicada a 4432msnm. Se obtuvo los siguientes datos:

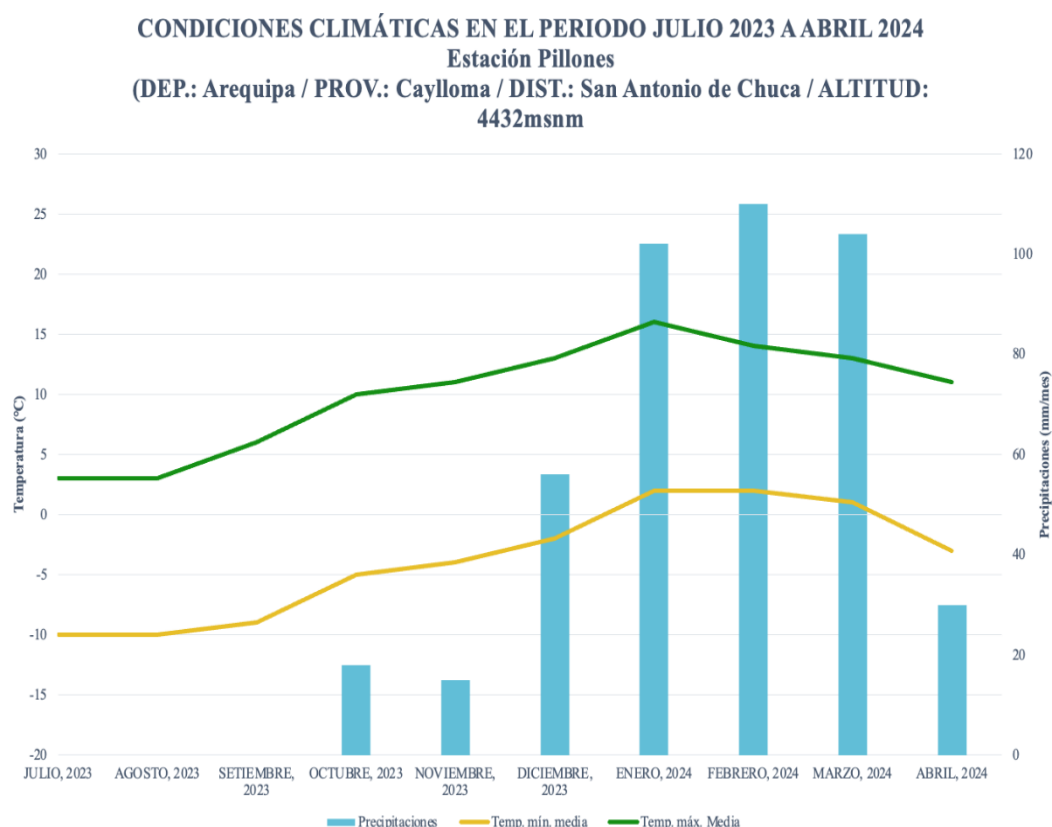


Gráfico 13: Condiciones climáticas en el periodo julio 2023 a abril 2024 en la estación de Pillones incluye precipitaciones, temperatura mínima y máxima. Adaptado de SENAMHI (50)

Porcentaje de animales positivos a ADN del protozoo *S. aucheniae* mediante PCR y temperaturas medias máximas y mínimas del periodo julio 2023 a abril 2024

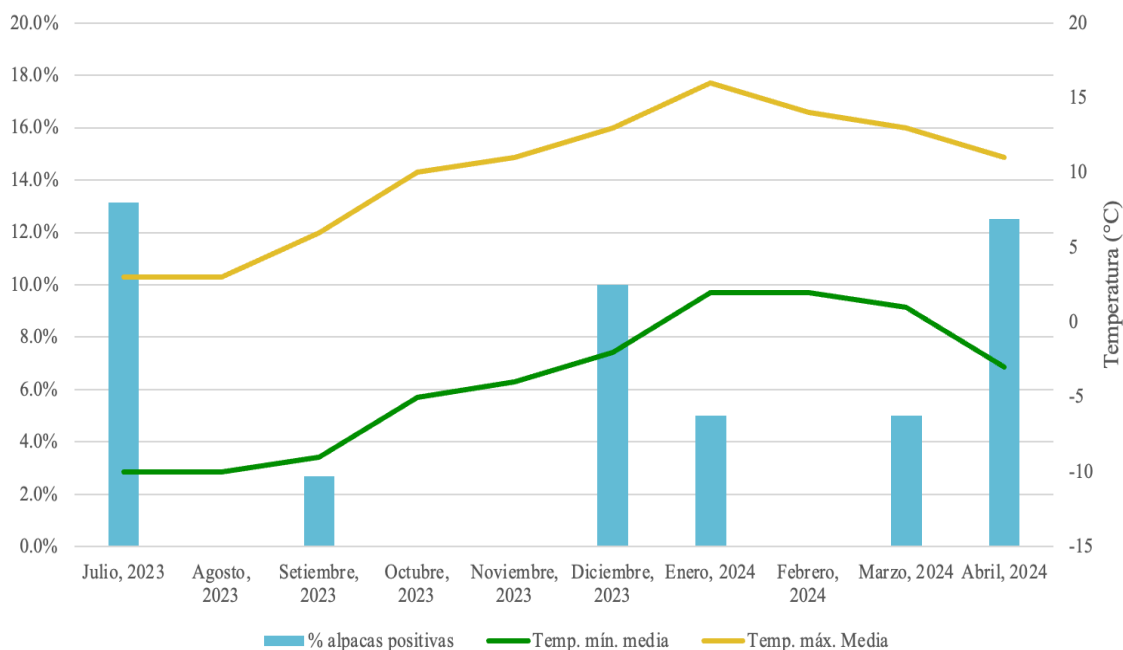


Gráfico 14: Porcentaje de animales positivos a ADN de *S. aucheniae* y temperaturas medias máxima y mínima durante el periodo julio 2023 a abril 2024

Porcentaje de animales positivos a ADN del protozoo *S. aucheniae* mediante PCR y precipitaciones pluviales del periodo julio 2023 a abril 2024

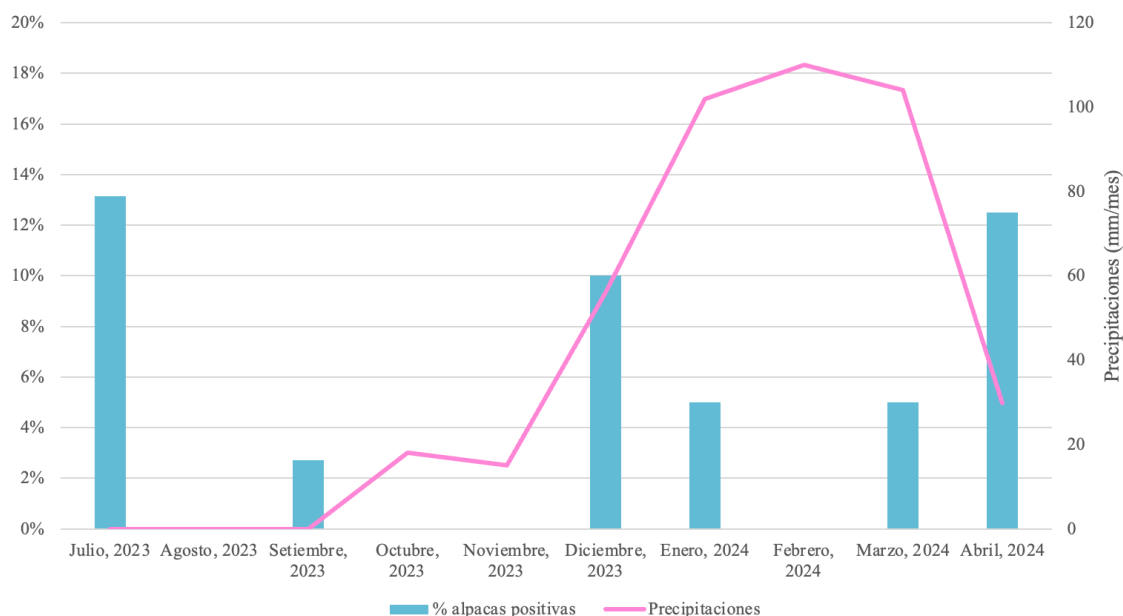


Gráfico 15: Porcentaje de animales positivos a ADN de *S. aucheniae* y precipitaciones pluviales durante el periodo julio 2023 a abril 2024

4.1.3.1. Correlación lineal entre temperatura máxima media y los animales positivos

Diagrama de dispersión (Scatterplot) del número de alpacas positivas a ADN de *S. aucheniae* mediante PCR en relación con la temperatura máxima media

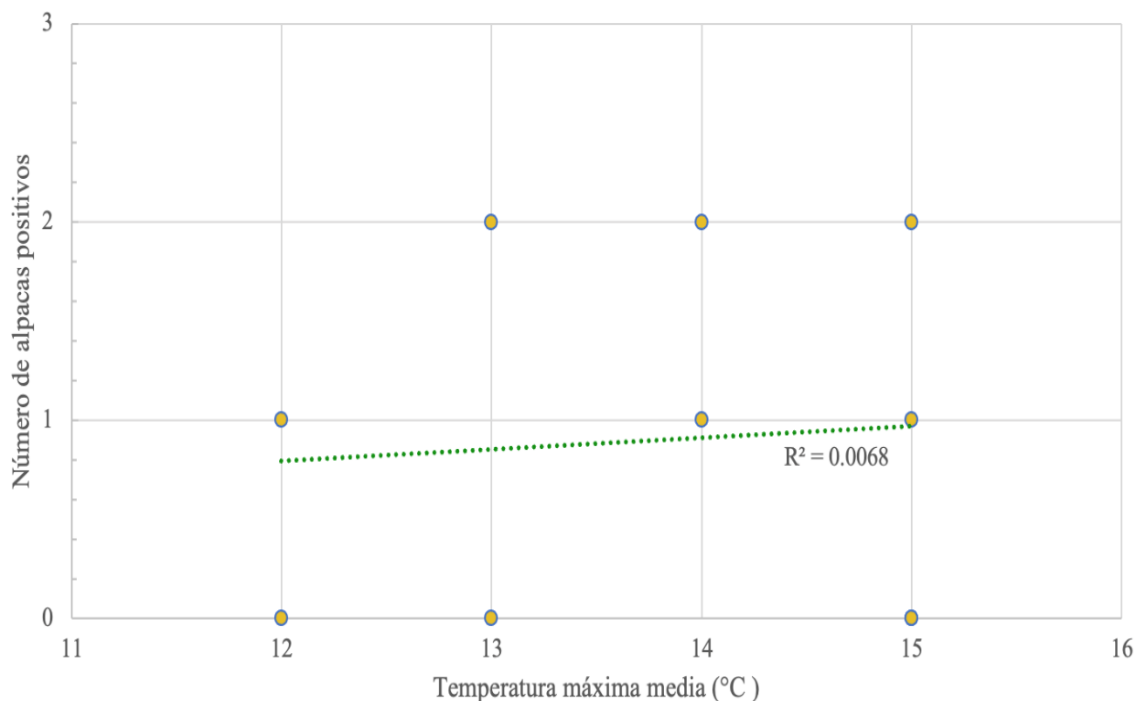


Gráfico 16: diagrama de dispersión del número de alpacas positivas en relación con temperatura máxima media

Interpretación: La correlación entre el número de alpacas positivas a ADN del protozoo *S. aucheniae* y la temperatura máxima media no existe, es decir, no están relacionadas y son independientes una de la otra.

4.1.3.2. Correlación lineal entre temperatura máxima media y el porcentaje de Animales positivos

Diagrama de dispersión (Scatterplot) del porcentaje de alpacas positivas a ADN de *S. aucheniae* mediante PCR en relación con la temperatura máxima media

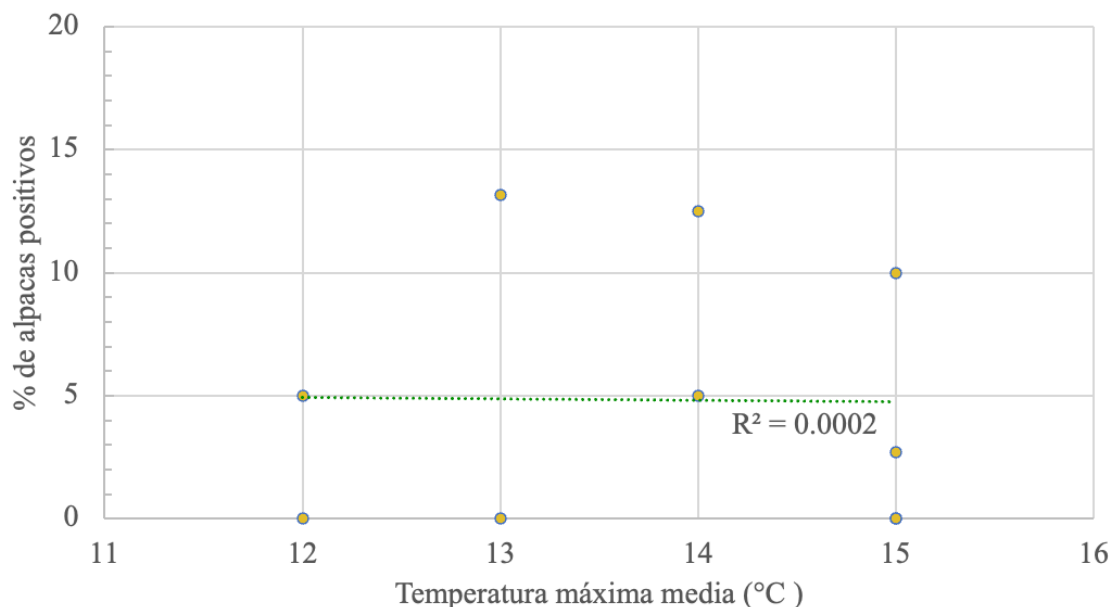


Gráfico 17: diagrama de dispersión del porcentaje de alpacas positivas en relación con temperatura máxima media

Interpretación: La correlación entre el porcentaje de alpacas positivas a ADN del protozoo *S. aucheniae* y la temperatura máxima media no existe, es decir, no están relacionadas y son independientes una de la otra.

4.1.3.3. Correlación lineal entre precipitaciones pluviales y Animales positivos

Diagrama de dispersión (Scatterplot) del número de alpacas positivas a ADN de *S. aucheniae* mediante PCR en relación con las precipitaciones pluviales

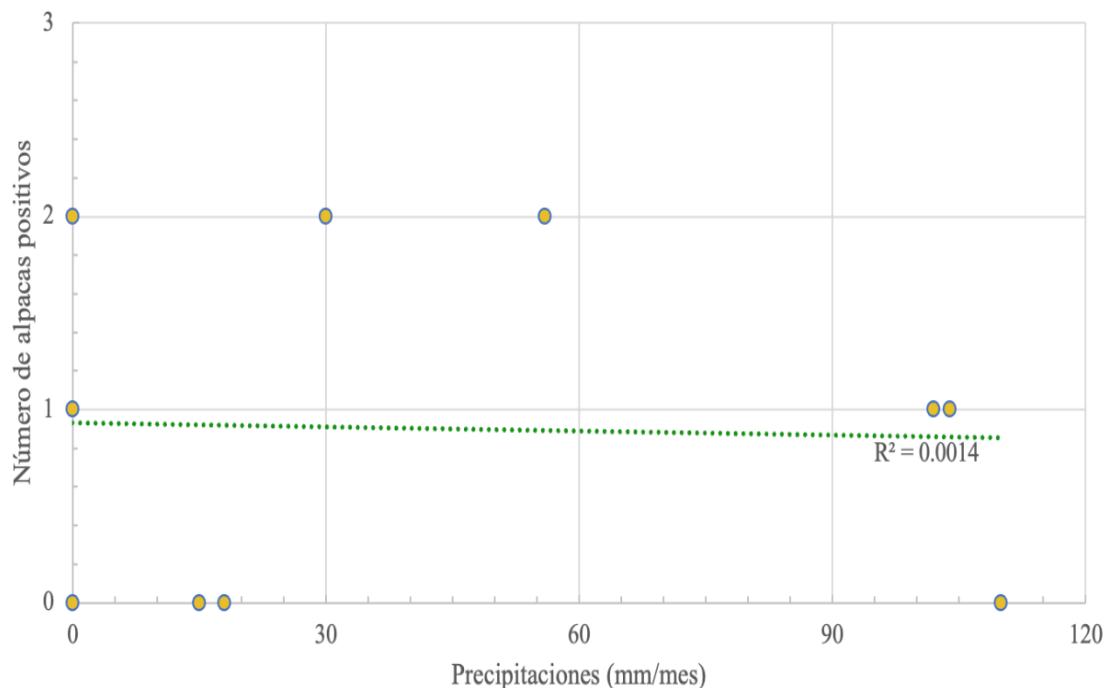


Gráfico 18: diagrama de dispersión del número de de alpacas positivas en relación con las precipitaciones pluviales

Interpretación: La correlación entre el número de alpacas positivas a ADN del protozoo *S. aucheniae* y las precipitaciones pluviales no existe, es decir, no están relacionadas y son independientes una de la otra.

4.1.3.4. Correlación lineal entre precipitaciones pluviales y porcentaje de Animales positivos

Diagrama de dispersión (Scatterplot) del porcentaje de alpacas positivas a ADN de *S. aucheniae* mediante PCR en relación con las precipitaciones pluviales

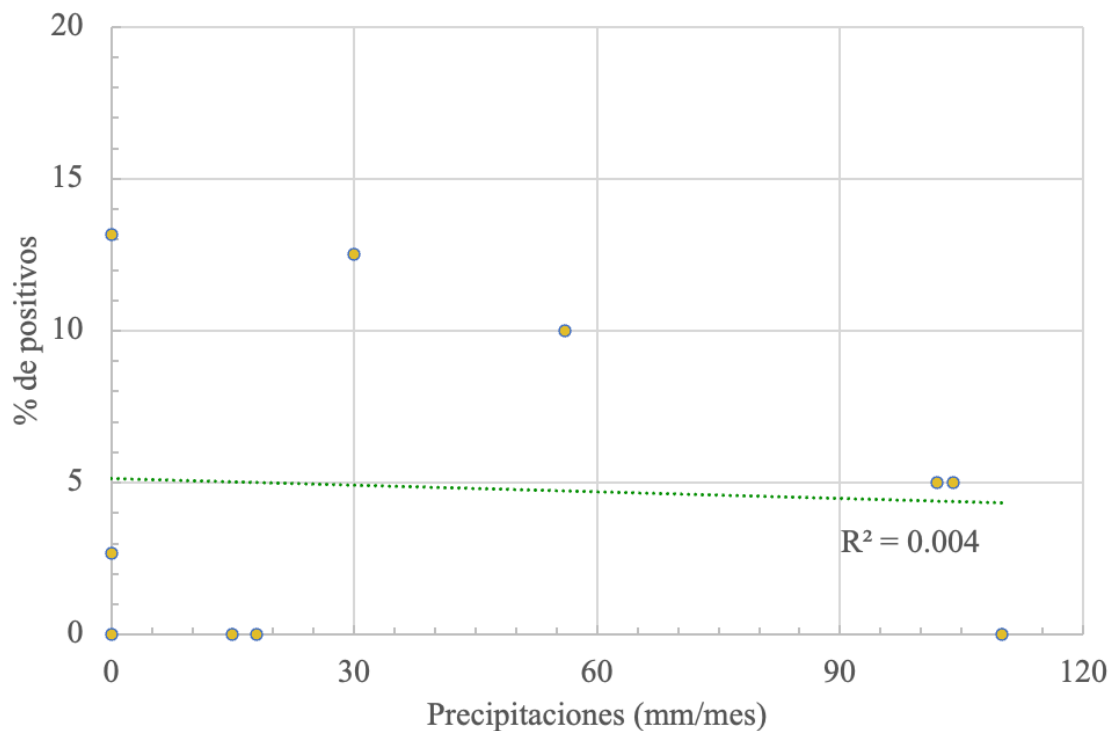


Gráfico 19: diagrama de dispersión del porcentaje de de alpacas positivas en relación con las precipitaciones pluviales

Interpretación: La correlación entre el porcentaje de alpacas positivas a ADN del protozoo *S. aucheniae* y las precipitaciones pluviales no existe, es decir, no están relacionadas y son independientes una de la otra.

4.1.4. Estadística no paramétrica

Al ser el p-valor de 0.66, mucho mayor que el nivel de significancia (0.05), los resultados de la prueba de probabilidad exacta de Fisher muestran que, con una probabilidad de error de 66%, un animal de 2 años tiene mayor probabilidad de infectarse que un animales mayor a 3 años en el periodo de 5 meses. Pero, al ser este un valor altísimo de error, aceptamos la hipótesis nula que afirma que no existe asociación entre el estado de infección y la edad de las alpacas. Es decir, la infección por *S. aucheniae* en sangre de alpacas es indiferente de la edad de las mismas.

4.2. Discusión

El desarrollo sustentable de la ganadería camélida ofrece una serie de beneficios y oportunidades muy atractivos, no solo para las comunidades alto andinas, sino para todas las comunidades de los países que poseen camélidos sudamericanos domésticos (CSD). Es de conocimiento que la buena calidad de los animales previa al beneficio de los mismos garantiza el máximo retorno económico. Sin embargo, el gran decomiso de la carne de alpaca y llama (60 a 80%) debido a la presencia de macroquistes o arrocillo, cuadro clínico llamado sarcocistiosis, impide cumplir con las expectativas que surgen por el comercio de esta carne. La presencia de estos quistes en los músculos de los CSD, impide que se pueda garantizar la seguridad alimentaria ya que, para evitar el decomiso en los canales oficiales, gran parte de los beneficios se realizan en lugares informales sin las condiciones higiénicas sanitarias que garanticen la salud pública (8). Por lo expuesto, lograr información detallada sobre el ciclo de infección de *Sarcocystis aucheniae* posibilitaría establecer nuevas medidas de control epidemiológico y de tratamiento, que posibilitaría nuevas oportunidades de crecimiento para el sector alpaquero y llamero.

Con este fin, en esta investigación de Pregrado se realizó el primer estudio, a nivel mundial, de detección de ADN de *S. aucheniae* en sangre de alpacas (*Vicugna pacos*) a lo largo de 10 meses con el objetivo principal de comprender la fluctuación de la parasitemia en función del tiempo.

Como se puede observar en el Capítulo 4 de Resultados, el porcentaje de muestras de sangre positivas a *S. aucheniae* por PCR fue del 24%. Estos resultados son algo superiores a lo observado en muestras de sangre de llama por Decker Franco et al. (29). Estos autores, en muestras de sangre recolectadas de llamas de Argentina y Bolivia (n=225) determinaron que el 18,7 % de ellas eran positivas para *S. aucheniae*. Es importante tener en cuenta que el 24% medido en este estudio corresponde a todas las muestras positivas obtenidas en el período de 10 meses estudiado, mientras que en el trabajo mencionado, se recolectó una sola muestra de sangre por animal. Como puede verse en el Capítulo 4, la detección de animales positivos ocurrió en diferentes meses del período estudiado y la positividad fue transitoria.

Es interesante destacar que, en esta investigación de Pregrado, se determinó que no existe correlación significativa entre la presencia de ADN de *S. aucheniae* en sangre de alpacas y la edad del hospedador. Similares resultados se obtuvieron en llamas por

Decker Franco et al. (29), donde tampoco se encontró correlación significativa entre la detección molecular, la edad y sexo de llamas.

Al analizar los meses de muestreo, el mes donde hubo mayor incidencia de positivos fue julio 2023, sin embargo, no se observó dependencia entre el porcentaje de detección y las condiciones climáticas, tales como temperatura media máxima y precipitaciones pluviales.

Como se mencionó en párrafos anteriores, durante este estudio se obtuvo sangre de alpacas durante 10 meses y se determinó la positividad de las mismas a ADN de *S. aucheniae*. Al analizar la Matriz de datos de resultados de PCR del punto 8.8 del Capítulo Anexo se determinaron parasitemias que no persistieron más de 30 días en un 78% de los animales positivos ($n = 9$). El 22% restante mantuvo una parasitemia durante, al menos, 60 días; uno de ellos fue negativo durante 5 meses, luego fue positivo 1 mes, el mes subsiguiente fue negativo y resultó positivo los 2 últimos meses de estudio. Este resultado es consecuente con la hipótesis de que una exposición previa al parásito no adjudica protección inmunológica que evite que el protozoo ingrese al torrente sanguíneo tras su ingestión. Adicionalmente, sugiere que, la parasitemia intermitente puede deberse a una reinfección o a que los niveles de protozoo en sangre fluctúan, pudiendo dar negativo si dicha parasitemia desciende y se encuentra fuera del límite de detección de la prueba. Esto último no se pudo determinar en el presente estudio ya que, al ser una PCR de corte final que permite visualizar mediante electroforesis la acumulación de amplicones generados al final de un ciclo, los resultados que se obtuvieron son de carácter cualitativo, es decir, se determinó si eran positivos o negativos al ADN diana, mas no se cuantificó este resultado.

La PCR semi-anidada utilizada en esta investigación fue desarrollada por Decker Franco et al (29) y corresponde a una mejora de una PCR semi-anidada desarrollada previamente por el mismo grupo de investigación (30). En ambos casos, se utilizó como secuencia diana el gen 18S ARNr. Este gen tiene amplias regiones conservadas con otros coccidios que también pueden infectar CSA, como *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*. Sin embargo, hay una región polimórfica, es decir que es diferente para las distintas especies, y allí pudo diseñarse el primer Sauch-R, específico para *S. aucheniae* que se usó en ambos estudios. Para analizar el límite de detección de estas técnicas, se utilizaron suspensiones de bradizoitos de densidad conocida, medida en cámara de Neubauer. Se agregaron experimentalmente distintos números de bradizoitos a alícuotas

de 1 ml de sangre de llama, y se realizó la extracción de ADN de cada suspensión y la detección por semi-nested PCR. La PCR de *Martin et al.*, (30), alcanzó un límite de sensibilidad de 1 parásito en 10 μ l de sangre, es decir, 100 parásitos por ml, en cambio la de Decker et al. (29) permitió la detección de 0,5 parásitos por ml de sangre, es decir una sensibilidad 200 veces mayor. Si bien, ambos protocolos son similares, varían en las combinaciones de primers que se usan en las dos rondas de la PCR. Además, en el segundo protocolo, se incluyeron primers para detectar ADN de CSA como control de la metodología. Estos primers usan como secuencia diana el gen 16S ARNr mitocondrial. Este control es útil para poder determinar que tanto la extracción de ADN como la PCR funcionaron correctamente, dado que todas las muestras deben mostrar la banda correspondiente a ADN de CSA de entre 200 y 300 pb. Por otra parte, sólo las muestras positivas a *S. aucheniae* mostrarán una banda de entre 500 y 600 pb luego de la segunda ronda, al analizar los productos de amplificación por electroforesis horizontal.

En esta investigación, se realizó una determinación de la sensibilidad analítica de esta PCR semi-anidada. Para ello, se realizaron diluciones seriadas 1:10 de ADN genómico extraído de macroquistes, hasta la concentración de 1:10⁶. Cada dilución fue testeada por PCR semi-anidada y se observó hasta cual dilución se obtenía una banda de 500-600 pb luego de la segunda ronda. El límite de detección, para las condiciones en las que se dio el presente trabajo, fue de 0.46 pg en 13 μ l de reacción, Rojas (35) obtuvo 1pg en 25 μ l de reacción. Ambas concentraciones con resultados son similares. La técnica molecular empleada en el presente estudio utilizó 13 μ L como volumen final y 1 μ L de templado, el empleado por Rojas (35) fue de 25 μ L como volumen final y 2 μ L de templado. En ambos estudios se emplearon muestras sanguíneas, Rojas empleó EDTA como anticoagulante y el presente estudio, citrato de Sodio. Se analizaron mediante PCR semi-anidada, sin embargo, en el presente estudio se emplearon, además, cebadores para ADN de *Lama glama* en ambas rondas de PCR, mientras que en el de Rojas (35), solo en la segunda ronda. Las condiciones de ciclado fueron las mismas en ambos estudios.

Rojas (35) utilizó el mismo protocolo de PCR semi-anidada para analizar el porcentaje de positividad en alpacas adultas de ambos sexos de la provincia de Huancavelica (n=50). El porcentaje de resultados positivos fue de 32%. Los animales estudiados fueron adultos de ambos sexos, pero no se especifica la edad ni el método de crianza que tuvieron los animales. Es importante destacar que los animales evaluados en el presente estudio, pertenecían a un centro donde la crianza es controlada, las condiciones

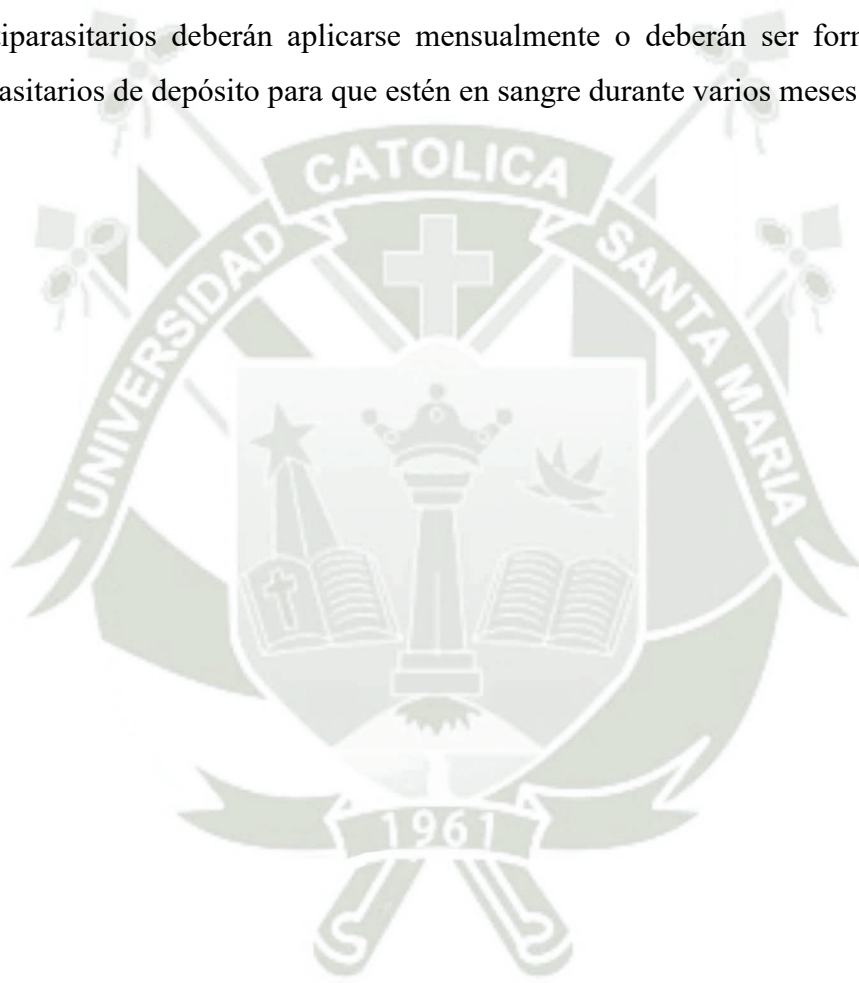
sanitarias no son deficientes y a los perros se los desparasita contra endoparásitos periódicamente. Estas diferencias podrían explicar el porcentaje más bajo de animales positivos obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, otros factores de tipo geográfico o climático, o incluso un diferente perfil genético de los animales podrían contribuir a estas diferencias.

Rooney et al. (23) estudiaron la presencia de macroquistes en los músculos de llamas de Bolivia de ambos sexos y diferentes edades, luego del beneficio. Encontraron un mayor porcentaje de positividad a quistes en hembras y animales mayores de 2 años y medio. La mayor proporción de quistes en animales mayores es también una observación común de los productores de CSD, que tratan de llevar al beneficio a animales jóvenes, para evitar el decomiso. Rooney (23) propuso que las hembras podrían estar mayormente infectadas debido a la fluctuación inmunológica que presentan durante la preñez y el parto; por otro lado, los animales de mayor edad tienen mayor probabilidad a la exposición del protozoo a lo largo de su vida. Es importante destacar que la detección de ADN del parásito en sangre no se correlaciona con la presencia de macroquistes observada visualmente luego del beneficio, y se considera que corresponde a la etapa inicial de la infección, poco después que el CSA ha ingerido esporoquistes de *S. aucheniae* con el agua o pasturas infectadas (29). En esta investigación, se trabajó sólo con machos, por lo que no pudo estudiarse la correlación entre infección y sexo, pero no se hallaron diferencias significativas entre juveniles y adultos, lo cual coincide con lo observado por Decker Franco et al. (29). Esto indicaría que animales de todos los grupos etarios tienen la misma probabilidad de infectarse y en todos los casos, el parásito puede llegar al torrente sanguíneo. Las diferencias en cuanto a la carga de quistes en los tejidos podrían deberse a múltiples re-infecciones durante el transcurso de la vida del animal, por lo que un animal mayor tendrá más posibilidades de adquirir una carga parasitaria mayor. Otra explicación posible es que el sistema inmune de los animales jóvenes está mejor preparado que el de los mayores para combatir al parásito e impedir que se aloje en la musculatura. No se conoce además el tiempo necesario para que se forme un quiste macroscópico luego de que un parásito invade a una célula muscular. Estudios enfocados en la respuesta inmune humoral y celular evocadas por *S. aucheniae* y el desarrollo de modelos de infección *in vitro* podrían ayudar a develar estos interrogantes.

Es importante destacar que en la presente investigación se ha desarrollado e iniciado una línea de investigación en alpacas sobre el protozoo *S. aucheniae* y que,

debido a la información obtenida con métodos científicos de alta fiabilidad, permitirá el planteamiento de investigaciones aplicadas y desarrollo tecnológico de mecanismos y herramientas de diversos tipos para mitigar la enfermedad de Sarcocistiosis en llamas y alpacas.

En esta investigación, al determinar que hay una recirculación del parásito en sangre, abre nuevos conceptos en el estudio de la farmacocinética de los futuros antiparasitarios contra *S. aucheniae*. Dado que existe recirculación del mismo en sangre, los antiparasitarios deberán aplicarse mensualmente o deberán ser formulados como antiparasitarios de depósito para que estén en sangre durante varios meses.





CAPITULO V

5. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos, se concluye lo siguiente:

Primera: La técnica de PCR semi-anidada dúplex para la detección molecular de *S. aucheniae* a partir de ADN de muestras sanguíneas de alpacas (*Vicugna pacos*) es un aporte altamente significativo para el diagnóstico en animales vivos.

Segunda: El porcentaje de resultados positivos a ADN de *S. aucheniae* en sangre fue del 24%, existiendo circulación del parásito en sangre de alpacas de Tocra, según los meses observados.

Tercera: La sensibilidad analítica de la prueba de PCR semi-anidada dúplex para la detección de ADN de *S. aucheniae* en sangre de alpacas, bajo las condiciones de ciclado del presente estudio, fue de 0.46 pg por 13 μ L de reacción.

Cuarta: La parasitemia puede fluctuar, ya sea por recirculación del parásito en la sangre o por reinfección. Bajo el rango de detección de las condiciones del presente estudio, se determinó que la parasitemia dura alrededor de 30 días, pudiendo alcanzar los 60.

Quinta: No existe relación significativa entre la presencia de ADN de *S. aucheniae* en sangre de alpacas y la edad. Los animales jóvenes tienen estadísticamente las mismas probabilidades de infección que los animales adultos.

Sexta: La mayor incidencia de positivos fue julio del año 2023, sin embargo, no existe dependencia a las condiciones climáticas, como temperatura media máxima y precipitaciones pluviales.



CAPITULO VI

6. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda la aplicación de la técnica de PCR semi-anidada dúplex como método de diagnóstico de la sarcocistiosis en alpacas ocasionada por el protozoario *S. aucheniae* para establecer su comportamiento epidemiológico y, consecuentemente, poder plantear medidas de control efectivas.
2. Se sugiere la realización de la prueba molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real para determinar los niveles de parasitemia y su fluctuación en el tiempo de ADN de *S. aucheniae* en sangre de alpacas y así obtener datos cuantitativos.
3. Debido a que se desconoce el tiempo necesario para que se forme un quiste macroscópico luego de que un parásito invade a una célula muscular, se sugieren estudios enfocados en la respuesta inmune humoral y celular evocadas por *S. aucheniae*, además, el desarrollo de modelos de infección *in vitro* podrían ayudar a develar estos interrogantes.
4. La técnica de PCR semi-anidada dúplex, empleada en esta investigación, es una herramienta que se puede emplear para los siguientes fines: (1) diagnóstico de focos activos de transmisión de sarcocistiosis, (2) evaluar la efectividad de las medidas sanitarias de control, (3) estudio del curso de la infección, y (4) rastreo de hospederos definitivos.



CAPITULO VII

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Saeed MA, Rashid MH, Vaughan J, Jabbar A. Sarcocystosis in South American camelids: The state of play revisited. Vol. 11, Parasites and Vectors. BioMed Central Ltd.; 2018.
2. Carletti T, Martin M, Romero S, Morrison DA, Marcoppido G, Florin-Christensen M, et al. Molecular identification of *Sarcocystis aucheniae* as the macrocyst-forming parasite of llamas. *Vet Parasitol.* 2013 Dec 6;198(3–4):396–400.
3. More G, Regensburger C, Gos ML, Pardini L, Verma SK, Ctibor J, et al. *Sarcocystis masoni*, n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae), and redescription of *Sarcocystis aucheniae* from llama (*Lama glama*), guanaco (*Lama guanicoe*) and alpaca (*Vicugna pacos*). *Parasitology.* 2016 Apr 1;143(5):617–26.
4. Giuliano SM ROJBMXFCM. Situación actual de la calidad de carne de camélidos sudamericanos (llama y alpaca) en Argentina y Perú y su relación con la infestación con *Sarcocystis aucheniae*”. Libro de Actas XXIII Reunión Nacional de la Asociación Boliviana de Producción Animal – ABOPA. 2023;1–9.
5. Ministerio de desarrollo agrario y riego. El Agro en cifras. 2024 [cited 2023 Feb 2]; Available from: https://siea.midagri.gob.pe/portal/phocadownload/datos_estadisticas/mensual/Agro/2024/Agro_en_cifras_01_2024.pdf
6. Wieser SN, Giuliano SM, Reategui Ordoñez J, Barriga Marcapura X, Olivera LVM, Chavez Fumagalli MA, et al. *Sarcocystis* spp. of New and Old World Camelids: Ancient Origin, Present Challenges. *Pathogens* [Internet]. 2024 Mar 1 [cited 2024 Jun 18];13(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38535539/>
7. FAO. FAOstat 2019 [Internet]. 2019 [cited 2024 Jun 19]. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>
8. Zarrin M, Riveros JL, Ahmadpour A, de Almeida AM, Konuspayeva G, Vargas-Bello-Pérez E, et al. Camelids: new players in the international animal production context. *Trop Anim Health Prod* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2024 Jun 19];52(3):903–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31898022/>

9. Cristofanelli S, Antonini M, Torres D, Polidori P, Renieri C. Meat and carcass quality from Peruvian llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*). *Meat Sci* [Internet]. 2004 [cited 2024 Jun 19];66(3):589–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22060868/>
10. Coates W, Ayerza R. Fatty acid composition of llama muscle and internal fat in two Argentinian herds. *Small Ruminant Research*. 2004 May 1;52(3):231–8.
11. Salvá BK, Zumalacárregui JM, Figueira AC, Osorio MT, Mateo J. Nutrient composition and technological quality of meat from alpacas reared in Peru. *Meat Sci*. 2009 Aug 1;82(4):450–5.
12. Mamani-Linares LW, Cayo F, Gallo C. Características de canal, calidad de carne y composición química de carne de llama: una revisión. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, RIVEP* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jun 19];25(2):123–50. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371834046001>
13. Bowman D. *Parasitología para Veterinarios*. 9th ed. ELSEVIER, editor. España; 2011. 115–200 p.
14. Florin-Christensen M, Schnittger L. *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets*.
15. Al-Quraishy S, Abdel-Ghaffar F, Dkhil MA, Abdel-Gaber R. Haemogregarines and criteria for identification. Vol. 11, *Animals*. MDPI AG; 2021. p. 1–25.
16. Brumpt E. *Precis Parasitologie* [Internet]. 2nd ed. Francia: Masson et Cie; 1913 [cited 2023 Jan 26]. Available from: <https://www.abebooks.com/book-search/title/precis-parasitologie/author/brumpt/>
17. Quiroga D, Lombardero O. *Sarcocystis tilopodi* n. sp. en guanacos (*Lama guanicoe*) de la Republica Argentina. *Gaceta Veterinaria* [Internet]. 1969 [cited 2023 Jan 26];31:67–70. – 70. Available from: www.produccion-animal.com.ar
18. Gorman TR, Alcaíno HA, Muñoz H, Cunazza C. *Sarcocystis* sp. in guanaco (*Lama guanicoe*) and effect of temperature on its viability. *Vet Parasitol*. 1984;15(2):95–101.
19. Dubey JP, Hilali M, Van Wilpe E, Calero-Bernal R, Verma SK, Abbas IE. A review of sarcocystosis in camels and redescription of *Sarcocystis cameli* and *Sarcocystis ippeni* sarcocysts from the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Parasitology*. 2015 Oct 1;142(12):1481–92.

20. Dubey JP, Calero-Bernal R, Rosenthal BM, Speer CA, Fayer R. Sarcocystosis of Animals and Humans - 2nd Edition - J. P. Dubey - R. [Internet]. 2016 [cited 2023 Jan 26]. Available from: <https://www.routledge.com/Sarcocystosis-of-Animals-and-Humans/Dubey-Calero-Bernal-Rosenthal-Speer-Fayer/p/book/9780367575458>
21. Decker Franco C. Avances en el conocimiento de la sarcocistiosis de camélidos sudamericanos y desarrollo de herramientas para su control. [Buenos Aires]: Universidad de Buenos Aires; 2019.
22. Savini G, Robertson ID, Dunsmore JD. Viability of the sporocysts of *Sarcocystis cruzi* after exposure to different temperatures and relative humidities. Vol. 67, *Veterinary Parasitology*. 1996.
23. Rooney AL, Limon G, Vides H, Cortez A, Guitian J. *Sarcocystis* spp. in llamas (*Lama glama*) in Southern Bolivia: A cross sectional study of the prevalence, risk factors and loss in income caused by carcass downgrades. *Prev Vet Med*. 2014 Oct 1;116(3):296–304.
24. Velásquez L, Soncco J, Valderrama A. *Sarcocystis aucheniae* en camélidos sudamericanos y factores de riesgo en la provincia de Lucanas. *Salud y Tecnología Veterinaria*. 2019 Aug 26;7(1):8–13.
25. Castro E, Sam R, López T, González A, Silva M. Evaluación de la edad como factor de riesgo de seropositividad a *Sarcocystis* sp. en alpacas. *Revista De investigación Veterinaria Perú*. 2004;15(1):83–6.
26. Romero S, Carletti T, Decker Franco C, Moré G, Schnittger L, Florin-Christensen M. Seropositivity to *Sarcocystis* infection of llamas correlates with breeding practices. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. 2017 Dec 1;10:65–70.
27. Chávez A, Leyva V, Panez S, Ticona D, García W, Pezo D. Sarcocistiosis y la eficiencia productiva de la alpaca sarcocystiosis and productive efficiency of the alpaca. *Rev Inv Vet Perú*. 2008;19(2):160–7.
28. Fernandez-F F, Gutiérrez-A R, Pacheco-S V, Chirinos-T J, Lombardo DM, Oliv-Era LVM, et al. Highlights Determination of *Sarcocystis lamarcaensis* Microcysts in the Cardiac Muscle of Alpacas (*Vicugna pacos*) and Their Affinity with Troponin cTnI. A Study Performed in the High Andean Region of Southern Peru A Study

- Performed in the High Andean Region of Southern Peru [Internet]. 2022. Available from: <https://ssrn.com/abstract=4208124>
29. Decker Franco C, Romero S, Ferrari A, Schnittger L, Florin-Christensen M. Detection of *Sarcocystis aucheniae* in blood of llama using a duplex semi-nested PCR assay and its association with cyst infestation. *Heliyon*. 2018 Nov 1;4(11):e00928.
 30. Martín M, Franco CD, Romero S, Carletti T, Schnittger L, Florin-Christensen M. Detección molecular de *Sarcocystis aucheniae* en sangre de llamas de Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2016;48(3):200–5.
 31. Alberto Cruz-Enríquez J, Sara Elva Espinosa-Padilla D, Alejandro Medina-Torres E. Importancia del adecuado protocolo de extracción de DNA para estudios moleculares. [cited 2023 Apr 3]; Available from: www.medigraphic.org.mx
 32. Gerald Karp. *Biología Celular y Molecular - Conceptos y Experimentos*. 7th ed. McGraw-Hill, editor. México; 2014.
 33. María J, Merino M, Gallego RE, Gómez J, De Alda O, Gómez Ochoa De Alda J. Extracción de ADN con material cotidiano: desarrollo de una estrategia interdisciplinaria a partir de sus fundamentos científicos. *Educación química* [Internet]. 2019 Jan [cited 2023 Apr 3];30(1):58–68. Available from: https://www.youtube.com/watch?v=PkjtFM_UVxk
 34. Corporation P. ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System Instructions for Use of Products A5080, A5081 and A5082 [Internet]. 2021 [cited 2024 Jan 22]. Available from: <https://worldwide.promega.com/es-es/products/nucleic-acid-extraction/genomic-dna/reliaprep-blood-gdna-miniprep-system/?catNum=A5081#specifications>
 35. Deisy Janeth Rojas Valdez. Diagnóstico de *Sarcocystis aucheniae* por PCR semi-anidada en sangre de alpacas de la provincia de huancavelica. [Perú]: Universidad Nacional De Cajamarca; 2022.
 36. Universidad Complutense de Madrid. *Procesos genéticos de la síntesis de proteínas: traducción*. 2019.
 37. Valenzuela-González F, Casillas-Hernández R, Villalpando E, Vargas-Albores F. El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Cienc Mar*

- [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2023 Apr 23];41(4):297–313. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-38802015000400297&lng=es&nrm=iso&tlng=es
38. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013;133(3):1–4.
 39. Perera CL, Acevedo AM. New trends in the diagnosis of animal viral diseases. *Revista de Salud Animal* [Internet]. 2018 [cited 2023 Apr 3];40(3):2224–4700. Available from: <http://opn.to/a/nITgL>
 40. Lela Buckingham. *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods, and Clinical Applications*. Tercera. F.A. Davis Company, editor. Reino Unido; 2019. 9–15 p.
 41. Universidad de Granada. PCR [Internet]. 2018 [cited 2023 Apr 22]. Available from: <https://www.ugr.es/~rmbblazquez/pcr1.html>
 42. Regensburger C, Gos ML, Ctibor J, Moré G. Morphological and Molecular Characteristics of *Sarcocystis aucheniae* Isolated from Meat of Guanaco (*Lama guanicoe*) [Internet]. Vol. 2, *Journal of Food Quality and Hazards Control*. 2015. Available from: <http://www.jfqhc.com>
 43. Decker Franco M;, Romero C;, Carletti S;, Schnittger T; Molecular detection of *Sarcocystis aucheniae* in the blood of llamas from Argentina. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2016 [cited 2023 Apr 3];48:200–5. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213047799005>
 44. Gobierno del Perú. El Perú es la primera potencia mundial en producción de fibra de alpaca - Noticias - Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego - Plataforma del Estado Peruano [Internet]. 2019 [cited 2024 Dec 2]. Available from: <https://www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/49289-el-peru-es-la-primera-potencia-mundial-en-produccion-de-fibra-de-alpaca>
 45. Sheri Amsel. *Exploring Nature Educational Resource* ©2005-2024. 2024 [cited 2024 Jan 29]. Llama Venipuncture - Drawing Blood in the Llama. Available from: <https://www.exploringnature.org/db/view/Llama-Venipuncture-Drawing-Blood-in-the-Llama>

46. Thermo scientific. T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers. 2022 [cited 2024 Apr 30]; Available from: www.nanodrop.com
47. PROMEGA. 100bp DNA Ladder [Internet]. 2019 [cited 2024 Mar 23]. Available from: <https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/dna-ladder-rna-ladder/100bp-dna-ladder/?catNum=G2101>
48. Kuckartz USRTEJS. Statistik : eine verständliche Einführung. VS, Verl. für Sozialwiss.; 2013. 274 p.
49. SENAMHI. Normales Climáticas Estándares y Medias [Internet]. 2024 [cited 2024 Apr 26]. Available from: <https://www.senamhi.gob.pe/?&p=normales-estaciones>
50. SENAMHI. SENAMHI - Condiciones Climaticas [Internet]. 2024 [cited 2024 May 26]. Available from: <https://www.senamhi.gob.pe/?&p=condiciones-climaticas#>
51. Gerencia Regional de Salud Gobierno Regional de Arequipa. Provincia de Arequipa [Internet]. 2024 [cited 2024 Mar 24]. Available from: <https://www.saludarequipa.gob.pe/epidemiologia/ASIS/docs/regional/provincial.htm>
52. PREDES - Centro de Estudios y Prevención de Desastres. Fortaleciendo capacidades para reducir el riesgo de desastres y aumentar la resiliencia en las comunidades de Caylloma, Arequipa | PREDES [Internet]. 2024 [cited 2024 Mar 24]. Available from: <https://predes.org.pe/proyectos/fortalecimiento-capacidades-para-reducir-el-riesgo-de-desastres-y-aumentar-la-resiliencia-en-las-comunidades-de-caylloma-arequipa/>
53. Family Search. Caylloma, Arequipa, Perú - Genealogía - FamilySearch [Internet]. 2024 [cited 2024 Mar 26]. Available from: https://www.familysearch.org/es/wiki/Caylloma,_Arequipa,_Per%C3%BA_-_Genealog%C3%ADA



CAPITULO VIII

8. ANEXOS

8.1. Hoja de campo

FICHA DE REGISTROS MENSUAL – TOCRA

Lugar muestreo: _____

Fecha: _____

Personal encargado: _____

Código: _____

	ID alpaca	Sexo	Edad	Biotipo	Color	Hora	Observaciones
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							

8.2. Hoja de trabajo para PCR

Fecha: __/__/20__

PCR – PROYECTO SARCOCYSTIOSIS

MASTER MIX PARA PRIMERA RONDA

Reactivo	[] inicial	[] requerida	Vol/muestra (uL)	Vol. final (uL) (pruebas)
dNTP mix	10mM	0.2mM	0.3	
PRIMER	cocc18S-F1	10uM	0.4uM	0.5
	Sauch-R	10uM	0.4uM	0.5
	Lg_16sRNA_F	10uM	0.1uM	0.1
	Lg_16sRNA_R	10uM	0.1uM	0.1
Buffer 5x green	5x	1x	2.6	
MgCl₂	25mM	1 - 4mM (2mM)	1.0	
Taq polimerasa	5U/uL	0.4U/reacción	0.1	
Muestra			1.0	
Agua libre de nucleasas			6.8	
TOTAL			13uL / muestra	

MASTER MIX PARA SEGUNDA RONDA

Reactivo	[] inicial	[] requerida	Vol/muestra (uL)	Vol. final (uL) (pruebas)
dNTP mix	10mM	0.2mM	0.3	
PRIMER	cocc18S-F2	10uM	0.4uM	0.5
	Sauch-R	10uM	0.4uM	0.5
	Lg_16sRNA_F	10uM	0.1uM	0.1
	Lg_16sRNA_R	10uM	0.1uM	0.1
Buffer 5x green	5x	1x	2.6	
MgCl₂	25mM	1 - 4mM (2mM)	1.0	
Taq polimerasa	5U/uL	0.4U/reacción	0.1	
Amplicón de 1R			1.0	
Agua libre de nucleasas			6.8	
TOTAL			13uL / muestra	

MUESTRAS Y NUMERO DE TUBO

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

8.3. Hoja de trabajo para electroforesis

Fecha: __/__/20__

ELECTROFORESIS HORIZONTAL – PROYECTO SARCOCYSTIOSIS

PREPARACIÓN DE BUFFER TAE 1X (TOTAL: ___ ml)

Reactivo	Cantidad (ml)
Buffer TAE 50 x	
Agua destilada	

PREPARACIÓN DE GEL AGAROSA (Concentración: ___ %)

Reactivo	Cantidad
Agarosa	g
Buffer TAE 1X	ml
Sybr Green	uL

PREPARACIÓN DE MUESTRA

Reactivo	Cantidad (uL)
Muestra	
Loading Buffer 6x	

PREPARACIÓN DE MARCADOR DE ADN

Reactivo	Cantidad (uL)
Marcador 100bP ladder	
Loading Buffer 6x	
Agua libre de nucleasas	

MUESTRAS EN CADA WELL

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22

8.4. Mapa de localizaciones

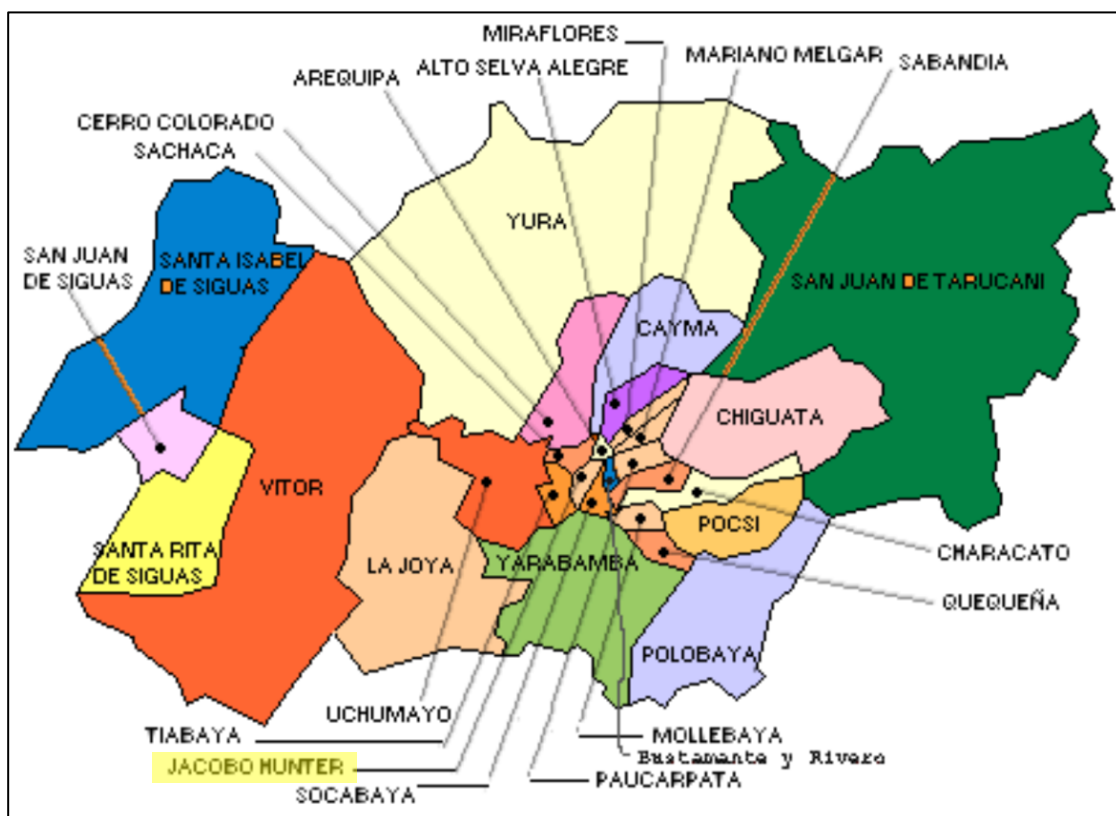


Ilustración 23: Mapa de distritos de la provincia de Arequipa – Arequipa, se señala el distrito de Jacobo Hunter, ubicación del laboratorio de biotecnología y reproducción animal del vicerrectorado de investigación de la UCSM (51)

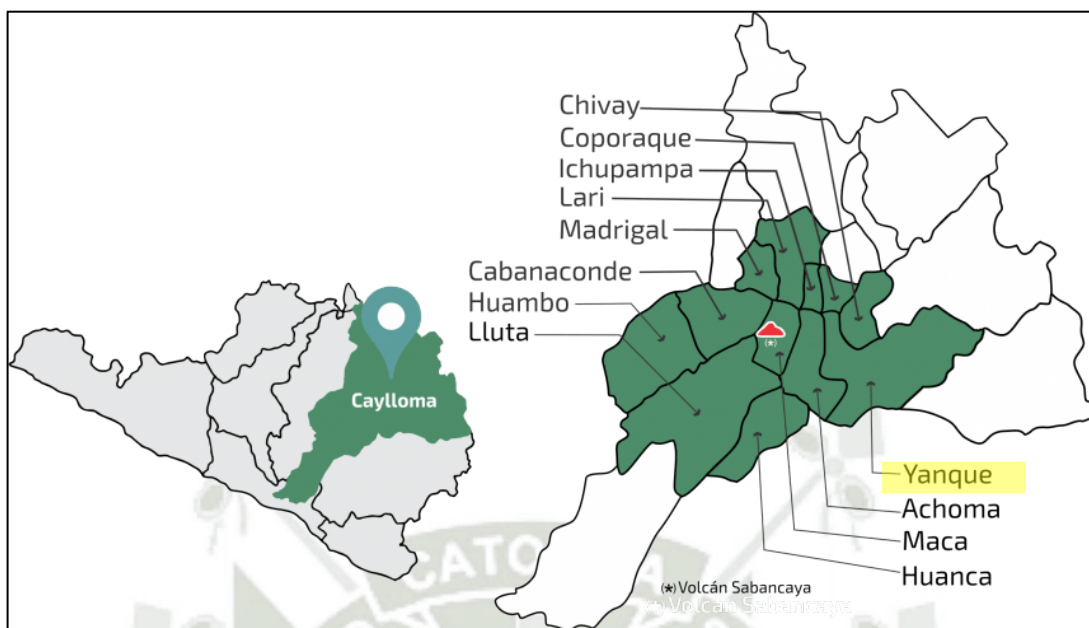


Ilustración 24: Mapa de la provincia de Caylloma – Arequipa, se señala el distrito de Yanque, ubicación del trabajo de campo en CEDAT de DESCOSUR en Tocra (52)



Ilustración 25: Distritos de la provincia de Caylloma – Arequipa, se señala el distrito de Yanque, ubicación del trabajo de campo en CEDAT de DESCOSUR en Tocra (53).

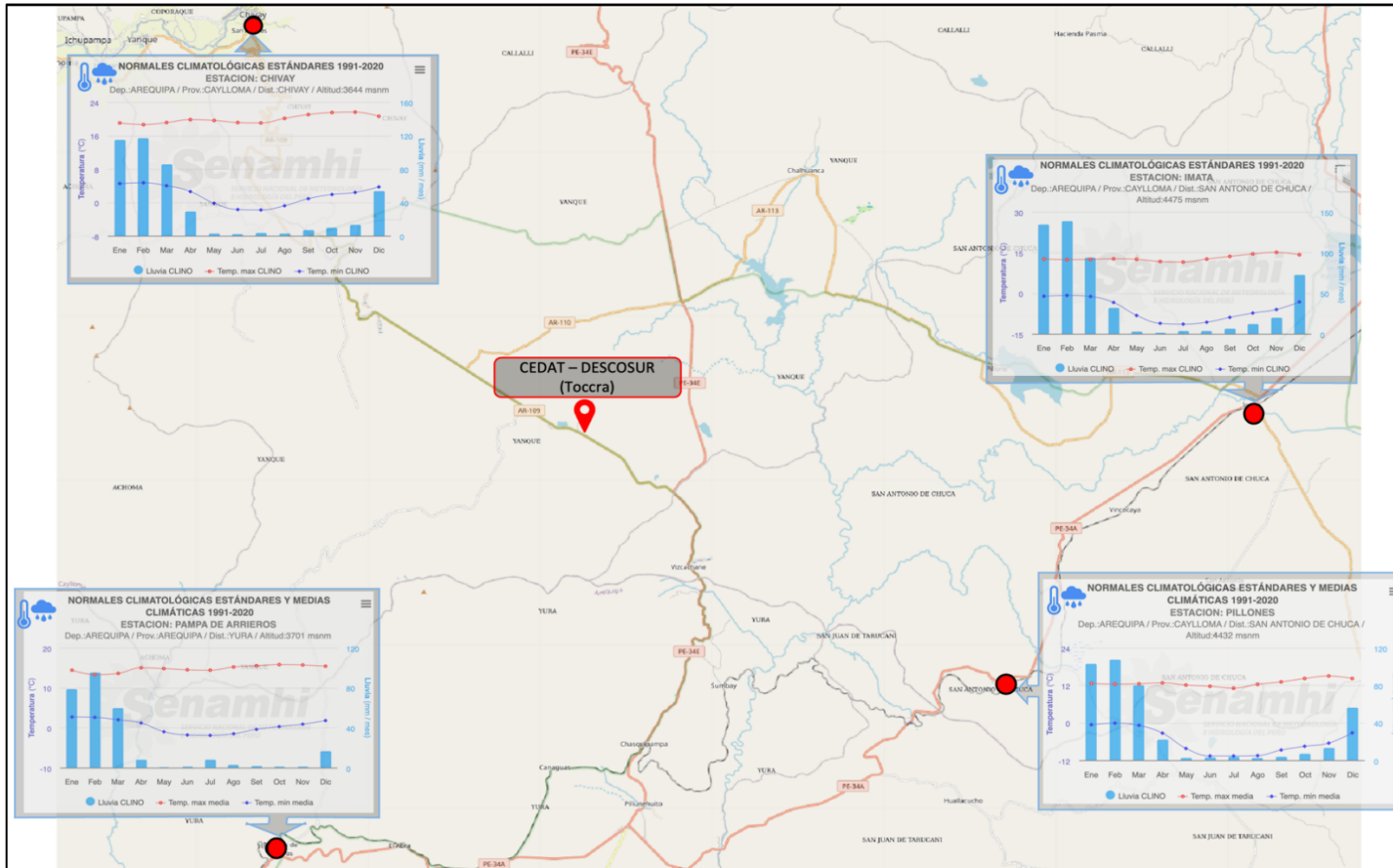


Ilustración 26: Ubicación del centro CEDAT de DESCOSUR en Toccoa, se señalizan las estaciones próximas: superior de izquierda a derecha: Chivay (Arequipa, Caylloma, Chivay, 3644msnm) e Imata (Arequipa, Caylloma, San Antonio de Chuca, 4475msnm). Inferior de izquierda a derecha: Pampa de Arrieros (Arequipa, Arequipa, Yura, 3701msnm) y Pillones (Arequipa, Caylloma, San Antonio de Chuca, 4432msnm). Adaptado de SENAMHI (49)

8.5. Condiciones climáticas: normales de estación Pillones

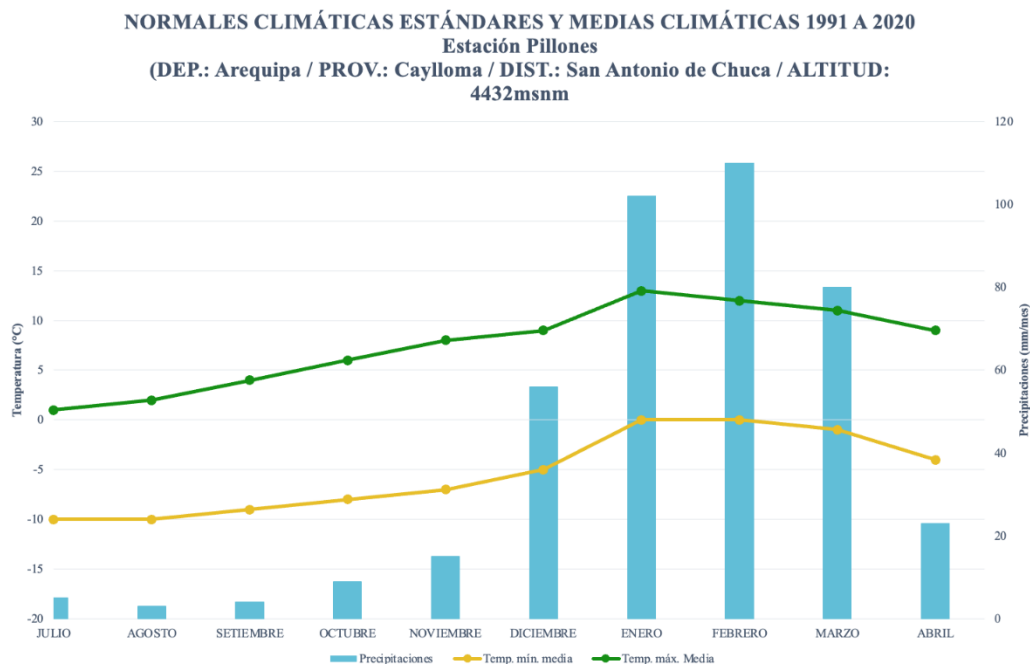


Gráfico 20: Normales climatológicas estándares y medias climáticas periodo 1991 a 2020 de la estación Pillones, incluye precipitaciones, temperatura mínima y máxima en los meses de enero a diciembre. Adaptado de SENAMHI (49)

8.6. Condiciones climáticas: anomalías

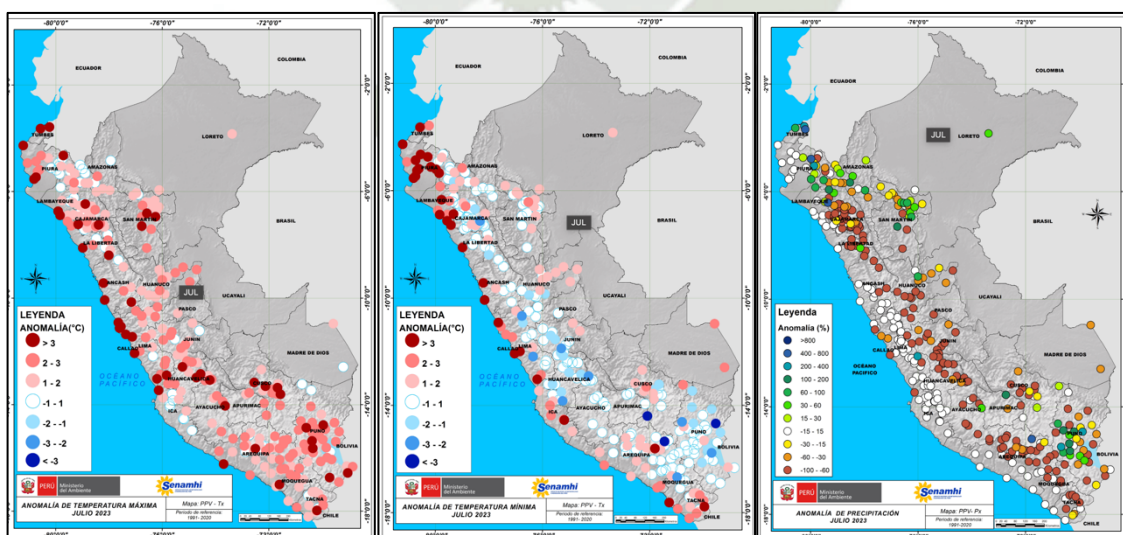


Ilustración 27: Anomalías de julio 2023. De izquierda a derecha: Temperatura máxima. Temperatura mínima. Precipitación (50)

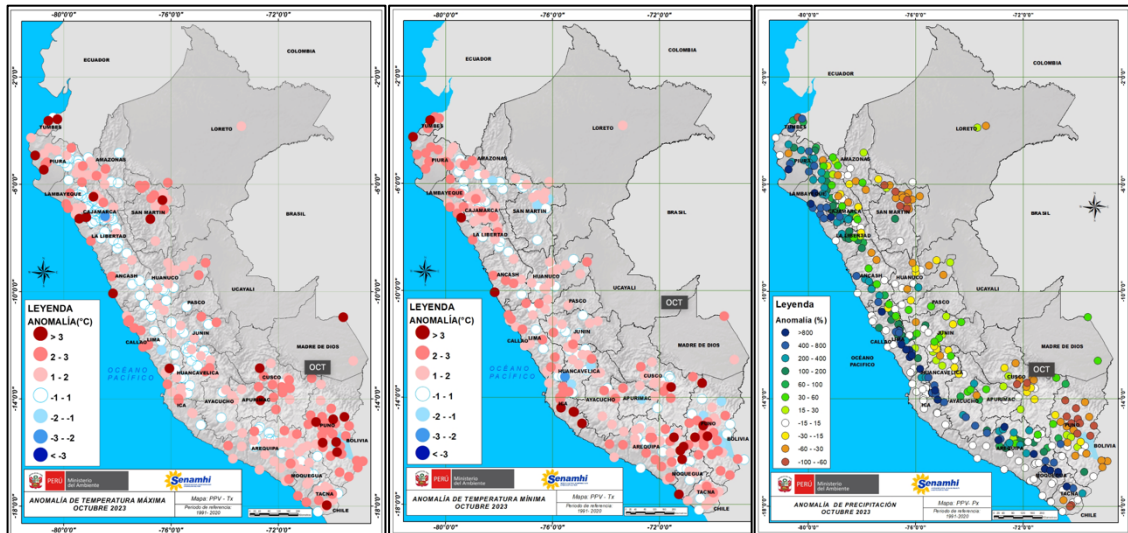


Ilustración 30: Anomalías de octubre 2023. De izquierda a derecha: Temperatura máxima. Temperatura mínima. Precipitación (50)

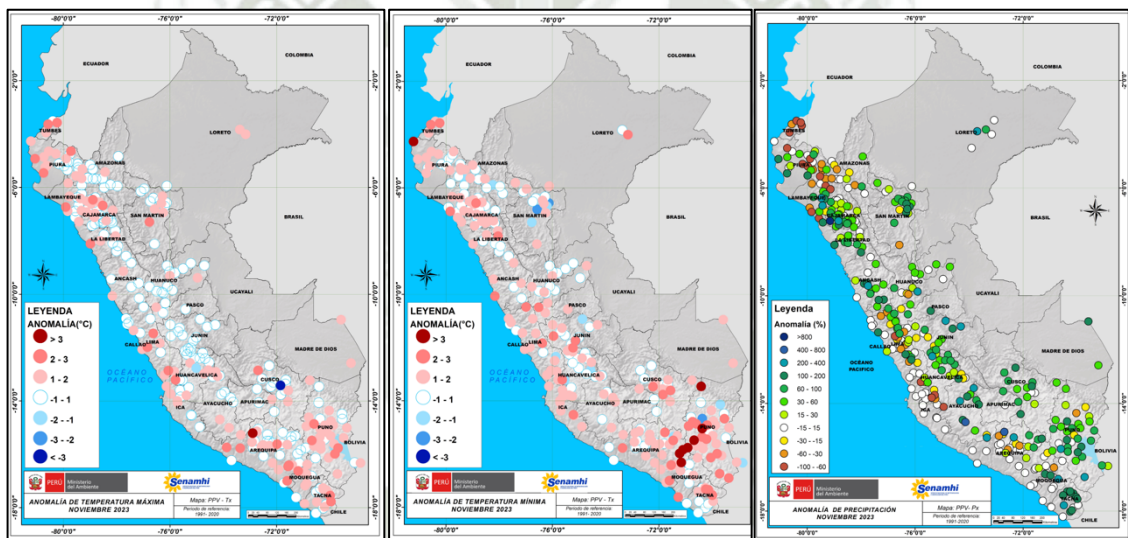


Ilustración 31: Anomalías de noviembre 2023. De izquierda a derecha: Temperatura máxima. Temperatura mínima. Precipitación (50)

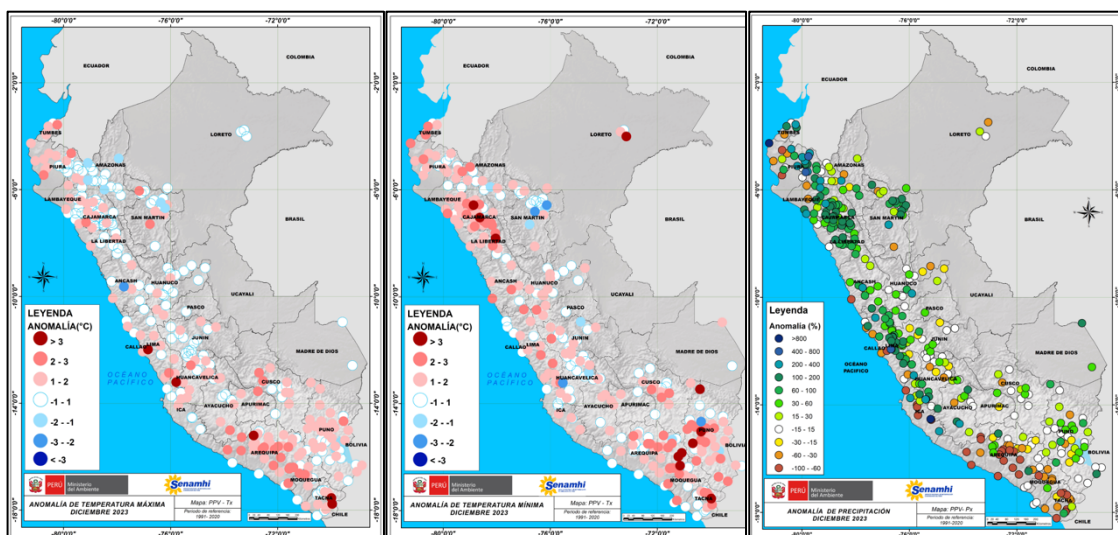


Ilustración 32: Anomalías de diciembre 2023. De izquierda a derecha: Temperatura máxima. Temperatura mínima. Precipitación (50)

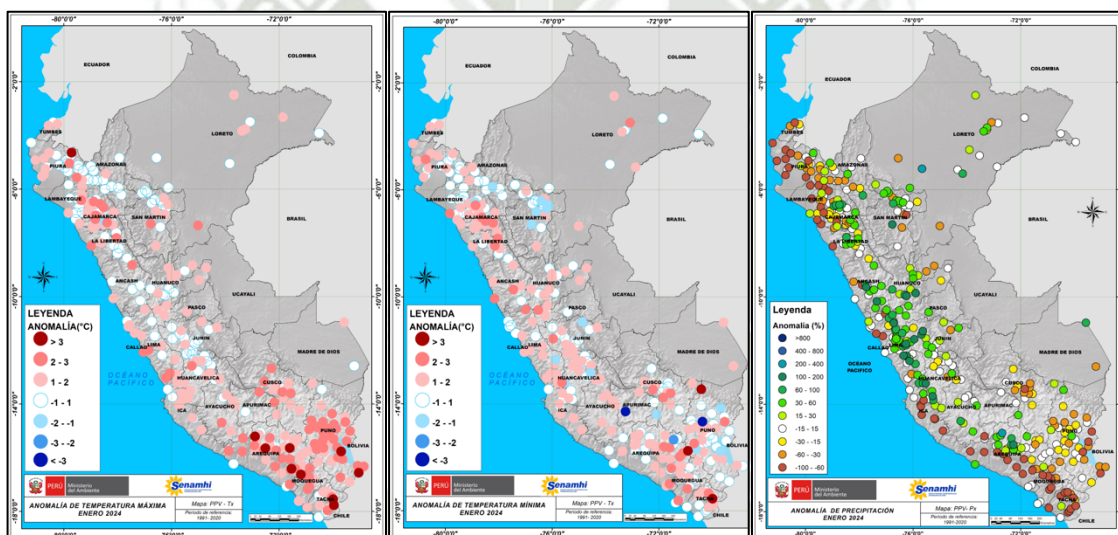


Ilustración 33: Anomalías de enero 2024. De izquierda a derecha: Temperatura máxima. Temperatura mínima. Precipitación (50)

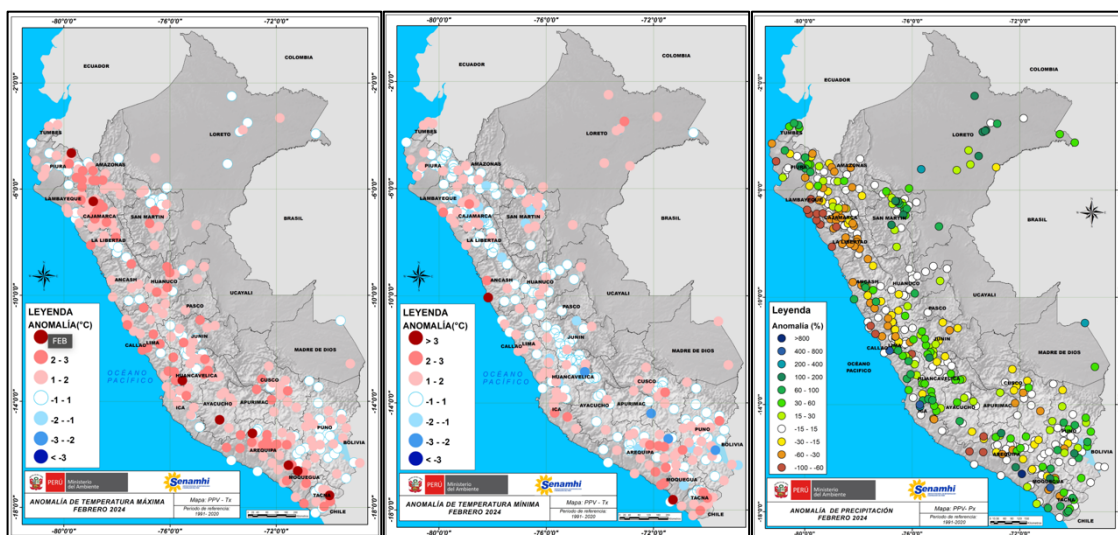


Ilustración 34: Anomalías de febrero 2024. De izquierda a derecha: Temperatura máxima. Temperatura mínima. Precipitación (50)

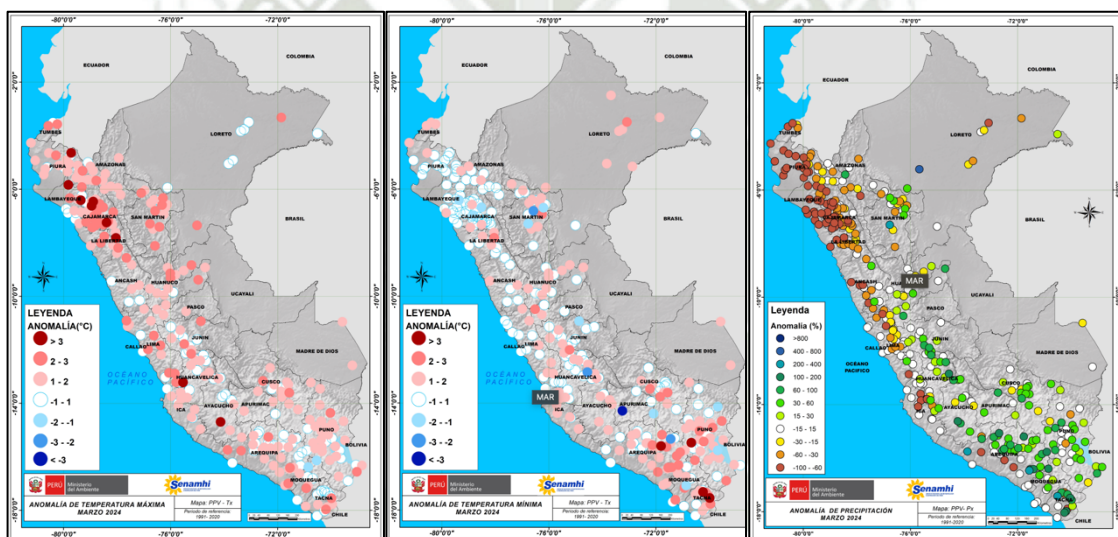


Ilustración 35: Anomalías de marzo 2024. De izquierda a derecha: Temperatura máxima. Temperatura mínima. Precipitación (50)

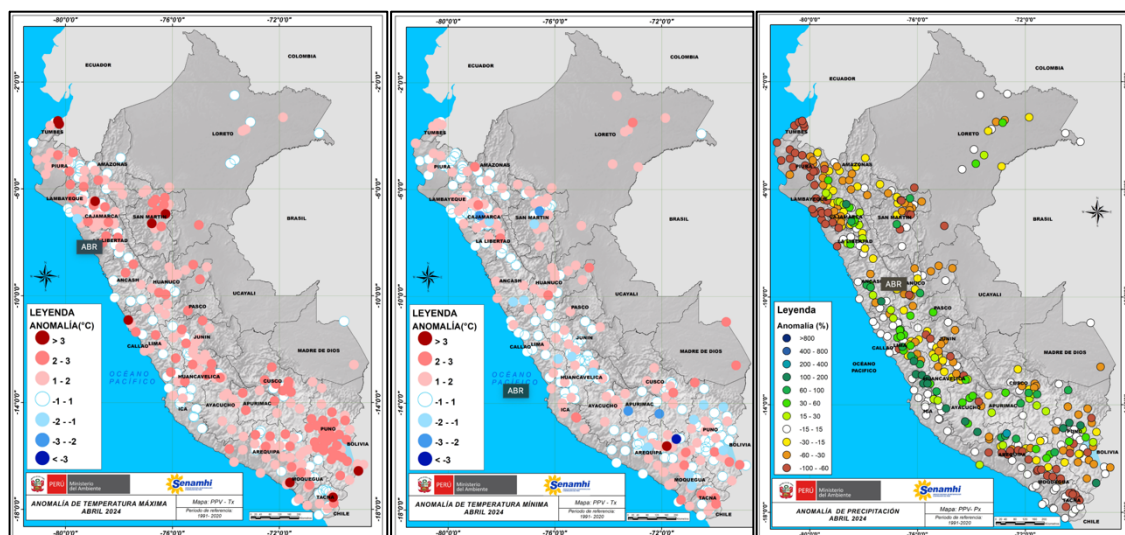


Ilustración 36: Anomalías de abril 2024. De izquierda a derecha: Temperatura máxima. Temperatura mínima. Precipitación (50).

8.7. Matriz de datos de muestreo de campo

N Muestra	DATOS DE ALPACAS					NÚMERO DE MUESTREO, FECHA Y HORA									
						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	ID Alpaca	Biotipo	Sexo	Edad	Color	20/07/23 10:00 -14:00	19/08/23 7:00 - 11:00	17/09/23 7:00 - 11:00	15/10/23 6:50-10:00	12/11/23 7:00-9:30	10/12/23 7:00-10:00	9/01/24 7:00-10:00	7/02/24 6:40-9:30	5/03/24 7:00-10:00	2/04/24 7:40-11:30
1	201044	Huacaya	Macho	3	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2	191081	Huacaya	Macho	4	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3	201020	Huacaya	Macho	3	Café	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
4	161081	Huacaya	Macho	7	Café	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
5	191024	Suri	Macho	4	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
6	201011	Huacaya	Macho	3	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
7	181077	Huacaya	Macho	5	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
8	201053	Huacaya	Macho	3	Café	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
9	201042	Suri	Macho	3	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
10	161099	Huacaya	Macho	7	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
11	181101	Huacaya	Macho	5	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
12	211003	Suri	Macho	2	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
13	191074	Huacaya	Macho	4	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
14	201031	Huacaya	Macho	3	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
15	181091	Huacaya	Macho	5	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
16	181002	Huacaya	Macho	5	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
17	201006	Huacaya	Macho	3	Blanco	x	x								
18	211045	Suri	Macho	2	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
19	211056	Huacaya	Macho	2	Café	x	x	x							
20	211093	Huacaya	Macho	2	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
21	211011	Huacaya	Macho	2	Café	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
22	211061	Huacaya	Macho	2	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
23	211041	Huacaya	Macho	2	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
24	211088	Huacaya	Macho	2	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
25	211030	Huacaya	Macho	2	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
26	211021	Huacaya	Macho	2	Café oscura	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
27	211026	Huacaya	Macho	2	Café oscuro	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
28	211003	Huacaya	Macho	2	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
29	211028	Huacaya	Macho	2	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
30	211052	Huacaya	Macho	2	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
31	211022	Huacaya	Macho	2	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
32	211038	Huacaya	Macho	2	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
33	211080	Huacaya	Macho	2	Café	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
34	211058	Huacaya	Macho	2	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
35	211083	Huacaya	Macho	2	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
36	211029	Huacaya	Macho	2	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
37	211071	Huacaya	Macho	2	Café	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
38	211006	Huacaya	Macho	2	Blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

8.8. Matriz de datos de resultados de PCR

N Muestra	ID Alpaca	Biotipo	Sexo	Edad	Color	meses											
						Jul	Ago	Set	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr		
1	201044	Huacaya	Macho	3	Blanco												
2	191081	Huacaya	Macho	4	Blanco												
3	201020	Huacaya	Macho	3	Café												
4	161081	Huacaya	Macho	7	Café												
5	191024	Suri	Macho	4	Blanco												
6	201011	Huacaya	Macho	3	Blanco												
7	181077	Huacaya	Macho	5	Blanco												
8	201053	Huacaya	Macho	3	Café												
9	201042	Suri	Macho	3	Blanco												
10	161099	Huacaya	Macho	7	Blanco												
11	181101	Huacaya	Macho	5	Blanco												
12	211003	Suri	Macho	2	Blanco												
13	191074	Huacaya	Macho	4	Blanco												
14	201031	Huacaya	Macho	3	Blanco												
15	181091	Huacaya	Macho	5	Blanco												
16	181002	Huacaya	Macho	5	Blanco												
17	201006	Huacaya	Macho	3	Blanco												
18	211045	Suri	Macho	2	Blanco												
19	211056	Huacaya	Macho	2	Café												
20	211093	Huacaya	Macho	2	Blanco												
21	211011	Huacaya	Macho	2	Café												
22	211061	Huacaya	Macho	2	Blanco												
23	211041	Huacaya	Macho	2	Blanco												
24	211088	Huacaya	Macho	2	Blanco												
25	211030	Huacaya	Macho	2	Blanco												
26	211021	Huacaya	Macho	2	Café oscuro												
27	211026	Huacaya	Macho	2	Café oscuro												
28	211003	Huacaya	Macho	2	Blanco												
29	211028	Huacaya	Macho	2	Blanco												
30	211052	Huacaya	Macho	2	Blanco												
31	211022	Huacaya	Macho	2	Blanco												
32	211038	Huacaya	Macho	2	Blanco												
33	211080	Huacaya	Macho	2	Café												
34	211058	Huacaya	Macho	2	Blanco												
35	211083	Huacaya	Macho	2	Blanco												
36	211029	Huacaya	Macho	2	Blanco												
37	211071	Huacaya	Macho	2	Café												
38	211006	Huacaya	Macho	2	Blanco												

*edad representada en años

Donde:

■ Negativo

■ Positivo

8.9. Fotografías



Fotografía 83: Visita de Dra. Mónica Jacobsen de Argentina. Julio 2023



Fotografía 84: Equipo del proyecto Sarcocystis en lugar de muestreo. Julio 2023



Fotografía 85: Equipo del proyecto Sarcocystis en laboratorio de biotecnología y reproducción animal del vicerrectorado de investigación. Julio 2023

8.10. Anexos estadísticos

8.10.1. Correlación lineal entre 2 variables

8.10.1.1. Correlación lineal entre temperatura máxima media y los animales positivos

Tabla 16: Datos necesarios para el cálculo de coeficiente de correlación de Pearson

	x	y	$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$	x^2	y^2
1	13	2	-0.8	1.1	-0.88	169	4
2	13	0	-0.8	-0.9	0.72	169	0
3	15	1	1.2	0.1	0.12	225	1
4	15	0	1.2	-0.9	-1.08	225	0
5	15	0	1.2	-0.9	-1.08	225	0
6	15	2	1.2	1.1	1.32	225	4

7	14	1	0.2	0.1	0.02	196	1
8	12	0	-1.8	-0.9	1.62	144	0
9	12	1	-1.8	0.1	-0.18	144	1
10	14	2	0.2	1.1	0.22	196	4
Σ	138	9	0	0	0.8	1918	15
\bar{x}	13.8	0.9					
S_x	1.17	0.83					

$$S_{xy} = 0.08 \quad r = 0.0826$$

8.10.1.2. Correlación lineal entre temperatura máxima media y el porcentaje de Animales positivos

Tabla 17: Datos necesarios para el cálculo de coeficiente de correlación de Pearson

	x	y	$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$	x^2	y^2
1	13	13.16	-0.8	8.324	-6.6592	169	173.1856
2	13	0	-0.8	-4.836	3.8688	169	0
3	15	2.7	1.2	-2.136	-2.5632	225	7.29
4	15	0	1.2	-4.836	-5.8032	225	0
5	15	0	1.2	-4.836	-5.8032	225	0
6	15	10	1.2	5.164	6.1968	225	100
7	14	5	0.2	0.164	0.0328	196	25
8	12	0	-1.8	-4.836	8.7048	144	0
9	12	5	-1.8	0.164	-0.2952	144	25

10	14	12.5	0.2	7.664	1.5328	196	156.25
Σ	138	48.36	0	0	-0.788	1918	486.7256
\bar{x}	13.8	4.836					
Sx	1.17	5.03					

$$S_{xy} = -0.0788 \quad r = -0.0134$$

8.10.1.3. Correlación lineal entre precipitaciones pluviales y Animales positivos

Tabla 18: Datos necesarios para el cálculo de coeficiente de correlación de Pearson

	x	y	$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$	x^2	y^2
1	0	2	-43.5	1.1	-47.85	0	4
2	0	0	-43.5	-0.9	39.15	0	0
3	0	1	-43.5	0.1	-4.35	0	1
4	18	0	-25.5	-0.9	22.95	324	0
5	15	0	-28.5	-0.9	25.65	225	0
6	56	2	12.5	1.1	13.75	3136	4
7	102	1	58.5	0.1	5.85	10404	1
8	110	0	66.5	-0.9	-59.85	12100	0
9	104	1	60.5	0.1	6.05	10816	1
10	30	2	-13.5	1.1	-14.85	900	4
Σ	435	9	0	0	-13.5	37905	15
\bar{x}	43.5	0.9					
Sx	43.56	0.83					

$$S_{xy} = -1.35 \quad r = -0.0373$$

8.10.1.4. Correlación lineal entre precipitaciones pluviales y porcentaje de Animales positivos

Tabla 19: Datos necesarios para el cálculo de coeficiente de correlación de Pearson

	x	y	$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$	x^2	y^2
1	0	13.16	-43.5	8.324	-362.094	0	173.1856
2	0	0	-43.5	-4.836	210.366	0	0
3	0	2.7	-43.5	-2.136	92.916	0	7.29
4	18	0	-25.5	-4.836	123.318	324	0
5	15	0	-28.5	-4.836	137.826	225	0
6	56	10	12.5	5.164	64.55	3136	100
7	102	5	58.5	0.164	9.594	10404	25
8	110	0	66.5	-4.836	-321.594	12100	0
9	104	5	60.5	0.164	9.922	10816	25
10	30	12.5	-13.5	7.664	-103.464	900	156.25
Σ	435	48.36	0	0	-138.66	37905	486.7256
\bar{x}	43.5	4.836					
S	43.56	5.03					
x							

$$S_{xy} = -13.87 \quad r = -0.0633$$

8.10.2. Frecuencias observadas por mes

Tabla 20: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de julio 2023

	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA RELATIVA	PORCENTAJE
POSITIVO	5	0.13	13.16%
NEGATIVO	33	0.87	86.84%
TOTAL	38	1.00	100.00%

Tabla 21: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de agosto 2023

	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA RELATIVA	PORCENTAJE
POSITIVO	0	0.00	0.00%
NEGATIVO	38	1.00	100.00%
TOTAL	38	1.00	100.00%

Tabla 22: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de septiembre 2023

	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA RELATIVA	PORCENTAJE
POSITIVO	1	0.03	2.70%
NEGATIVO	36	0.97	97.30%

TOTAL	37	1.00	100.00%
--------------	----	------	---------

Tabla 23: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de octubre 2023

	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA RELATIVA	PORCENTAJE
POSITIVO	0	0.00	0.00%
NEGATIVO	36	1.00	100.00%
TOTAL	36	1.00	100.00%

Tabla 24: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de noviembre 2023

	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA RELATIVA	PORCENTAJE
POSITIVO	0	0.00	0.00%
NEGATIVO	36	1.00	100.00%
TOTAL	36	1.00	100.00%

Tabla 25: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de diciembre 2023

	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA RELATIVA	PORCENTAJE
POSITIVO	2	0.10	10.00%

NEGATIVO	18	0.90	90.00%
TOTAL	20	1.00	100.00%

Tabla 26: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de enero 2024

	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA RELATIVA	PORCENTAJE
POSITIVO	1	0.05	5.00%
NEGATIVO	19	0.95	95.00%
TOTAL	20	1.00	100.00%

Tabla 27: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de febrero 2024

	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA RELATIVA	PORCENTAJE
POSITIVO	0	0.00	0.00%
NEGATIVO	20	1.00	100.00%
TOTAL	20	1.00	100.00%

Tabla 28: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de marzo 2024

	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA RELATIVA	PORCENTAJE
POSITIVO	1	0.05	5.00%
NEGATIVO	19	0.95	95.00%
TOTAL	20	1.00	100.00%

Tabla 29: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual del mes de abril 2024

	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA RELATIVA	PORCENTAJE
POSITIVO	2	0.13	12.50%
NEGATIVO	14	0.88	87.50%
TOTAL	16	1.00	100.00%

Tabla 30: Tabla de frecuencia observada, relativa y porcentual total del periodo julio 2023 a abril 2024

	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA RELATIVA	PORCENTAJE
POSITIVO	12	0.04	4.27%
NEGATIVO	269	0.96	95.73%
TOTAL	281	1.00	100.00%