



# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

## ESCUELA DE POSGRADO

### MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL



#### TESIS

### DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE ESPOROQUISTES DE *Sarcocystis* spp EN PASTIZALES DE CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

PRESENTADA POR:

FELICIANA VILCA DE DÍAZ

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL

CON MENCIÓN EN SALUD ANIMAL

PUNO, PERÚ

2020

Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

**DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA  
DETECCIÓN DE ESPOROQUISTES DE *Sar  
cocystis spp* EN PASTIZALES DE CAMÉL**

AUTOR

**Feliciano Vilca de Díaz**

RECuento DE PALABRAS

**17609 Words**

RECuento DE CARACTERES

**94716 Characters**

RECuento DE PÁGINAS

**81 Pages**

TAMAÑO DEL ARCHIVO

**6.6MB**

FECHA DE ENTREGA

**Apr 19, 2023 3:07 PM EST**

FECHA DEL INFORME

**Apr 19, 2023 3:08 PM EST**

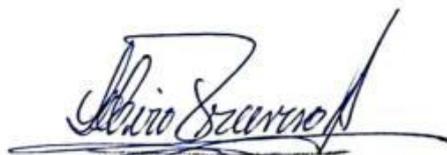
● **12% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

- 11% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 5% Base de datos de trabajos entregados
- 3% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● **Excluir del Reporte de Similitud**

- Material bibliográfico
- Material citado
- Bloques de texto excluidos manualmente
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 8 palabras)



**CIRILO TRAVERSO ARGUEDAS**  
MVZ. - Esp. Epiz. - MSc. - Dr.  
CMVP REG. N° 2229



**Dr. Pedro Ubaldo Coila Anasco**  
CMVP-2842

Resumen



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**  
**ESCUELA DE POSGRADO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**



**TESIS**

**DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE  
ESPOROQUISTES DE *Sarcocystis* spp EN PASTIZALES DE CAMÉLIDOS  
SUDAMERICANOS**

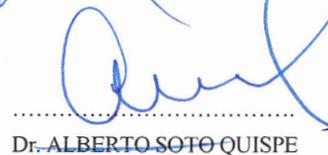
**PRESENTADA POR:**  
**FELICIANA VILCA DE DÍAZ**  
**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:**  
**MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL**  
**CON MENCIÓN EN SALUD ANIMAL**

APROBADA POR EL JURADO SIGUIENTE:

PRESIDENTE

  
.....  
Dr. MÁXIMO MELO ANCCASI

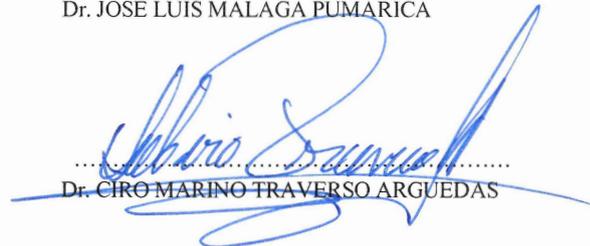
PRIMER MIEMBRO

  
.....  
Dr. ALBERTO SOTO QUISPE

SEGUNDO MIEMBRO

.....  
Dr. JOSE LUIS MALAGA PUMARICA

ASESOR DE TESIS

  
.....  
Dr. CIRO MARINO TRAVERSO ARGUEDAS

Puno, 28 de diciembre del 2020

**TEMA:** Métodos para la Detección de Sporocistos de *Sarcocystis*  
**LÍNEA:** Camélidos Sudamericanos  
**ÁREA:** Salud Animal



## DEDICATORIA

A Dios, por guiar cada paso que he dado en mi vida, iluminar mi camino y darme salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A la memoria de mis padres: JUAN MANUEL Y JOSEFINA ASUNCIÓN, Que Dios los tenga en su Gloria y que guían mi camino con amor. Gracias por todo el infinito amor que me brindaron en vida.

A mi esposo, Nicolás y mis hijos, Alexei, Daniela y Patricia quienes son el pilar de mi vida, por su apoyo moral y ser la motivación de mi vida.

A mis nietos, Josue, Diego y Alexei por su gran amor y ser mi motivación.



## AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros agradecimientos a mis maestros de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, de la Unidad de Postgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, de la maestría en Salud Animal; por sus enseñanzas, orientación y formación profesional.

Al Dr. Bernardo Roque, por haberme motivado a acceder la graduación externa, en mi alma máter Universidad Nacional del Altiplano – Puno.

A mi asesor Dr. Ciro Traverso, por el apoyo brindado en la realización de mi trabajo de investigación.

Al Msc. Halley Rodríguez por el apoyo brindado en la parte estadística de la investigación realizada.

A mis colegas parasitólogos: Dr. Marcelo Rojas, Dr. Guillermo Leguía, Dr. Manuel Tantalean, Dra. Amanda Chávez, Dr. Máximo Melo, Dra. Nubia Catacora, Dra. Eva Casas, Dr. Uberto Olarte, Dr. Celso Zapata; por sus conocimientos que motivan realizar investigaciones en el área de Parasitología Veterinaria.

A la memoria de mis maestros parasitólogos: Dr. Elías Hurtado y Dr. Clemente Sánchez, que Dios los tenga en su gloria.



## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1

### CAPÍTULO I

#### REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Marco Teórico	3
1.2. Antecedentes	8

### CAPÍTULO II

#### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1. Identificación del problema	14
2.2. Enunciados del problema	15
2.3. Justificación	15
2.4. Objetivos	16
2.4.1. Objetivo General	16
2.4.2. Objetivos Específicos	16
2.5. Hipótesis	17

iii



2.5.1. Hipótesis General	17
2.5.2. Hipótesis Específicas	17

### **CAPÍTULO III**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1. Lugar de estudio	18
3.2. Población	19
3.3. Muestra	20
3.4. Métodos de Investigación	20
3.4.1. Para la obtención de esporoquistes de <i>Sarcocystis</i> spp	20
3.4.2. Cuantificación de esporoquistes mediante el Método Modificado de Mc Master	22
3.4.3. Procedimiento de la evaluación de muestras de pastizal natural	23
3.4.4. Procedimiento para la recuperación de esporoquistes	24
3.4.5. Diseño experimental u observacional	25

### **CAPÍTULO IV**

#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1. Porcentajes de recuperación de esporoquistes en pastizales de zona húmeda y seca contaminados experimentalmente, en función al tiempo de almacenamiento de la muestra	27
4.2. Porcentajes de recuperación de esporoquistes en pastizales de zonas húmeda y seca, contaminados experimentalmente según la solución de dispersión	29

CONCLUSIONES	39
--------------	----

RECOMENDACIONES	40
-----------------	----

BIBLIOGRAFÍA	41
--------------	----





## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
1. Distribución de material muestral para la realización de la investigación.	20
2. Porcentaje de recuperación de esporoquistes de sarcocystis spp en pastizales en función al tiempo de almacenamiento de las muestras.	27
3. Porcentaje de recuperación de esporoquistes de Sarcocystis spp en función a la solución de dispersión y flotación	30
4. Porcentajes de recuperación de esporoquistes de Sarcocystis spp en pastizal de zona húmeda en función a las soluciones de dispersión y días de almacenamiento de las muestras.	31
5. Porcentaje de recuperación de esporoquistes de Sarcocystis spp en pastizales de zona seca en función a las soluciones de dispersión y días de almacenamiento de la muestra.	32

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
1. Figura porcentaje de recuperación de esporoquistes de Sarcocystis en pastizales en función al tiempo de almacenamiento de la muestra.	47
2. Figura porcentaje de recuperación de esporoquistes de Sarcocystis spp en función a la solución de dispersión y flotación zona húmeda	47
3. Figura porcentaje de recuperación de esporoquistes de Sarcocystis spp en función a la solución de dispersión y flotación zona seca.	48
4. Porcentaje de recuperación de esporoquistes de sarcocystis en pastizales de zona húmeda y seca en función al tiempo de almacenamiento de las muestras y soluciones utilizadas.	49
5. Porcentaje de recuperación de esporoquistes de zona seca en función al tiempo de almacenamiento de la muestra y soluciones utilizadas	54
6. Porcentaje de recuperación de esporoquistes de zona húmeda en función al tiempo de almacenamiento de la muestra y soluciones utilizadas.	55
7. Porcentaje de recuperación de esporoquistes de pastizales en función a la solución de flotación y dispersión.	56
8. Porcentaje de recuperación de esporoquistes en pastizales en función a la solución de dispersión y tiempo de conservación de muestras, cuando se utiliza el método de flotación con sacarosa.	57
9. Porcentaje de recuperación de esporoquistes en pastizales en función a la solución de dispersión y tiempo de conservación de muestras, cuando se utiliza el método de flotación con sulfato de zinc.	58
10. Medidas de resumen, porcentaje de recuperación de esporoquistes según zona.	58
11. Medidas de resumen, porcentaje de recuperación de esporoquistes según solución	59
12. Medidas de resumen, porcentaje de recuperación de esporoquistes según tiempo	59
13. Efecto de la zona sobre el porcentaje de recuperación de esporoquistes	59



<b>14.</b> Efecto de la solución utilizada sobre el porcentaje de recuperación de esporoquistes.	60
<b>15.</b> Efecto del tiempo en días sobre el porcentaje de recuperación de esporoquistes.	60
<b>16.</b> Efecto de la zona y solución utilizada sobre el porcentaje de recuperación de esporoquistes	61
<b>17.</b> Efecto de la zona y tiempo sobre el porcentaje de recuperación de esporoquistes	61
<b>18.</b> Corazón de alpaca para evaluación microscópica.	62
<b>19.</b> Sarcocystis lamacanis en tejido cardíaco de alpaca	62
<b>20.</b> Bradizoitos de Sarcocystis lamacanis	63
<b>21.</b> Esporoquistes de Sarcocystis lamacanis en material fecal de cachorro infectado.	64
<b>22.</b> Tejido muscular estriado de alpaca con quistes macroscópicos (Sarcocystis aucheniae)	64
<b>23.</b> Infección de cachorro con quistes macroscópicos de Sarcocystis	64
<b>24.</b> Infección de cachorro con macroquistes de Sarcocystis	65
<b>25.</b> Cuantificación de esporoquistes por el método de Mac Master	65
<b>26.</b> Reactivos utilizados para métodos de diagnóstico.	66
<b>27.</b> Muestras en proceso de sedimentación.	66
<b>28.</b> Flotación de muestras con solución de sacarosa	67
<b>29.</b> Flotación de muestras con solución de sacarosa y sulfato de zinc	67
<b>30.</b> Ooquistes de Sarcocystis spp de muestras de pastizal con método de flotación (Sacarosa y Tween 80)	68
<b>31.</b> Esporoquistes de Sarcocystis spp de pastizal con método de flotación (Sacarosa y Tween 80)	68

## RESUMEN

Con el objetivo de desarrollar un método para detectar esporoquistes de *Sarcocystis spp* en pastizales, se obtuvo un pool de esporoquistes mediante la infección experimental de cuatro cachorros con carne y corazón de alpacas con macro y microquistes; muestras de suelo y pastizal (10 g) de zonas seca y húmeda fueron contaminadas con suspensiones de  $10^3$  esporoquistes de *Sarcocystis* siendo procesadas mediante soluciones dispersantes: agua destilada y Tween 80 y soluciones de flotación: Sacarosa, y  $ZnSO_4$ , se obtuvieron 96 muestras del Centro Experimental La Raya y fueron evaluadas en el Laboratorio de Parasitología Veterinaria, los datos fueron analizados en un diseño bloque completo al azar bajo un arreglo factorial  $2 \times 4$  y la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey  $\alpha=0.05$ . Los resultados muestran los porcentajes de recuperación de esporoquistes en función al tiempo de almacenamiento por 1, 4 y 7 días de 23.50%, 22.34% y 21.61% en pastizales de zona húmeda y de 21.31%, 20.30% y 19.19% en pastizales de zona seca; y según soluciones de dispersión y flotación utilizados en muestras de zona húmeda y seca fueron de 26.56% y 22.68% con agua destilada y sacarosa, 34.02% y 30.13% con Tween 80 y Sacarosa, 12.48% y 12.61% con agua destilada y Sulfato de Zinc, 16.88% y 12.65% con Tween 80 y Sulfato de Zinc. Se concluye que el método de flotación con sacarosa utilizando como dispersante Tween 80 fue la mejor opción para la detección y cuantificación de esporoquistes de *Sarcocystis* en suelo y pastizales naturales.

**Palabras clave:** camélido sudamericano, contaminación, esporoquistes de *Sarcocystis*, método, pastizal.



## ABSTRACT

In order to develop a method to detect *Sarcocystis* spp sporocysts in grasslands, a pool of sporocysts was obtained by experimental infection of four puppies with alpaca meat and heart with macro and microcysts; Soil and grassland samples (10 g) from dry and wet areas were contaminated with suspensions of  $10^3$  *Sarcocystis* sporocysts, being processed using dispersing solutions: distilled water and Tween 80 and flotation solutions: Sucrose, and  $ZnSO_4$ , 96 samples were obtained from the Center Experimental La Raya and were evaluated in the Veterinary Parasitology Laboratory, the data were analyzed in a randomized complete block design under a 2x4 factorial arrangement and the comparison of means was performed using the Tukey test  $\alpha=0.05$ . The results show the recovery percentages of sporocysts depending on the storage time for 1, 4 and 7 days of 23.50%, 22.34% and 21.61% in grasslands of the humid zone and of 21.31%, 20.30% and 19.19% in grasslands of the zone dry; and according to dispersion and flotation solutions used in samples from the wet and dry zone, they were 26.56% and 22.68% with distilled water and sucrose, 34.02% and 30.13% with Tween 80 and Sucrose, 12.48% and 12.61% with distilled water and Sulfate of Zinc, 16.88% and 12.65% with Tween 80 and Zinc Sulfate. It is concluded that the sucrose flotation method using Tween 80 as dispersant was the best option for the detection and quantification of *Sarcocystis* sporocysts in soil and natural grasslands.

**Keywords:** South American camelid, pollution, *Sarcocystis* sporocysts, method, grassland.

## INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos se encuentran en las zonas más altas, agrestes y frías de las zonas alto andinas de Sudamérica. Nuestro país, alberga al 87% de la población mundial (4' 042,468), seguido de Bolivia con el 9.5%, el Perú cuenta con 3'685,249 alpacas, 746,269 llamas, 147,000 vicuñas y 3,810 guanacos; la población de alpacas se encuentra distribuida en 17 departamentos, siendo Puno y Cusco los que concentran la mayor cantidad con 1'459,903 y 545,454 animales respectivamente (INEI, 2014).

Argentina tiene la enorme mayoría 86.8 % de guanacos que existen en el mundo, los camélidos sudamericanos tienen un enorme valor económico, social y cultural para una importante población (Germana et al., 2016).

Los camélidos sudamericanos (CSA) constituyen la mayor riqueza pecuaria y genética de las poblaciones andinas de Sudamérica, las especies domésticas alpacas y llamas son fuente de fibra, carne y de subproductos como pieles y cuero que tienen múltiples usos industriales y artesanales, y que son indispensables para la subsistencia de un amplio sector de poblaciones (Fernández, 2005).

La crianza de alpacas y llamas se ve limitada por una serie de factores fundamentalmente sanitarios, dentro de los cuales la Sarcocistiosis tiene un impacto negativo en la producción de estas especies. Esta enfermedad parasitaria es ocasionada por protozoarios Apicomplexos del Género *Sarcocystis*, la característica de este género es formar quistes tabicados macroscópicos o microscópicos en el tejido muscular del hospedador intermediario (Cordero et al., 1999).

En camélidos sudamericanos se han reportado tres especies: *Sarcocystis aucheniae* que se caracteriza por formar quistes macroscópicos, *Sarcocystis lamacanis* quistes microscópicos en alpacas, llamas y vicuñas; *Sarcocystis tilopodi* en guanacos (Leguía y Casas, 1999), y precisamente las formas macroscópicas dan una mala presentación visual a las carnes, depreciándolas: confundiéndolas con otras enfermedades zoonóticas ocasionando su decomiso en los camales de beneficio, limitando su consumo y comercialización, pese a ser una carne con alto valor nutritivo, bajo nivel de grasas y colesterol.

Dentro de las pérdidas económicas que ocasiona esta enfermedad se menciona que en el camal de Santa Rosa (Melgar-Puno) durante los años de 1973-1974, de 5,873 alpacas

beneficiadas, se decomisaron 529 carcasas por la presencia de *Sarcocystis aucheniae*, siendo ésta, la segunda causa de decomiso (Alva et al., 1980). En otro estudio realizado en un camal regional del altiplano de Chile, durante los años 1985-1996 se decomisó el 3% de carcasas (seriamente afectadas) por presencia de quistes macroscópicos (Rojas et al., 1993). Las pérdidas anuales en el Perú se estiman en \$ 300,000 dólares americanos por año (Rojas, 1990).

Se han referido prevalencias del 70 al 100% de micro y macro quistes en las cuatro especies de camélidos sudamericanos en todas las regiones del país (Mostajo, 1983; Fernández, 1991; Castro et al., 2004; Gutiérrez et al., 2015; Leguía y Santiago, 2018), resultados que demuestran los altos niveles de contaminación de los pastizales de camélidos sudamericanos con el parásito, debido a la estrecha convivencia de alpacas y llamas con los perros y la alimentación de estos animales con carne infectada con *Sarcocystis*, a esto se adiciona la excesiva población de perros en las zonas ganaderas y la acción predatora de zorros; los cuales como hospedadores definitivos al no desarrollar inmunidad son re infectados continuamente, eliminando millones de esporoquistes que son inmediatamente infectivos y por un largo periodo de tiempo (Leguía y Casas, 1999).

El perro elimina junto con el material fecal hasta un máximo de 560,000 esporoquistes por día de *Sarcocystis aucheniae* a los 15 días post infección; y 2'000,000 de esporoquistes por día de *Sarcocystis lamacanis* a los 22 días post infección, la contaminación de la pastura es potencialmente severo como resultado de un perro infectado (White, 1998).

Los niveles de contaminación de las pasturas con esporoquistes de *Sarcocystis* spp determinado por la carga de esporoquistes, la sobrevivencia, viabilidad, dispersión en el suelo y agua, y otros factores son desconocidos, debido a la dificultad de su detección en muestras medio ambientales, y a la falta de métodos apropiados, por esta razón este estudio tiene importancia para el entendimiento de la dinámica de infección en camélidos sudamericanos, siendo su control un reto para los programas de salud y en el Perú este problema se complica por los bajos niveles educativos de las poblaciones en riesgo en las zonas rurales, y precisamente en esta investigación nuestro objetivo fue evaluar métodos de dispersión y concentración para la detección y recuento de esporoquistes de *Sarcocystis* en pastizales experimentalmente contaminados de estas especies.

## CAPÍTULO I

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 1.1. Marco Teórico.

Sarcocistiosis: conjunto de enfermedades que afectan a numerosos hospedadores intermediarios por diferentes especies del género *Sarcocystis*, la característica del género es la de formar quistes musculares tabicados que delimitan cavidades internas con numerosos zoítos. El nombre deriva de sarkós= carne, sporidium= espora o semilla pequeña (Cordero del Campillo et al., 1999).

El género *Sarcocystis* está compuesto por más de 130 especies, de los cuales menos de la mitad se conocen sus ciclos de vida, estas especies se diferencian en el grado de patogenicidad, estructura y en el ciclo de vida, la ultraestructura de la pared del *Sarcocystis* es el mejor criterio para la diferenciación de especies en el género *Sarcocystis spp* (Dubey et al., 1989).

Las especies que se conocen han demostrado ser altamente específicas para el hospedero intermediario, pero no para el hospedero definitivo (Rojas, 1990; Radostits et al., 1992).

La parasitosis constituye la principal causa de decomiso de las carnes de camélidos, al igual que en otras especies; en el Perú se decomisan el 9% de las canales por causa de *Sarcocystis*, estas cifras pueden ser más altas en algunas poblaciones de camélidos (Alva et al., 1980).

Una limitante importante para el éxito de la investigación en ecología de parásitos en el suelo, ha sido la falta de sensibilidad de métodos cuantitativos, existen métodos moleculares para detectar ADN de parásitos en el suelo, pero son caros, laboriosos y ofrecen solo un método indirecto de cuantificar la presencia de parásitos (Durant et al.,

2011; Lélú et al., 2011).

Los ooquistes pueden ser difíciles de detectar y son más frágiles que los huevos de parásitos más grandes, muchos de los métodos de flotación existentes son complicados y el tiempo demandado requiere de materiales y reactivos especiales, y tiene un éxito moderado en la cuantificación de ooquistes en el suelo (Kato y Bowman, 2002; Lélú et al., 2011).

Otros aspectos de esta enfermedad en alpacas y llamas aún requieren más trabajo para mejorar nuestra comprensión sobre el impacto de la sarcocistiosis en la salud animal en términos de productividad, aumento de peso, eficiencia reproductiva, producción de fibra, inmunidad, funcionamiento músculo esquelético, susceptibilidad a otras enfermedades y pérdidas económicas (Saeed et al., 2018).

La sobrevivencia en el medio de los esporoquistes de *Sarcocystis* es muy grande, ya que en condiciones atmosféricas propias de climas templados pueden permanecer viables alrededor de un año; sometidos a temperaturas de 4°C mantienen su capacidad infectante durante 2 años, por debajo de 0 °C son capaces de sobrevivir 2 meses, incluso son resistentes en condiciones de sequedad, donde mantienen su viabilidad durante 3 meses, esto debido a que lo único que tienen que hacer en el medio es sobrevivir, no evolucionar. Además, al carecer de cuerpo de stieda, son resistentes a la acción de agentes químicos del medio (Cordero del Campillo et al., 1999).

En un estudio de prevalencia de *Sarcocystis* en alpacas (mayores de 2 años) beneficiadas en el camal municipal de Santa Rosa-Melgar, mediante la inspección directa y observación microscópica se encontró que el 100% de muestras de esófago y corazón resultaron ser positivos a *Sarcocystis* spp (Mostajo, 1983).

El perro elimina con el excremento de medio a un millón de esporoquistes por día, dependiendo de la especie de *Sarcocystis* y la evolución de la infección en el perro, la eliminación continúa por un periodo de 4 a 8 semanas, los esporoquistes pueden sobrevivir en la pastura durante 6 meses o más y dado al periodo patente prolongado y el número grande de esporoquistes excretados por día, la contaminación de la pastura es potencialmente severo como resultado de un perro infectado (White, 1998).

Los esporoquistes de *Sarcocystis* pueden permanecer viables por mucho tiempo, la mayoría no son ingeridos por las alpacas, en la estación seca, la intensa radiación solar,

el clima seco y quizás las heladas nocturnas de la puna, matan a los esporoquistes; en contraste durante la estación lluviosa (diciembre a marzo), el clima es más caluroso, húmedo y a menudo nublado, ayudando la supervivencia de los esporoquistes, simultáneamente, el crecimiento del césped es abundante, favoreciendo el consumo de esporoquistes por alpacas (Leguía y Casas, 1999).

El perro como hospedador definitivo elimina junto con el material fecal hasta un máximo de 560,000 esporoquistes por día de *Sarcocystis aucheniae* a los 15 días post infección; y 2'000,000 de esporoquistes por día de *Sarcocystis lamacanis* a los 22 días post infección. Ambas especies, tienen una sobrevivencia de 4 – 5 meses a más en las pasturas (White, 1998).

Los perros infectados con *Sarcocystis* no desarrollan inmunidad, debido a la ausencia de reproducción asexual, siendo re infectados continuamente, eliminando millones de esporoquistes por periodos prolongados. Existen grandes niveles de contaminación del medio ambiente con este parásito, ya que los perros después de la ingestión de microquistes y macroquistes eliminan millones de esporoquistes que son inmediatamente infectivos y por un largo periodo de tiempo (Leguía y Casas, 1999).

En alpacas beneficiadas en el camal municipal de Nuñoa - Melgar, para determinar la prevalencia de Sarcocistiosis microscópica en corazón de 939 animales entre jóvenes y adultos, se reportó una prevalencia de 80.62 %, según edad las alpacas adultas presentaron mayor prevalencia 54.21 % con relación a los jóvenes 26.41% (Gutierrez et al., 2015).

El consumo de carne de alpaca está aumentando en los países desarrollados, ya que posee menos grasa y colesterol que la carne de vacuno, oveja y cabra lo que potencialmente lo convierte en un producto muy valioso para los mercados locales e internacionales (Mamani y Gallo, 2014).

Los surfactantes como el Tween-80 son agentes químicos "activos en superficie" (su nombre es un acrónimo inglés: "surfactant", de *surface*, superficie; *active*, activo, y *-ant*, -ante); cuando los surfactantes se disuelven en agua se concentran en interfases, como agua-aire o agua-aceite, y ahí ejercen diversas funciones: humedecen, emulsifican dispersan y solubilizan; favorecen o impiden la formación de espuma; son antiestáticos y lubricantes; también dan brillo y afectan a ciertas propiedades geológicas. Los surfactantes reducen la tensión superficial del agua, lo que permite que ésta se pueda

extender y humedecer distintos tipos de superficies, algo muy útil en el proceso de lavado (recuperado de: <http://biomodel.uah.es/model2/lip/surfactantes.htm>).

El tween 80 o también conocido como polisorbato 80 es un líquido de color amarillo y aceitoso, tensoactivo no iónico derivado de ésteres de sorbitan es soluble y dispersable en agua. Ésta sustancia se ha utilizado durante mucho tiempo en diferentes industrias, en especial en productos bioquímicos como dispersante de productos medicinales. Son detergentes utilizados en los laboratorios biomédicos, son surfactantes, el Tween-20 y el Tween-80 son surfactantes polisorbatos con un ácido graso y una cadena larga de polioxietileno tienen una CMS muy baja y generalmente son surfactantes suaves, el Tween 80 tiene ácido oleico, se utilizan de rutina como agentes de lavado en inmunoblot y en ensayos de ELISA (Lavome, 2018).

Pastizal es la cantidad de follaje removido sin causar daño en las raíces y subsecuentemente, a brotes de plantas deseables (Sosebee, 1982). Pastizal es la ciencia y el arte de la planificación y dirección del uso múltiple de la pradera para obtener una máxima producción animal económica sostenible, compatible con la conservación y/o mejoramiento en los recursos naturales relacionados (Huss et al., 1974) citado por (Farfán y Farfán, 2012).

Los bofedales o vegetación de turbera presentan una composición florística rica en juncáceas y gramíneas en la que las especies dominantes pertenecen a los géneros *Distichia*, *Carex*, *Calamagrostis*, *Gentiana*, *Werneria*, *Arenaria*, *Alchemilla*, *Lucilia*, *Lileaeopsis*, *Diplophylla*, *Plantago* y otros, estas asociaciones son de buena palatabilidad, y alto valor nutricional y mantienen vegetación verde durante todo el año, lo que permite que sostengan la producción de camélidos (Ruíz y Tapia, 1987) citado en (Zorogastúa et al., 2012).

En el análisis de caracterización del suelo en bofedales de Puna húmeda y seca, el distrito de Santa Rosa- Melgar presenta un 46% de arena, 9% de arcilla y 45% de limo, con un pH de 4.99 y considerado con una textura de franco (INIA, 2007).

El perro es el potencial huésped definitivo de *Sarcocystis aucheniae*, la especie formadora de quistes macroscópicos. Sin embargo, la carga de esporoquistes y los períodos prepatentes en los perros podrían variar dependiendo del tamaño del macroquiste que ingieren. Por ejemplo, los cachorros que recibieron macroquistes de tamaño más pequeño

(1–3 mm) eliminaron significativamente más esporoquistes con un período prepatente más corto (12 días), en comparación con aquellos (período de prepatencia de 16 días) que recibieron macroquistes más grandes (> 5 mm) (Cornejo et al., 2007).

La carne de alpaca se está volviendo popular en muchas partes del mundo debido a su menor contenido de colesterol que otras carnes rojas, por lo que tiene el potencial de ser un producto valioso para los mercados locales e internacionales. Sin embargo, la carne de camélidos sudamericanos se puede degradar y/o incluso condenar debido a la presencia de quistes macroscópicos en los músculos esqueléticos, lo que ocasiona importantes pérdidas económicas para los agricultores (Saeed et al., 2018).

El saneamiento deficiente y la presencia de perros de pastoreo se consideran factores de riesgo para sarcocistosis en camélidos sudamericanos. Por ejemplo, se observó una mayor prevalencia (50%) de sarcocistosis en llamas mantenidas en condiciones sanitarias deficientes y con presencia de perros de pastoreo, en comparación con los (23 y 26%) mantenidos en diferentes localidades, pero en condiciones sanitarias buenas y en ausencia de perros pastores (Romero et al., 2017).

El daño causado por los hidrocarburos en el ecosistema es muy amplio, desde cambiar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo hasta ocasionar daños en flora, fauna y en la salud humana. Esto ha llevado a buscar tecnologías de restauración económicamente viables, rápidas y que protejan el ambiente. En los años recientes la aplicación de surfactantes para la remediación de suelos contaminados ha sido muy utilizada mundialmente. Los surfactantes pueden actuar incrementando la biodisponibilidad del hidrocarburo mediante la solubilización del contaminante, pero también pueden ocasionar toxicidad en los microorganismos. Esta revisión presenta un avance del conocimiento sobre los surfactantes: tipos, propiedades, características y el uso en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos haciendo énfasis en los surfactantes no iónicos, debido a su baja concentración micelar crítica (CMC) y alta degradabilidad, en específico el Tween 80 (González et al., 2018).

Se ha encontrado que la ubicación y las prácticas de alimentación afectan la prevalencia de sarcocistosis en camélidos sudamericanos, por ejemplo, la prevalencia de quistes macroscópicos en llamas sacrificadas comercialmente de Bolivia varió entre el 23% (2007) y el 50% (2011), con una prevalencia general del 34%. En otro estudio, se observó una alta prevalencia (100%) de *Sarcocystis* en llamas sacrificadas en Chile. Esta

diferencia en las tasas de infección podría deberse a la variación en la ubicación geoclimática y las prácticas de alimentación, ya que se informó de una mayor prevalencia de *Sarcocystis* en guanacos que pastan en pastizales que en las zonas boscosas. La alta prevalencia en el primer grupo se debió posiblemente al contacto frecuente de estos animales con perros utilizados para el pastoreo, sin embargo, recientemente se ha demostrado en Argentina que la sarcocistiosis en las llamas no se vio afectada por el clima, la altitud o las características de los pastos que justifican estudios adicionales (Saedd et al., 2018).

## 1.2. Antecedentes

Por ser un trabajo inédito, no se encontró antecedentes referidos al tema de estudio, de manera que se consideró estudios efectuados en otros parásitos que se encuentran en el Phylum Apicomplexa.

De 115 muestras de suelo de quintas, jardines y terrenos baldíos frecuentados por gatos, de dos barrios de Recife, fue aislado *Toxoplasma gondii*. Las muestras después de emulsionadas en agua, fueron tratadas por el método de flotación en sacarosa (densidad 1.15). Los sobrenadantes fueron inoculados por vía peritoneal, en ratones albinos. La positividad fue evidenciada al encontrar quistes en cerebro, por la presencia de anticuerpos sanguíneos por la técnica de Sabin Feldman. Las condiciones climáticas locales desfavorables aliadas a posible pérdida de infectividad durante el transporte, explican o reducen el número de muestras positivas encontradas (Azevedo et al., 1983).

La propagación potencial de parásitos por gatos silvestres que infectan ovinos y vacunos fue investigado sobre 5 Km de tierras de cultivo de Nueva Zelandia, las heces fueron colectadas para el estudio de la dieta y la prevalencia de *Sarcocystis*, la dieta consistía principalmente por ratones y despojos de carne de ovino, los esporoquistes de *Sarcocystis* fueron encontrados en un 4.8 % en las muestras de heces. La distancia domiciliaria y los movimientos de los gatos silvestres fueron estimados utilizando la radiotelemetría, las gatas que usaron graneros y pasturas tuvieron una distancia domiciliaria de (1.88-2.79 Km ) con relación a los que vivían en árboles (0.37 - 1.09 Km ); los machos adultos y jóvenes tuvieron una distancia domiciliaria de (2.76 – 3.00 Km ), la densidad de gatos silvestres residentes se mantuvo cerca de (3.5 Km ) estacionalmente fueron suplantados por gatos transitorios (Langham & Charleston, 1990).

Para aislar protozoos parásitos del agua, una porción de 1 kilogramo de vegetales fue dividido en sub porciones de 200 g. Las sub porciones fueron secuencialmente procesados y lavados con 1.5 litros de solución detergente (1% de sulfato dodecil de sodio, 0.1% tween 80) y sedimentados por 10 minutos. Después de éste tratamiento, el agua lavada fue colectada en un beaker de polipropileno y transferida a tubos de centrífuga de polipropileno de 50 ml. y centrifugados por 15 minutos a 1500 rpm. El sedimento fue consolidado dentro de un tubo completando con dos lavados de cada tubo, el sedimento final fue fijado con 4% de formol aldehído por 10 minutis antes de verificar los parásitos

Los anticuerpos de fluorescencia indirecta fueron aplicados para teñir los parásitos (*Giardia* y *Cryptosporidium*). Este procedimiento es adecuado para protozoarios (Bier, 1991).

Luego de la contaminación del suelo con desechos de ganado (heces) se monitoreo la transferencia de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* a través del suelo en el laboratorio utilizando lluvia simulada y nucleos de suelo intactos, a partir de una concentración inicial de ooquistes/núcleo. Se detectaron ooquistes en cantidades bajas en los lixiviados de suelos franco arcillosos y franco limosos, pero no en suelos arenoso-arcilloso, el análisis de los núcleos de suelos reveló que la mayoría, es decir el 73% de los ooquistes se encontraron a 2 cm superiores del suelo, los números disminuyeron a 13%, 8% y 5% a profundidades de 10, 20 y 30 cm respectivamente (Mawdsley et al., 1992).

Se ha descrito un método para la extracción y cuantificación de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* del suelo, en el que se utilizó la flotación con sacarosa, los autores indican eficiencias de extracción de hasta 61.60 % para muestras del suelo de 1 g procesadas poco después de la adición de ooquistes a las muestras, sin embargo, las eficiencias de extracción disminuyeron al 4.00 % después de 24 horas (Mawdsley et al., 1992).

En un estudio los resultados obtenidos utilizando un procedimiento adaptado del método de Mawdsley et al. (1996). En éste estudio el porcentaje de recuperación de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* fue de 43%  $\pm$  5.7% (intervalo de confianza 95%) para las muestras de suelo en la que la adición de ooquistes fue reciente (Walker et al., 1998).

Los porcentajes de recuperación de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* del suelo fueron evaluados utilizando diferentes soluciones de flotación (NaCl, ZnSO<sub>4</sub> y Sacarosa),

diferentes soluciones de dispersión (Triton X-100, Tween 80 y Tris - Tween 80); diferentes técnicas de dispersión (agitación magnética, sonicación) y diferentes tiempos de dispersión (5', 15' y 30'), 25 g. de muestras de suelo fueron utilizadas para reducir la variabilidad espacial. Los altos porcentajes de recuperación fueron obtenidos cuando se usó 50 mM Tris 0.5 % Tween 80; agitación magnética por 15 minutos, como técnica de dispersión y la solución sobresaturada de Cloruro de Sodio (NaCl) como solución flotadora. Los porcentajes de recuperación de ooquistes de suelos fueron de 1 a 2 ooquistes por gramo de suelo, dependiendo del tipo de suelo. Los porcentajes de recuperación sin dispersantes (agua destilada o fosfato salino bufferado) fueron menos que 0.1%, lo cual indica ooquistes adheridas a partículas del suelo. Los porcentajes de recuperación disminuyeron con tiempos de almacenaje, aunque la adición de dispersantes (Tris-Tween 80) antes del almacenaje parece prevenir parcialmente la adhesión (Kuczynska y Shelton, 1999).

*Giardia* y *Cryptosporidium* son agentes importantes de enfermedades parasitarias de cuerpos de agua, en este trabajo se evaluó la eficiencia de dos métodos de concentración para quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* con métodos de filtración de membrana y el método de filtración crossflow. Los resultados demostraron la alta eficiencia de la filtración crossflow en comparación con la primera. Los quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* fueron evaluados en muestras de aguas servidas, el segundo método fue capaz de reducir el número de quistes de *Giardia*, pero no los ooquistes de *Cryptosporidium* en aguas residuales (Brandonisio y Portencasa, 2000).

Los ooquistes raramente han sido recuperados del medio ambiente debido a la falta de métodos sensibles. La separación inmunomagnética, separación de célula activada por inmunofluorescencia y PCR están demostrando recientemente usos promisorios en la detección de protozoos de matrices complejos, tales procedimientos podrían ser aplicados para la detección de *Toxoplasma gondii*. Si los estudios sobre la composición bioquímica y antigénica de la pared del ooquiste son completados, utilizando estos métodos podría ser posible evaluar la ocurrencia, prevalencia viabilidad y virulencia de ooquiste de *Toxoplasma gondii* en matrices medio ambientales y fuentes específicamente de contaminación humana y animal (Dumétre y Dardé, 2003).

En alpacas procedentes del departamento de Junin, sobre seroprevalencia de Sarcocystis, utilizando la técnica de ELISA indirecta en 941 muestras de sangre de alpacas (entre

hembras y machos), de diferentes edades; obteniéndose los siguientes resultados: la seroprevalencia en animales menores de 1 año fue de 46.00%, 1 año 98.00%, 2 años 96.00%, 3 años 95.00%, mayores de 4 años 98.00 % y una seroprevalencia general de 89.70 % (Castro et al., 2004).

Un método de detección de ooquistes de *Toxoplasma gondii* del suelo fue evaluado usando la técnica de flotación con sacarosa, con una modificación adicionando 0.1% de gelatina dentro del lavado y la solución flotadora, El PCR fue desarrollado con muestras no tratadas y tratadas con polivinilpirrolidone (PVP), la adición de gelatina en la solución de sacarosa facilitó una mayor recuperación de ooquistes. Los límites de detección con el método fue 1 ooquiste/gr de suelo, indicando que este método es utilizado en estudios epidemiológicos (Matsuo et al., 2004).

El propósito fue mejorar la detección de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en muestras de suelo, comparando tres protocolos de extracción (A, B y C) sobre ooquistes esporulados y no esporulados de diferentes cargas y edades, probando el efecto de la esporulación y las características del suelo. La recuperación de ooquistes utilizando el protocolo C, en el cual la solución de flotación fue colocada bajo la solución muestra, después del paso de dispersión, fue al menos 10 veces más alto que los protocolos A y B en los cuales la muestra fue justamente filtrada antes de la flotación. La eficiencia del protocolo C probado sobre matrices de suelo artificial y 5 suelos naturales mezclados con ooquistes fue disminuyendo en suelos con alta proporción de arena. Se recomienda el protocolo C para investigaciones de campo (Lélu et al., 2011).

El objetivo de este estudio fue cuantificar la viabilidad de ooquistes de *Toxoplasma gondii* bajo 2 condiciones de lluvias. Los ooquistes se colocaron en 54 cámaras de centinela que contenían suelos y 18 tubos de agua cerradas, todo se colocaron en 2 contenedores llenos de tierra. Los contenedores se regaron para simular niveles de lluvias de climas húmedos y áridos mantenidos a temperatura estable por 21.5 meses. A los 9 meses se tomó muestras de 6 cámaras y 2 tubos, 3 métodos fueron usados para medir la viabilidad de ooquistes: conteo microscópico, PCR cuantitativo (qPCR) e inoculación en ratones. Paralelamente los ooquistes fueron colocados en refrigeración durante el mismo periodo de analizar su detectabilidad fuera del tiempo estipulado. Todas estas pruebas mostraron valores decrecientes y diferencias altamente significativas entre condiciones de sequedad y humedad. La proporción de sobrevivencia de ooquistes después de 100 días se estimó en

7.40% por qPCR bajo condiciones de sequedad y 43.70% bajo condiciones de humedad (Lélu et al., 2012).

Se ha desarrollado un método de detección de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en el agua y se propone una estrategia para la detección de múltiples parásitos de cuerpos de agua, incluyendo *Cryptosporidium* spp y *Giardia*, las muestras de agua fueron filtradas para recuperar ooquistes de *Toxoplasma gondii*, después de la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* por inmunofluorescencia, las muestras fueron purificadas con sacarosa con gradiente de densidad. La detección de *Toxoplasma* fue basada sobre la amplificación del PCR e inoculación en ratones, para determinar la presencia e infectividad de ooquistes recuperados. Después del ensayo experimental determinaron que, el PCR fue el más sensible que el bioensayo (Aubert y Villena, 2009).

En el estudio, cuatro métodos conocidos fueron utilizados para recuperar ooquistes de *Cryptosporidium parvum* de muestras de agua y heces (sedimentación, sedimentación con reducida cantidad de agua, flotación con sucrosa y separación con agua éter) fueron comparados para recuperar ooquistes de muestras del suelo previamente contaminados. La técnica de separación en dos fases demostró ser el mejor método a escoger, con un promedio de recuperación de  $61.2 \% \pm 15.6 \%$  según este método las recuperaciones más bajas y más altas fueron de 37.0 % a 95.0 % respectivamente. Otros dos resultados importantes fueron observados en experimentos del suelo, la eficiencia de la recuperación estuvo influenciada por la viabilidad de los ooquistes (la alta viabilidad fue directamente correlacionada con un incremento en la eficiencia de la recuperación), el alto contenido de arena en las muestras de suelo redujo la recuperación de ooquistes por su efecto nocivo en la viabilidad de ooquistes (Zilberman et al., 2009).

La composición del suelo, y particularmente la proporción de arena, parece afectar la tasa de recuperación de ooquistes de *Toxoplasma gondii*. De los suelos probados la composición del suelo más estrechamente relacionado con este estudio fue 97.0% de arena, 3.0 % de materia orgánica, en ese suelo se recuperó más del 20.0 % de ooquistes de *Toxoplasma gondii* mientras que los suelos con solo un 30 % de arena permitieron la recuperación de más del 30 % de ooquistes (Lélu et al., 2011)

Éste estudio describe un método de flotación rápida y económico para recuperar ooquistes de *Eimeria* del suelo, las muestras del suelo se contaminaron experimentalmente con 50000 ooquistes de *Eimeria bovis*, se probó el efecto de la tensión mecánica agitando la

mezcla de tierra y ooquistes 0, 1, 5 y 10 veces antes de la recuperación de ooquistes. El porcentaje de recuperación mediante el método de flotación fue del 22.00 %, similar a los resultados obtenidos con los métodos más intensivos, la presencia de suelo redujo el porcentaje de ooquistes que pudieron recuperarse en un 23.00 %, una sola sacudida de la mezcla fue suficiente para reducir significativamente la proporción recuperable de ooquistes. Los resultados indican que se puede aplicar el método simple desarrollado para recuperar ooquistes, y que el manejo suave de las muestras de suelo antes del aislamiento de los ooquistes es importante (Lassen y Lepik, 2014).

En alpacas beneficiadas en el camal municipal de Nuñoa - Melgar, para determinar la prevalencia de Sarcocistiosis microscópica en corazón de 939 animales entre jóvenes y adultos, se reportó una prevalencia de 80.62 %, según edad las alpacas adultas presentaron mayor prevalencia 54.21 % en relación a los jóvenes 26.41% (Gutierrez et al., 2015).

En un estudio de prevalencia de *Sarcocystis* spp en alpacas y perros pastores de la Unidad de Producción Cochabamba de la SAIS Tupac Amaru, mediante exámenes macro y microscópicos del músculo esquelético y cardíaco de alpacas beneficiadas en el camal de la empresa. La búsqueda de quistes macroscópicos se realizó mediante el examen visual de las canales, en tanto que los quistes microscópicos se diagnosticaron mediante el Método del Triquinoscopio. El examen parasitológico de heces en perros pastores se efectuó en el 30.00 % de la población por el Método de Flotación con Solución Sobresaturada de Sulfato de Zinc a fin de detectar ooquistes y/o esporoquistes. Se encontró altos niveles de infección por micro o / macroquistes de *Sarcocystis* (75 % al 100 %) en alpacas de 2, 3 y 4 años de edad, respectivamente y un 36% de perros pastores infectados con ooquistes y /o esporoquistes (Leguía y Santiago, 2018).

El estudio fue realizado para desarrollar métodos para la detección de ooquistes, del agua, suelo y alimentos, mediante técnicas de concentración y bajo condiciones de laboratorio. Las altas prevalencias de contaminación con ooquistes de *Toxoplasma gondii* fueron determinadas en áreas rurales con valores del 20%, seguido por la contaminación de patios de hogares en el 16.7% y recintos públicos 14.5 %; mientras que las prevalencias más bajas de 13.3 % fueron reportados en jardines de hogares de áreas urbanas, en estos lugares los gatos defecan siendo una fuente de infección (Ajmal et al., 2013).

## CAPÍTULO II

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 2.1. Identificación del problema.

Las altas prevalencias reportadas del 70 al 100% de Sarcocystiosis en las cuatro especies de camélidos sudamericanos en todas las regiones del país (Mostajo, 1983; Fernández, 1991; Castro et al., 2004; Gutiérrez 2015; Leguía y Santiago, 2018), demuestran los altos niveles de contaminación de los pastizales de camélidos sudamericanos con el parásito, debido a la estrecha convivencia de alpacas y llamas con los perros y la alimentación de estos con carne infectada, favoreciendo la transmisión horizontal, única forma de infección, a esto se adiciona la acción depredadora de los zorros; los cuales al no desarrollar inmunidad son re infectados continuamente, eliminando una enorme cantidad de ooquistes y esporoquistes junto con el material fecal por periodos prolongados, contaminando los campos de pastoreo, a diferencia de otras coccidias, estas no requieren evolucionar en el medio ambiente sino salen completamente esporuladas, lo cual les confiere resistencia en el medio ambiente, solo deben sobrevivir esta diferencia le brinda una mayor adaptabilidad y ventaja. Los camélidos sudamericanos se infectan al ingerir pasto o agua contaminada con esporoquistes, de *Sarcocystis* spp reproduciéndose asexualmente para finalmente establecerse en el tejido muscular formándose los quistes macroscópicos o microscópicos dependiendo de la especie de *Sarcocystis*. Al no existir una metodología que posibilite detectar y cuantificar esporoquistes en muestras de suelo y pastizales naturales, que permitirían determinar niveles de contaminación, viabilidad, sobrevivencia, dispersión en el suelo y agua con el parásito, factores de riesgo desconocidos debido a la dificultad en muestras medio ambientales. Razones que motivaron realizar esta investigación con el objetivo de desarrollar un método efectivo, económico y sencillo que permitió detectar y cuantificar esporoquistes de *Sarcocystis* en

suelos y pastizales naturales, basado sobre el análisis de métodos usados para otros protozoarios, para el entendimiento de la dinámica de la infección en camélidos sudamericanos, siendo su control un reto para los programas de salud y en el Perú este problema se complica por los bajos niveles educativos de las poblaciones en riesgo en las zonas rurales.

## 2.2. Enunciados del problema.

### **Interrogante General:**

¿El desarrollo de un método permitirá detectar los esporoquistes de *Sarcocystis* spp en suelo y pastizal natural de camélidos sudamericanos?

### **Interrogantes Específicas:**

¿Cómo influye el tiempo de almacenamiento de las muestras de suelo y pastizal natural en la recuperación de esporoquistes de *Sarcocystis*?

¿Cuál de las soluciones dispersantes: agua destilada o Tween 80 y soluciones de flotación: Sacarosa o Sulfato de Zinc utilizadas, permiten un mayor porcentaje de recuperación de esporoquistes de *Sarcocystis* en muestras de suelo y pastizal natural experimentalmente contaminadas?

## 2.3. Justificación.

Con el trabajo de investigación realizado se pretende suplir un vacío referente a la detección y cuantificación de esporoquistes de *Sarcocystis* spp en muestras de suelo y pastizales naturales de camélidos sudamericanos contaminados con el parásito.

No se ha logrado una alternativa para la prevención y control de la Sarcositiosis en camélidos sudamericanos, porque no existe una vacuna disponible para proteger a estas especies contra esta enfermedad, los fármacos anticoccidiales que existen en el mercado no son efectivos para el tratamiento de los hospedadores tanto definitivos como intermediarios, no se ha resuelto la cadena de beneficio, no se cuenta con centros de beneficio autorizados, de manera que la prevención es una de las formas prácticas de control de la sarcocistiosis en camélidos sudamericanos que requiere del conocimiento de otros factores de riesgo como: niveles de contaminación de pastizales, sobrevivencia de esporoquistes, viabilidad de esporoquistes en pastizales, dispersión en el suelo y agua etc.

Factores de riesgo que no se conocen, por la falta de un método de diagnóstico en muestras medio ambientales, por ello la investigación realizada permitirá conocer estos aspectos fundamentales, para una buena planificación del pastoreo, puesto que algunas formas de manejo del pastoreo han contribuido en el logro del control de algunas enfermedades, complementadas con las prácticas de manejo del hato que podrían impactar enormemente en la exposición de los camélidos a esporoquistes de *Sarcocystis* en pastizales naturales. La prevención y control de esta enfermedad es una necesidad para un vasto sector de criadores de camélidos domésticos en las zonas alto andinas, puesto que alrededor del 90 por ciento de las alpacas y llamas se encuentran en manos de pequeños productores, constituyendo el principal medio de subsistencia, representando una fuente económica importante, y cumpliendo un papel fundamental en el desarrollo de las comunidades andinas, sin embargo la sarcocistiosis tiene un impacto negativo en su economía debido a la presencia masiva de macroquistes en la musculatura de estas especies, dando una mala presentación visual a las canales, depreciándolas, ocasionando su decomiso en los camales de beneficio, limitando su consumo, pese a ser una carne roja de alto valor nutritivo, con bajos niveles de grasa intramuscular, y precisamente el bajo nivel educativo de los productores y el desconocimiento de acciones simples de prevención posibilitan el mantenimiento de prevalencias altas de esta enfermedad; en consecuencia, el manejo del pastoreo podría ser una alternativa que complemente planes y programas de prevención y control, siendo un reto para los programas de salud.

## **2.4. Objetivos.**

### **2.4.1. Objetivo General.**

Desarrollar un método que permita detectar esporoquistes de *Sarcocystis* spp en pastizales de camélidos sudamericanos.

### **2.4.2. Objetivos Específicos:**

Determinar los porcentajes de recuperación de esporoquistes en pastizales de zona húmeda y seca contaminados experimentalmente, en función al tiempo de almacenamiento de la muestra por 1, 4 y 7 días.

Determinar los porcentajes de recuperación de esporoquistes en pastizales de zonas húmeda y seca, contaminados experimentalmente según la solución de

dispersión: agua destilada y tween 80 y solución de flotación: Sacarosa y ZnSO<sub>4</sub> utilizadas.

## 2.5. Hipótesis.

### 2.5.1. Hipótesis General.

- Una técnica de concentración y flotación, previo lavado de la muestra con una solución dispersante permite la detección de esporoquistes de *Sarcocystis* spp en pastizales contaminados de camélidos sudamericanos.

### 2.5.2. Hipótesis Específicas:

- Los porcentajes de recuperación de esporoquistes de *Sarcocystis* spp en pastizales experimentalmente contaminados, disminuyen en función al tiempo de almacenamiento de las muestras.
- El lavado de la muestra de pastizal experimentalmente contaminado con esporoquistes de *Sarcocystis* spp con Tween 80 y el uso de una solución de flotación sea ésta, sulfato de zinc o sacarosa, permite un mayor porcentaje de recuperación de esporoquistes de *Sarcocystis* spp con relación al agua destilada y las soluciones de sacarosa o sulfato de zinc.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de estudio.

El trabajo de investigación se ha realizado entre la ciudad de Puno y el Centro Experimental La Raya, la ciudad de Puno se localiza a orillas del Lago Titicaca. Las muestras de pastizales fueron colectadas del Centro experimental La Raya, dependencia de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno, ubicado al noroeste del departamento de Puno, provincia de Melgar en la jurisdicción del distrito de Santa Rosa, al pie del nudo de Vilcanota de la cordillera de los andes, entre las coordenadas 14°30'33" latitud sur y los 70°57'12" longitud oeste, a una altitud de 4,150 y 5,400 msnm (SENAMHI, 2009). El Centro posee una topografía peculiar de partes altas con predominancia de laderas y pendientes bastante pronunciadas sujetas a erosión por inclemencias climáticas adversas, sin embargo, también presenta una parte de planicie con ligera pendiente en la zona baja. Los aspectos geográficos de acuerdo a las consideraciones ecológicas, determinan serias limitaciones térmicas, se traduce en presencia de heladas y sequías que limitan el desarrollo de la actividad agrícola, con mayor potencial para el desarrollo de una ganadería sostenida (producción de camélidos) considerando además la precipitación pluvial y la temperatura, se establece que el clima es de tipo húmedo frío, la precipitación está concentrada en los meses de noviembre a marzo, la misma que varía entre 90 mm/mes a 200 mm/ mes, encontrándose un promedio de precipitación anual promedio de 900 mm las temperaturas máximas y mínimas son de -7 y +15, con un promedio anual de 7.49 °C, la velocidad de los vientos está comprendida dentro de la clasificación de moderada, la humedad relativa es de 65 a 85 %. Los pastizales están ubicados entre 4,300 a 5,000 msnm presentando temperaturas que varían entre 13 °C a 15 °C presentando su punto más alto en el mes de noviembre y las temperaturas mínimas están entre -7°C a 2.5°C siendo su punto más bajo el mes de junio (Bazán, 2017).

La comunidad vegetal del área está compuesta en mayor proporción por gramíneas, y su utilización predominante es por alpacas y en menor escala por llamas, caballos y vacunos; el Centro presenta varios bofedales, considerado uno de los mejores pastizales para camélidos sudamericanos y generalmente se tipifican con una asociación *Distichia muscoides* y *Festuca dolichophylla*. Los suelos del centro se caracterizan por tener un pH ácido a extremadamente ácido que vá entre 6.36 a 4.36 (Oscanda y Bustinza, 1987).

En un estudio de caracterización de suelos del bofedal Huichicancha en el distrito de Santa Rosa- Melgar que corresponde puna húmeda, se reportó que la composición florística se encuentra conformada por las siguientes especies: *Scirpus rigidus*, *Alopecurus bracteata*, *Hordeum muticum*, *Plantago tuberosa*, *Poa aequigluma*, *Alchemilla rodifolia*, *Alchemilla pinnata*, *Festuca dolichophylla* entre otras especies (Siguayro, 2008).

Las muestras fueron evaluadas en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno.

### **3.2. Población.**

La investigación se realizó con un total de 96 muestras, conformadas por porciones de suelo y pastizal, distribuidos de la siguiente forma: 48 muestras/zona (húmeda y seca), de los cuales 12 muestras fueron procesadas por 4 métodos de diagnóstico, dentro de las 12 muestras, 4 sub-muestras fueron evaluadas después de 1, 4 y 7 días de almacenamiento.

Tabla 1

*Distribución de material muestral para la realización de la investigación.*

Sol. De dispersión y Sol. De flotación.	Contaminación de pastura		Tiempo de almacenamiento de muestras		
	Zona Seca	Zona húmeda			
H <sub>2</sub> O destilada y Sacarosa	12	12	1 día	4 días	7 días
Tween 80 y Sacarosa	12	12	1 día	4 días	7 días
H <sub>2</sub> O destilada y ZnSO <sub>4</sub>	12	12	1 día	4 días	7 días
Tween 80 y ZnSO <sub>4</sub>	12	12	1 día	4 días	7 días
<b>Sub total</b>	48	48			
<b>Total</b>	96				

### 3.3. Muestra.

Conformada por suelo y pastizal natural colectado de zona húmeda y seca del Centro experimental La Raya de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno.

### 3.4. Métodos de Investigación.

Los métodos que se describen son validas para los dos objetivos específicos

#### 3.4.1. Para la obtención de esporoquistes de *Sarcocystis* spp.

La obtención de esporoquistes de *Sarcocystis* spp se realizó en perros (cachorros) de aproximadamente 2.5 meses de edad, de raza criolla, realizándose el análisis coproparasitológico de cada uno, resultando dos positivos a *Toxocara canis*, desparasitándose con el antihelmíntico pamoato de pirantel al 3% administrado por vía oral; posteriormente a los 2 y 5 días post-dosificación se volvió a efectuar el análisis coproparasitológico de los cachorros parasitados para descartar la presencia de estos nemátodos que podrían dificultar con la realización de la

investigación.

Posteriormente fueron infectados con carne y corazón de alpacas con quistes de *Sarcocystis* spp.

**a. Evaluación de macroquistes en tejido muscular esquelético de alpaca:**

La carne de alpaca se obtuvo en la feria dominical del mercado de abastos del distrito de Laraqueri, la evaluación de éstas carnes se realizó mediante la observación visual de quistes macroscópicos, luego por disección con un bisturí se procedió a la extracción de 100 quistes.

**b. Evaluación de microquistes en tejido muscular cardíaco de alpacas a través del método de compresión de tejido muscular:**

El corazón de alpaca adquirido en la feria dominical del mercado de abastos del distrito de Laraqueri, fue colocado en una bandeja, examinándose detenidamente a través de la inspección, palpación y cortes, posteriormente con una pinza y bisturí se tomó una pequeña porción de tejido muscular de la zona ventricular de éste órgano, para disponer en una lámina portaobjetos que previamente contenía una o dos gotas de lugol parasitológico, luego con los dedos índice y pulgar con una laminilla cubreobjetos, se realizó una ligera presión para aplastar el tejido, considerándose la muestra como positiva al evidenciar quistes con el objetivo de 10 x del microscopio y bradizoitos con el objetivo de 40 x.

**c. Infección experimental de cachorros con quistes macro y microscópicos de *Sarcocystis* spp:**

Se realizó la infección experimental de los cuatro perros (cachorros) a dos cachorros se les proporcionó carne de alpaca con 100 quistes macroscópicos de *Sarcocystis aucheniae* y a los otros dos corazones de alpaca con quistes microscópicos de *Sarcocystis lamacanis* en la proporción de 50 gr.

**d. Colección y evaluación de muestras fecales:**

Los cachorros fueron alojados en casetas individuales para facilitar la colección de muestras fecales, que se realizaron en forma diaria a partir del 15vo. día post infección, siendo depositados en frascos de plástico de boca ancha previamente

rotuladas, en una cantidad de 10 g.

**e. Evaluación de las muestras fecales mediante el método cualitativo de concentración por flotación con sacarosa.**

**Procedimiento:**

- En un mortero se homogenizó aproximadamente 3.0 g. de heces en 20 ml. de agua destilada.
- Se tamizó y el filtrado fue depositado en un tubo de centrifuga de 15 ml. de capacidad.
- Se centrifugó a 1000 rpm por 3 minutos.
- Se eliminó el sobrenadante, resuspendiéndose al sedimento con solución sobresaturada de sacarosa, homogenizando la muestra.
- Nuevamente se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos.
- Se agregó al tubo de centrifuga, solución de sacarosa, logrando que en el borde se forme un menisco convexo, colocándose una laminilla cubreobjetos, dejando así por un espacio de 3 minutos.
- La colección de esporoquistes se realizó, trasladando la laminilla cubreobjetos a una lámina portaobjetos y observando al microscopio con los objetivos de 10 y 40x.

**3.4.2. Cuantificación de esporoquistes mediante el Método Modificado de Mc Master.**

**Procedimiento:**

- En un mortero se homogenizó 3.0 g de material fecal en 42 ml de agua destilada.
- Se tamizó y el filtrado fué depositado en un tubo de centrifuga de 15 ml de capacidad.
- Se centrifugó a 1000 rpm por 3 minutos.
- Se eliminó el sobrenadante, reemplazándose con solución sobresaturada de sacarosa
- Se homogenizó el contenido del tubo de centrifuga y la muestra fue llenada con un gotero a la cámara de Mc Master.
- Se esperó aproximadamente unos 3 minutos para que los esporoquistes floten

- y se ubiquen en la cara inferior de la lámina superior de la Cámara de Mc Master.
- La cámara de Mac Master fue colocada en la platina del microscopio, con el objetivo de 10 x se inició con el conteo de esporoquistes ubicados dentro del área de lectura de la cámara, en un foco óptico donde se ubiquen las microburbujas de aire.
  - Los resultados fueron expresados como esporoquistes por gramo de heces (EPG).

#### **Interpretación:**

- Si en 45 ml había 3 g de material fecal, en 15 ml habría 1.0 g. si de los 15 ml se tomó solo 0.15 ml que es el volumen de cada área de lectura de la Cámara de Mc Master, se estaría utilizando la centésima parte de 15 ml, el FACTOR DE RELACIÓN para cada área será 100, y si la lectura se realiza en las 2 áreas el factor será 50.

#### **3.4.3. Procedimiento de la evaluación de muestras de pastizal natural.**

La evaluación de las muestras se realizó en dos fases:

##### **a) Fase de colección de la muestra de pastizal en campo.**

La colección de la muestra de pastizal consistió en:

Muestras de suelo y pastizal fueron colectadas con una hoz de diferentes áreas de zona húmeda (bofeda) y zona seca del Centro experimental La Raya, áreas que previamente fueron cercadas con malla de alambre para no tener acceso de animales como perros y otros herbívoros, completamente mezcladas por separado, en una cantidad aproximada de 1000 g / vez colocadas en bolsas de plástico con su respectiva identificación en la que se consideró la fecha de colección y área, estas fueron trasladadas al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNA para su procesamiento.

##### **b) Fase de recuperación de esporoquistes de *Sarcocystis* spp.**

Para determinar el porcentaje de recuperación en función al tiempo de almacenamiento de las muestras, cada muestra de pastizal y suelo fueron

pesadas en una balanza digital en una cantidad de 10 g siendo colocada en una bolsa de polietileno y contaminada con  $10^3$  esporoquistes de *Sarcocystis* spp obtenidas del material fecal de los cachorros (perros) infectados, las muestras se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento, siendo analizadas después de 1, 4 y 7 días; utilizando las soluciones de dispersión, soluciones de flotación y agitación manual durante 5 minutos.

**c) Procesamiento y evaluación de la muestra de pastizal.**

**Reactivos utilizados:**

**Soluciones de flotación:** se utilizó soluciones sobresaturadas de:

- Sacarosa fría (1280 g/litro; peso específico, 1.18).
- $ZnSO_4$ : (333 g/litro; peso específico, 1.18), (Rojas, 1990).

**Soluciones dispersantes:**

- Agua destilada.
- Tween 80 (1 ml de Tween 80 y 1000 ml de agua destilada) (Kuczynka y Shelton, 1999 y Afonso, et al., 2008).

**Técnica de dispersión:** Agitación manual por 5 minutos.

**Tiempo de almacenamiento- de las muestras:** 1, 4 y 7 días.

**3.4.4. Procedimiento para la recuperación de esporoquistes:**

Todas las evaluaciones se realizarán utilizando las soluciones de dispersión y flotación indicadas:

- 10 g de muestra de suelo y pastizal contenidas en una bolsa de polietileno, previamente contaminadas con 1000 esporoquistes de *Sarcocystis* spp fueron extraídas de la refrigeradora a T° de 4°C, de acuerdo a los días de su almacenamiento, para ser colocadas en un recipiente, para su lavado con 500 ml de solución de dispersión, agitándose manualmente la muestra por espacio de 5 minutos, descartándose el pastizal transcurrido este lapso de tiempo.
- Se filtró la suspensión por un tamiz (100  $\mu$ m/poro) a un vaso cónico de sedimentación de 500 ml de capacidad.

- Se dejó sedimentar durante toda una noche.
- Se eliminó el sobrenadante y el sedimento fue transferido a varios tubos de centrífuga de 15 ml de capacidad.
- Se centrifugó por 5 minutos a 1000 rpm.
- Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió a los sedimentos de los tubos utilizados con solución de flotación.
- Se centrifugó por 10 minutos a 1000 rpm.
- A cada tubo se agregó solución de flotación, hasta lograr la formación de un menisco convexo en el borde de cada tubo, colocándose laminillas cubreobjetos.
- Se esperó aproximadamente unos 3 minutos para que los esporoquistes se adhieran a la cara inferior de las laminillas cubreobjetos
- Las laminillas cubreobjetos fueron trasladada a láminas portaobjetos, observándose en el microscopio con objetivos de 10 y 40 x efectuándose el conteo microscópico de esporoquistes.

#### 3.4.5. Diseño experimental u observacional.

Los datos obtenidos en la investigación, sobre recuperación de esporoquistes de *Sarcocystis* spp en suelo y pastizal natural de zona seca y húmeda experimentalmente contaminados, fueron analizados bajo un arreglo factorial de 2x4 con 3 bloques, bajo el diseño de bloque completo al azar con sub-muestreo, cuyo modelo estadístico es:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \beta_k + e_{ijk} + \delta_{ijkl}$$

Donde:

$Y_{ijkl}$  = variable respuesta, porcentaje de esporoquistes recuperados.

$\mu$  = efecto de la media poblacional.

$\alpha_i$  = efecto del  $i$ ésimo zona (húmeda y seca)

$\beta_j$  = efecto del  $j$ ésimo uso de solución de dispersión y solución de flotación  
(1, 2,3,4)

$(\alpha\beta)_{ij}$  = efecto de la interacción zona de muestreo con solución flotadora y dispersión

$\beta_k$  = efecto del keésimo bloque de sub muestreo (1, 4 y 7 días).

$e_{ijk}$  = efecto del error no controlable del investigador

$\delta_{ijkl}$  = efecto de las unidades de submuestreo en cada bloque.

La comparación de medias, se contrastó utilizando la prueba múltiple de significación de Tukey  $\alpha= 0.05$ .

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se muestran en las tablas siguientes.

#### 4.1. Porcentajes de recuperación de esporoquistes en pastizales de zona húmeda y seca contaminados experimentalmente, en función al tiempo de almacenamiento de la muestra

Tabla 2

*Porcentaje de recuperación de esporoquistes de sarcocystis spp en pastizales en función al tiempo de almacenamiento de las muestras.*

Zona	Tiempo de almacenamiento muestra días	Porcentaje recuperación de esporoquistes	C.V. %
<b>Húmeda</b>	1	23.50	4.66
	4	22.34	6.00
	7	21.61	18.20
<b>Seca</b>	1	21.31	15.73
	4	20.30	10.07
	7	19.19	22.94

En pastizales de zona húmeda experimentalmente contaminadas de acuerdo al almacenamiento de las muestras por: 1, 4 y 7 días, los porcentajes de recuperación de esporoquistes fueron de 23.50 %, 22.34% y 21.61% respectivamente en relación a 21.31

%, 20.30 % y 19.19 % de zona seca. Estos valores contrastados a la prueba estadística de Tukey indican que las medias no son estadísticamente diferentes ( $p \geq 0.05$ ) para ambas variables, días de almacenamiento de muestras y zonas de muestreo de pastizal, En ambas zonas de muestreo los porcentajes de recuperación de esporoquistes disminuyeron ligeramente después de los días 4 y 7 (Tabla 2).

Al no encontrar investigaciones referidas al tema, la discusión se ha realizado con resultados obtenidos en suelos experimentalmente contaminados con otras coccidias del Phylum Apicomplexa.

La ligera disminución en los porcentajes de recuperación de esporoquistes de *Sarcocystis* spp después del almacenamiento de las muestras por 1, 4 y 7 días a temperatura de 4°C en ambas zonas de muestreo, probablemente sean debidas al tipo de muestra, pastizal y suelo utilizada en el experimento, obviamente con mayor cantidad de materia orgánica en zona húmeda, corroborado por Lélu et al. (2011) quienes indican que la eficiencia en la recuperación de ooquistes de *Toxoplasma gondii* tiende a ser más alta en matrices de suelos con mayor cantidad de materia orgánica, además el tiempo de almacenamiento fue más corta, lo que permitió una menor descomposición de esporoquistes y tal vez a la mayor resistencia de los esporoquistes por carecer de cuerpo de stieda (Cordero del Campillo et al., 1999)

Nuestros resultados difieren con los obtenidas por Kuczynska y Shelton (1999), quienes realizaron experimentos con los siguientes tipos de suelo: franco arenoso (66.9% de arena, 16.6 % de limo, 16.5 % de arcilla y 1.1 % de material orgánica); suelo franco arcilloso limoso (18.4 % de arena, 53.2 % de limo, 28.4 % de arcilla y 3.1 % de material orgánica); franco arcilloso (25.7 % de arena, 53.2 % de limo, 31.8 de arcilla y 2.8 % de materia orgánica), en el cual alicuotas de 25 g. de suelo secada al aire, fueron contaminados con  $10^4$  ooquistes de *Cryptosporidium parvum* utilizando como solución de dispersion Trix-Tween 80 y como solución de flotación cloruro de sodio, las muestras se almacenaron a 4°C y se procesaron después de 1 hora; 1, 3, 7, 10, 14 y 21 días, por agitación magnética durante 15 minutos, los porcentajes de recuperación se evaluaron en función al tiempo de almacenamiento sin y con la adición de la solución dispersante. Los porcentajes de recuperación de suelos franco arenosos disminuyeron sustancialmente a menos de 1% después de 21 días de almacenamiento de las muestras, es decir del 6% al 0.5 % aunque la adición de la solución de dispersión mejoró los porcentajes de recuperación, ésta

diferencia probablemente sea debido a la mayor adhesión de los ooquistes a las partículas del suelo y a la descomposición de los ooquistes por el mayor tiempo de almacenamiento de las muestras de 21 días, puesto que la adhesión de las partículas del suelo no impide la descomposición de ooquistes, pero interfiere en su cuantificación.

Resultados superiores fueron obtenidos por Maudsley et al. (1992) quienes han descrito un método para la extracción y cuantificación de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en diferentes tipos de suelos experimentalmente contaminados en el que se utilizó la flotación de sacarosa; estos autores informaron eficiencias de extracción de hasta 61.6% para muestras de suelo de 1 g procesadas poco después de la adición de ooquistes; sin embargo, las eficiencias de extracción disminuyeron a 4% después de 24 horas y la disminución fue mayor a 99 % después de una semana de almacenamiento de las muestras; resultados contrastantes con los obtenidos en la investigación realizada.

Teniendo en consideración el tipo de suelo, Kuczynska y Shelton (1999) refieren que los porcentajes de recuperación de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* que se determinaron para suelos arenosos, franco arcillosos limosos y franco arcillosos, disminuyeron a medida que aumentó el contenido de arcilla, y posiblemente esta condición podría influir en los resultados obtenidos en el estudio puesto que el análisis de caracterización de suelo de bofedales de puna húmeda y seca del distrito de Santa Rosa - Melgar en la cual se encuentra el Centro Experimental La Raya, presenta un 46 % de arena, 9 % de arcilla y 45 % de limo, con un pH de 4.99 y considerado con una textura de franco (INIA, 2007).

#### **4.2. Porcentajes de recuperación de esporoquistes en pastizales de zonas húmeda y seca, contaminados experimentalmente según la solución de dispersión**

En la tabla 3, se muestra porcentajes de recuperación de esporoquistes en pastizales de zonas húmeda y seca, contaminados experimentalmente según la solución de dispersión

Tabla 3

*Porcentaje de recuperación de esporoquistes de Sarcocystis spp en función a la solución de dispersión y flotación*

Zona	Húmeda			Seca			
	Solución de dispersión con solución de flotación.	Nº muestra	$\bar{x}$ % Recup.	C.V. %	Nº muestra	$\bar{x}$ % Recup.	C.V. %
H <sub>2</sub> O Destilada y Sacarosa		12.00	26.56	4.66	12.00	22.68	15.73
Tween 80 y Sacarosa		12.00	34.02	6.00	12.00	30.13	10.07
H <sub>2</sub> O Destilada y ZnSO <sub>4</sub>		12.00	12.48	18.20	12.00	12.61	22.94
Tween 80 y ZnSO <sub>4</sub>		12.00	16.88	10.46	12.00	12.51	13.30

En las dos zonas de muestreo de pastizal húmedo y seco, los experimentos se realizaron utilizando como solución de flotación sacarosa fría y sulfato de zinc, y como solución dispersante agua destilada y tween 80, y como técnica de dispersión la agitación manual por 5 minutos. Los porcentajes de recuperación fueron los siguientes: 26.56% y 22.68% con agua destilada y sacarosa, 34.02% y 30.13% con tween 80 y sacarosa, 12.48% y 12.61% con agua destilada y sulfato de zinc, 16.88% y 12.51% con tween 80 y sulfato de zinc en ambas zonas de muestreo. Los mayores porcentajes de recuperación en ambas zonas de muestreo fueron obtenidos con tween 80 y sacarosa, siendo significativamente mayores ( $P \leq 0.05$ ) (Anexo 9) que los porcentajes de recuperación con las otras soluciones en ambas zonas de muestreo. Así mismo los valores obtenidos según zona de muestreo indican tener diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ) (Anexo 8)

Los niveles de recuperación de esporoquistes dependen del peso específico de la solución de flotación, de la separación física de los esporoquistes de las partículas del suelo y pastizal y de la dispersión de las partículas del suelo durante la fase de sedimentación, la solución de flotación ideal debería tener un p.e. relativamente alta y una baja viscosidad,

la separación de los esporoquistes de las partículas del suelo debería ser simple, probablemente la sacarosa y el dispersante tween 80 tendrían estas condiciones.

Tabla 4

*Porcentajes de recuperación de esporoquistes de Sarcocystis spp en pastizal de zona húmeda en función a las soluciones de dispersión y días de almacenamiento de las muestras.*

Método de flotación con sacarosa				Método de flotación con sulfato de zinc			
Solución dispersante	Almacena- miento días	% Recup.	CV %	Solución dispersante	Almacena- miento días	% Recup.	CV %
Agua Destilada	1	26.8	4.31	Agua Destilada	1	13.7	19.23
	4	25.6	4.92		4	13.1	14.11
	7	27.2	3.44		7	10.7	12.32
Tween 80	1	35.3	5.51	Tween 80	1	18.2	9.49
	4	33.5	6.24		4	17.2	7.34
	7	33.3	6.05		7	15.3	6.73

Los porcentajes de recuperación de esporoquistes de Sarcocystis en pastizales experimentalmente contaminadas de zona húmeda, se determinaron utilizando como soluciones de flotación: sacarosa y sulfato de Zinc y como soluciones de dispersión agua destilada y tween 80 (Tabla 4). Los porcentajes de recuperación según días de almacenamiento de las muestras por 1, 4 y 7 días, muestran valores que no denotan variabilidad y estadísticamente indican no tener diferencia (Anexo 12), sin embargo, estos resultados varían según las soluciones de dispersión y flotación utilizadas, evidenciando

variabilidad y estadísticamente indican tener diferencia ( $P \leq 0.05$ ). Los valores más altos se lograron cuando se utilizó el Tween 80 como solución dispersante (35.3 % y 18.2 %) con las soluciones de flotación utilizadas, con relación a los menores valores obtenidos con agua destilada como solución dispersante (26.8 % y 13.7 %) independientemente de los tiempos de almacenamiento de las muestras, los coeficientes de variabilidad fueron más altos, en los más bajos niveles de recuperación de esporoquistes (sulfato de Zinc y agua destilada).

Tabla 5

*Porcentaje de recuperación de esporoquistes de Sarcocystis spp en pastizales de zona seca en función a las soluciones de dispersión y días de almacenamiento de la muestra.*

Método de flotación con sacarosa				Método de flotación con sulfato de zinc			
Solución dispersante	Almacena- miento días	% Recup.	C.V %	Solución dispersante	Almacena- miento días	% Recup.	C.V %
Agua destilada	1	23.5	20.36	Agua destilada	1	13.7	34.60
	4	23.7	17.15		4	12.8	10.78
	7	20.9	5.14		7	11.4	14.72
Tween 80	1	30.7	14.14	Tween 80	1	17.5	12.44
	4	23.3	10.14		4	15.4	7.34
	7	30.4	6.14		7	14.1	9.97

La recuperación de esporoquistes de Sarcocystis en pastizales experimentalmente contaminadas de zona seca, se establecieron utilizando como solución de flotación sacarosa y sulfato de Zinc y como solución de dispersión agua destilada y tween 80 (: Tabla 5); los porcentajes de recuperación en función a los días de almacenamiento de las muestras por 1, 4 y 7 días, mantenidas a temperatura de 4 °C muestran valores que no denotan variabilidad y estadísticamente indican no tener diferencia significativa ( $P = \geq 0.05$ ) (Anexo: Tabla 14), sin embargo estos porcentajes varían de acuerdo a la solución de dispersión utilizada, evidenciando variabilidad y estadísticamente indican tener diferencia ( $P \leq 0.05$ ). Los porcentajes de recuperación fueron menores al utilizar agua

destilada como dispersante (23.5% y 13.7%) con relación a los mayores porcentajes logrados con la solución de dispersión Tween 80 (30.7% y 17.5%) con las soluciones de flotación Sacarosa y Sulfato de zinc, independientemente de los tiempos de almacenamiento de las muestras.

La detección y cuantificación de esporoquistes de *Sarcocystis* fue complicada, debido a los altos niveles de partículas de tierra en el fondo de las copas utilizadas durante el proceso de sedimentación, experimento que concuerda con lo mencionado por Kato y Bowman (2002) y Lélú et al. (2011) que los ooquistes pueden ser difíciles de detectar porque son más frágiles que los huevos de parásitos mas grandes, muchos de los métodos existentes son complicados y el tiempo demandado requiere de materiales y reactivos especiales, teniendo un éxito moderado en la cuantificación.

Al no encontrar estudios referidos a la investigación efectuada, la discusión se ha realizado con resultados obtenidos en investigaciones de contaminación experimental de suelos con otros coccidios del Phylum Apicomplexa. Nuestros resultados son mayores a los obtenidos por Kucsynska y Shelton (1999) quienes en un estudio de recuperación de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* de suelos arenosos, franco arcilloso limoso y franco arcilloso, obtuvieron los porcentajes más altos de recuperación de 12 a 18.8% mediante la flotación con cloruro de sodio (NaCl) y como solución de dispersion Tris-Tween 80, se argumenta que esto se debió principalmente a la capacidad de los cationes monovalentes para dispersar las partículas del suelo, lo que minimizó la recuperación de oocistos o agregados de partículas del suelo, los porcentajes de recuperación por flotación con sacarosa fueron bajos (2.8%), se indica que fue debido a una combinación de menor gravedad específica (p.e: 1.18; 700 g/l de agua destilada) y una mayor viscosidad de la solución, lo valores fueron sustancialmente menores con la flotación de  $ZnSO_4$  (0.8%) a pesar de la mayor gravedad específica de la solución ( p.e: 1.3 y 700 g/l de agua destilada) a diferencia de nuestros resultados donde los mayores porcentajes se lograron utilizando como solución de flotación sacarosa con el mismo peso específico (p.e 1.18, 1280 g/l de agua destilada) que mencionan y como solución de dispersión solo tween 80, así mismo los valores logrados con sulfato de zinc y Tween 80 de 16.88 % y 12.65% en zona húmeda y seca fueron sustancialmente mayores en relación a los obtenidos por estos autores, pese a la menor densidad de la solución utilizada (333 g/l de agua destilada). Las diferencias en los resultados, posiblemente sean debidos a: las cantidades de reactivos e insumos utilizados en la preparación de las soluciones de flotación, al material empleado en los

protocolos de diagnóstico, la cantidad y tipo de muestra en los procedimientos de recuperación de estos coccidios, debemos indicar que las muestras que los autores utilizaron estuvieron constituidos solo por suelo, a diferencia de las nuestras, suelo y pastizal natural con mayor cantidad de materia orgánica, no fue posible utilizar el NaCl como solución de flotación, puesto que el uso de este reactivo en zona de altura, ocasiona la cristalización de la muestra a observar, dificultando la visualización de los esporoquistes.

Nuestros resultados con sacarosa y tween 80 (34.02% y 30.13%) en pastizales naturales de ambas zonas de muestreo (húmedo y seca) se aproximan a los obtenidos por Lélú et al. (2011) quienes en muestras de suelos, experimentalmente contaminados con ooquistes de *Toxoplasma gondii* mediante 3 protocolos de extracción A, B y C, utilizando como solución de flotación sacarosa fría y como solución de dispersión: agua destilada, hexametáfosfato y tris-tween 80, lograron recuperar las más altas concentraciones de ooquistes no esporulados con el protocolo C, debido a que el paso de filtración aplicado en los protocolos A y B podrían ser los responsables de la pérdida de ooquistes, probablemente por ser retenidos en los filtros utilizados en relación al protocolo C, en el cual no se realizó el filtrado de la muestra, y la solución de flotación fue directamente colocado sobre el sedimento de la suspensión contaminada, resultando ser al menos 10 veces mejor que los otros protocolos probado en matrices de suelos artificiales (5) y naturales (4), en matrices artificiales, la más alta eficiencia de recuperación del 32 % fue obtenido en suelos con baja proporción de arena; y estas altas eficiencias de recuperación de ooquistes tuvieron una tendencia mayor en matrices con materia orgánica que en matrices minerales, es así que en suelos naturales con menos del 20 % de arena se obtuvo el 35 % de recuperación de ooquistes, en contraste de suelos con más del 40 % de arena donde el porcentaje de recuperación logrado fue del 17 %. Resultados que corroboran a los reportados en nuestra investigación, debido a que utilizamos mezcla de pastizal natural y suelo de zona húmeda y seca que tiene una buena proporción de materia orgánica y definitivamente la eficiencia del porcentaje de recuperación de esporoquistes de *Sarcocystis* y otras coccidios, dependería de la caracterización de los suelos naturales y su composición mineral podría afectar en este proceso.

Lélú et al. (2011) señalan que las tasas de recuperación de ooquistes de *Toxoplasma gondii* disminuyeron con la edad de los ooquistes utilizados para la contaminación de las muestras, así mediante el protocolo C, se logró la recuperación del 46 % de ooquistes al

contaminar el suelo con ooquistes de 2 meses de edad, en relación al 15 % obtenido con ooquistes de 22 meses de edad, los ooquistes fueron conservados en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) (pH 7.2) a 4 °C hasta su uso. Este estudio confirmaría nuestros resultados alcanzados, debido a que la muestra de pastizal natural y suelo fueron contaminados con esporoquistes de *Sarcocystis* spp provenientes de heces frescas de cachorros experimentalmente infectados, al menos después del primer día de contaminación lográndose los valores más altos de recuperación (Anexo 11)

Comparando los valores logrados con Tween 80 y Sacarosa en ambas zonas de muestreo, estos son mayores a los de Matsuo et al. (2004) quienes utilizaron 2 métodos para la detección de ooquistes de *Toxoplasma gondii* en muestras de suelo: método modificado de flotación con sacarosa y PCR. Para el primer método se contaminó suelo (30 g) y se suspendió en 50 ml de la solución Tween 80 (0.1%), se filtró, descartándose el sobrenadante, se verificó el efecto de la gelatina al 0.1% en la recuperación de ooquistes en las soluciones de lavado y flotación con solución de sacarosa (p.e.1.20) el tubo fue llenado hasta el tope con solución de flotación, se cubrió con una lámina cubreobjetos centrifugándose por 5 minutos, el cubre objetos fue removida a una lámina portaobjetos y examinada en el microscopio a 200 x realizándose el conteo en todo el cubreobjetos, la adición de gelatina incrementó significativamente el número de ooquistes recuperados del 7% al 21% comparado con muestras sin la adición de gelatina; en consecuencia, se piensa que los dispersantes como la gelatina separarían los organismos deseados de las partículas del suelo; se detalla el procedimiento, por la similitud del conteo efectuado en el estudio efectuado, pero difiere en las cantidades de muestra procesada y soluciones utilizadas.

Los valores reportados en el estudio, con agua destilada y sacarosa de zona seca (22,68%) se aproximan a los obtenidos por Lassen y Lepik, (2014) en la recuperación de ooquistes de *Eimeria bovis* en muestras de suelo, analizada y estimada como suelo arenoso (80.62% de arena, 12.31% de limo, 7.07% de arcilla y 0.96 % de carbón orgánico) muestras que en alícuotas de 10 g fueron contaminadas con 50 000 ooquistes de 12 meses de edad, experimento realizado en jeringas hipodérmicas de 50 ml de capacidad, eliminándose el paso de centrifugación, el tamizado se redujo a una gasa médica, utilizándose como solución de flotación sacarosa (p.e.1.24) lográndose recuperar el 22% de ooquistes, un experimento separado probó el efecto del estrés mecánico que provoca el proceso de agitación de la mezcla de tierra y ooquistes 0, 1, 5 y 10 veces antes de la recuperación, un sólo batido de la mezcla de ooquistes y suelo fue suficiente para reducir

significativamente la tasa de recuperación en casi el 50 %, la agitación de 5 a 10 batidos redujeron la recuperación a 1.6 %. Este estudio hace referencia que el manejo mecánico de la mezcla de arena, ooquistes y líquidos ejercen estrés físico en la muestra ocasionando la pérdida de ooquistes en éste tipo de diagnósticos, situación que no fue relevante, en nuestros resultados debido a que la mezcla de muestra y solución de dispersión fue por agitación manual durante 5 minutos, los menores porcentajes alcanzados en éste estudio se deberían a la mayor proporción de arena en la muestras evaluadas, la edad de ooquistes utilizados para la contaminación de las muestras, el material utilizado en el experimento y el obviar el uso del dispersante; sin embargo parece necesario e importante el manejo de las muestras antes de la recuperación de este tipo de protozoarios.

Los valores logrados en el estudio, fueron inferiores a los referidos por Mawdsley y col. (1996) quienes han descrito un método para la extracción y cuantificación de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en diferentes tipos de suelos experimentalmente contaminados, en los que se utilizó la flotación de sacarosa, estos autores encontraron eficiencias de extracción de hasta 61.6% para muestras de suelo de 1 g procesadas poco después de la adición; así mismo, Walker et al. (1998) obtuvieron resultados comparables usando un procedimiento adaptado del método de Mawdsley et al., en éste estudio, el porcentaje de recuperación fue del  $43\% \pm 5,7\%$  (intervalo de confianza promedio  $\pm 95\%$ ) para las muestras recién contaminadas, siendo un método adecuado para experimentos de laboratorio debido a que los oocistos se distribuyan de manera relativamente homogénea en todo el suelo, aducimos que esta diferencia sea debida a que estos autores tuvieron otra forma de conteo de ooquistes,

En la investigación realizada por Zilberman et al. (2009) Se ha probado cuatro métodos conocidos que fueron utilizados para recuperar ooquistes de *Cryptosporidium parvum* de muestras de agua y heces (técnica de sedimentación flotación, T. de sedimentación flotación con reducida cantidad de agua, flotación con sucrosa y separación con éter-agua) estas técnicas fueron utilizados para recuperar ooquistes en muestras de suelo (20 g) previamente contaminados con ooquistes de 2 a 8 días de edad. La técnica de separación en dos fases demostró ser el mejor método a escoger, con un promedio de recuperación de  $61.2 \pm 15.6\%$  según este método las recuperaciones más bajas y más altas fueron de 37 % a 95% respectivamente. Así mismo la eficiencia de la recuperación estuvo influenciada por la viabilidad de los ooquistes (la viabilidad alta fue directamente correlacionada con un incremento en la eficiencia de la recuperación), los resultados

obtenidos con la técnica de flotación con sucrosa de  $39.6 \% \pm 15.6 \%$ , se aproximan a los obtenidos en el estudio efectuado, donde la flotación con sacarosa y tween 80 logró recuperar el 34.02% de esporoquistes de *Sarcocystis* en pastizal de zona húmeda y 30.13% en zona seca. En el protocolo de los autores se utilizó agua destilada y después del filtrado se colocó en 400 ml de solución de sacarosa dejando flotar durante toda una noche; la técnica de separación en dos fases es más compleja y requiere de otros reactivos como el glicol polietilene 6000, la eficiencia en la cuantificación de ooquistes, se debería a que en todas las técnicas probadas fue determinado por tinción de anticuerpos monoclonales y epifluorescencia.

Los resultados obtenidos según solución de dispersión utilizada (Tablas:4 y 5) difieren de los obtenidos por Kuczynska y Shelton (1999) quienes al contaminar suelos franco arenosos con ooquistes de *Cryptosporidium parvum* utilizando diferentes soluciones de dispersión como: agua destilada, PBS (solución salina tamponada con fosfato BD), Tween 80, Triton X-100 y Tris-Tween 80; los porcentajes de recuperación con Tris-Tween 80 fueron significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) con valores de (14.7%) con relación a los porcentajes de recuperación con otros dispersantes, se evaluó el tiempo de dispersión de 5, 15 y 30 minutos, los porcentajes de recuperación después de 15 o 30 minutos fueron significativamente más altos ( $< 0.05$ ) que los porcentajes de recuperación después de 5 minutos, incrementándose este porcentaje a ( $18.0\% \pm 3.2\%$ ); sin embargo, los porcentajes más bajos fueron obtenidos con agua destilada (0.6%) y PBS (0.02%), con Tween 80 se logró valores de (3.2%). Estos resultados difieren con los resultados de Mawdsley et al. (1996) que obtuvieron niveles más altos de recuperación con Tris-Tween 80, utilizando como técnica de dispersión la agitación magnética, que es un procedimiento relativamente suave, se menciona que las fuerzas de corte creadas por la mezcla fueron demasiado severas para las paredes de los oocistos.

En el estudio desarrollado, los resultados obtenidos utilizando Tween 80 como solución dispersante, fueron mayores a los mencionados por Kuczynska y Shelton (1999), empleando el mismo dispersante, posiblemente por la menor cantidad de muestra (10 g) y el mayor tiempo de dispersión de toda una noche en el protocolo, debido a que la dispersión se realizó en copas de sedimentación de 500 ml de capacidad, que demandan el uso de mayor cantidad de solución de dispersión a utilizar y un mayor tiempo de dispersión, a diferencia de la investigación mencionada en el que usó mayor cantidad de muestra (25 g) realizándose la dispersión en tubos de 100 y 50 ml de capacidad, con igual

cantidad de solución de dispersión y sometidos a presiones de centrifugación por 10 minutos. Referente a los días de almacenamiento de las muestras, los autores mencionados refieren que los porcentajes de recuperación de suelos franco arenosos disminuyeron a valores menores del 1% después de 10 días de almacenamiento; sin embargo, estos valores mejoraron con la adición de solución dispersante, situación que no se presentó en el estudio realizado.

Nuestros resultados según solución de dispersión utilizada fueron mayores a los obtenidos por Lélú et al. (2011) quienes en muestras de suelo (10 g) experimentalmente contaminados con ooquistes de *Toxoplasma gondii* mediante 3 protocolos de extracción, utilizando sacarosa como solución de flotación en todos los casos y como solución de dispersión: agua destilada, Tris-Tween 80 y Hexametáfosfato, la eficiencia de la recuperación de ooquistes usando los protocolos A, B y C estimados a partir de los resultados de conteo variaron de acuerdo a la solución de dispersión utilizada, las más altas tasas se lograron con el protocolo C, habiéndose reportado los siguientes resultados: 18% con agua destilada, 15% con Tris-Tween 80 y 9.8% con Hexametáfosfato, las diferencias en los resultados podrían atribuirse a la cantidad de solución de dispersión utilizada en la investigación 20 ml y el uso de tubos de 50 ml de capacidad, siendo sometida a presiones de centrifugación a diferencia del material y tiempo de sedimentación empleada en el protocolo de diagnóstico que utilizamos.

Es preciso indicar que los valores obtenidos en ambas zonas de muestreo difieren, obteniéndose los mayores porcentajes de recuperación en muestras contaminadas de zona húmeda en relación a la zona seca, la zona de muestreo es una variable que estadísticamente indican tener diferencia ( $P = \leq 0.05$  Anexo 8) es decir la zona de muestreo influye en el porcentaje de recuperación de esporoquistes, esta diferencia posiblemente sea debida a la mayor cantidad de materia orgánica en zona húmeda. Si se realizaría la comparación de los valores obtenidos por zonas de muestreo en pruebas de campo, con contaminación natural de esporoquistes eliminados en material fecal de perros infectados con este protozooario, los resultados posiblemente variarían, por el lapso de sobrevivencia del parásito en el medio que definitivamente dependen de las condiciones medio ambientales como indica Cordero del Campillo et al. (1999). Por otra parte, se ha mencionado en las discusiones anteriores que las caracterizaciones de los suelos influyen en los porcentajes de recuperación de ooquistes de otros coccidios, de manera este es un aspecto importante a tener en cuenta al realizar la evaluación de los pastizales a evaluar.

## CONCLUSIONES

- Primera:** Los porcentajes de recuperación de esporoquistes de *Sarcocystis* spp en pastizales contaminados experimentalmente en función al tiempo de almacenamiento de las muestras por 1, 4 y 7 días fueron de 23.50%, 22.34% y 21.61% en pastizales de zona húmeda y de 21.31%, 20.30% y 19.19% en pastizales de zona seca.
- Segunda:** Los porcentajes de recuperación de esporoquistes de *Sarcocystis* spp en pastizales de zona húmeda y seca contaminados experimentalmente en función a la soluciones de dispersión y flotación utilizadas fueron de: 26.56% y 22.68% con agua destilada y sacarosa; 34.02% y 30.13% con Tween 80 y sacarosa; 12.48% y 12.61% con agua destilada y Sulfato de Zinc; 16.88% y 12.65% con Tween 80 y Sulfato de Zinc respectivamente, obteniéndose los mayores porcentajes de recuperación en ambas zonas de muestreo con Tween 80 y sacarosa.

## RECOMENDACIONES

- Primera:** Siendo el estudio una investigación experimental de laboratorio, con una distribución relativamente homogénea de esporoquistes en suelo y pastizal natural, se recomienda su aplicación a escala de campo, con una distribución de esporoquistes probablemente más heterogénea.
- Segunda:** Dentro del protocolo de diagnóstico, por lo laborioso del conteo microscópico de esporoquistes, se recomienda su perfeccionamiento por otras que requieren de la disponibilidad de otros materiales, reactivos y equipos de laboratorio.
- Tercera:** En futuras investigaciones en pastizales naturales, sería necesario considerar la caracterización de los suelos, por la repercusión que tiene en los porcentajes de recuperación de esporoquistes de *Sarcocystis* spp.

## BIBLIOGRAFÍA

- Afonso, E., Lemoine, M., Poulle, M.L., Ravat, M.C., Romand, S., Thulliez, P., Villena, I., Aubert, D., Rabilloud, M., Riche, B., Gilot-Fromont, E. (2008). Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behavior in urban area. *Int. J. Parasitology* 38:1017-1023. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0020751908000234?via%3DiHub>
- Aubert, D., Rabilloud, M., Richi, B. y Gilot-Fromont, E. (2008). Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behavior in an urban area. *J. Parasitol.* 38: 1017-1023.
- Ajmal, A., Maqbool, A., Fiaz Qamar, M., Ashraf, K y Ahmad Anjum, A. (2013). Detección de *Toxoplasma gondii* in environmental matrices (water, soil, fruits and vegetables). *African Journal of Microbiology Research*. Vol.7 (16) .1505-1511.
- Alva, J., Rojas, M. y Nuñez, A. (1980). Decomiso por parásitos y su importancia económica en alpacas (*Lama pacos*). *Rev. Inv. Pec.* (IVITA) 5:61-62.
- Aubert, D. y Villena I. (2009). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne Region France. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 104(2):290-295. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000200023>
- Azevedo, D.S., Jamra, L.M. y Ribeiro. (1983). Isolamento de oocistos de *Toxoplasma gondii* em dois bairros de Recife (PE). *Rev. Inst. Med. Trop Sao Paulo*: 25(1):31-6. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172004000100012](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172004000100012)
- Bazan, J. (2017). Centro Experimental La Raya. <https://es.scribd.com/document/361452918/Centro-Experimental-La-Raya>
- Brandonisio, O. y Portencasa, G. (2000). *Giardia* y *Cryposporidium* in water: Evaluation of two concentration methods and occurrence in wastewater. *Parasitology* 42(3-4): 205-209.
- Bier, J.W. (1991). Isolation of parasite on fruits and vegetables. *Asian. J. trop. Med.*



*Public. Heald.* 22:144-5.

- Castro, E., Sam, R., López, T., González, A. y Silva, M. (2004). Evaluación de la edad como factor de riesgo de seropositividad a *Sarcocystis* spp en alpacas. *Rev. Inv. Vet. Perú.* [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172004000100012](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172004000100012)
- Cordero del Campillo, M., Rojo, F., Martinez, A., Sánchez, M., Fernández, S. y Lopéz, I. (1999). *Parasitología Veterinaria*. Ed. Interamericano, Mc. Graw-Hill. Madrid-España.
- Cornejo, B., Chávez, V., Leyva, V., Falcón, P., Panes, L. y Ticona, S. (2007) Relación entre el tamaño de los macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* y su viabilidad en *Canis familiaris*. *Rev Investig Vet Perú.* 18: 76–83.
- Dumétre, A. y Dardé, M.L. (2003). How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples. *FEMS. Microbiology reviews* 27:651-661. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00071-8)
- Dubey, J. P., Calero-Bernal, R., Rosenthal, B.M., Speer, C.A. y Fayer, R. (2015). *Sarcocystis* of animals and man. Second Ed. CRC. Press. Taylor & Francis Group London, New York. 481 p.
- Durant, J.F., Ireng, L.M., Fogt-Wyrwas, R., Dumont, C., Doucet, J.P., Mingnon, B., Losson, B., Gala, J.L. (2012). Duplex quantitative real-time PCR assay for the detection and discrimination of the eggs of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* in soil and fecal samples. *Parast Vectors.* Dec 7.5, 288
- Germana, C., Chaquilla, O., Santos, G., Fersan, M. y Krusch, C. (2016). *Estudio socio económico de los pastores andinos de Perú, Bolivia, Ecuador y Argentina*. El Alva SRL. Arequipa-Perú.
- Farfán, R. y Farfán, E. (2012). *Producción de pasturas cultivadas y manejo de pastos naturales alto andinos*. Convenio INIA- Gobierno Regional de Moquegua. Ed. Industria gráfica El Alva. Arequipa- Perú.
- Fernández Baca, S. (1991). Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos

sudamericanos. Oficina Regional de Producción Animal. Santiago de Chile.

- Fernández Baca, S. (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en el Perú. Proyecto de cooperación técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericano en la region andina. TLP/RLA/2914. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO).
- Gonzáles, M., Rivera, M., Gonzáles, H. (2018). Los surfactants: una alternativa para la descontaminación de suelos con hidrocarburos. Una revision. Vol: 6.
- Gutiérrez, W. Vilca, F. y Calsín, B. (2015). Prevalencia e histopatología de *Sarcocystis lamacanis* en tejido cardiaco de alpacas beneficiadas en el Camal Municipal de Nuñoa. VII Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos. Puno-Perú.
- INEI (2014), CENAGRO 2012, Base de datos REDATAM.
- INIA, Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) (2007). TECHNOSERVE. Informe Técnico de avance I Fase Proyecto Aprovechamiento del Medio Ambiente Rural. Estación Experimental Illpa-Puno.
- Kato, S. y Bowman, D.D. (2002). Using flow cytometry to determine the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts extracted from spiked environmental samples in chambers. *Parasitol. Res.* 88. 326-331. <https://doi.org/10.1007/s004360100504>
- Kuczynska, E. y Shelton, D. (1999). Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts from calf feces, manures, and soils. *Appl Environ Microbiol.* 65(7)2820-6. <https://doi.org/10.1128/aem.65.7.2820-2826.1999>
- Labome. (2018). Detergentes: Triton x-100, Tween-20, Tween-80. Syntom Research. Princetin New Jersey. United State.
- Langham, N. y Charleston, W. (1990). An investigation of the potential for spread of *Sarcocystis* spp. and other parasites by fecal cats. *New Zealand Journal of Agricultural Research.* Vol. 33:429-435.URL: <https://doi.org/10.1080/00288233.1990.10428439>
- Lassen, B. y Lepik, T. (2014). Isolation of Eimeria oocysts from soil samples: A simple method described in detail. *Journal of Agricultural Science* 2\*XXV: 77-81. URL:

<http://agrt.emu.ee/pdf/>

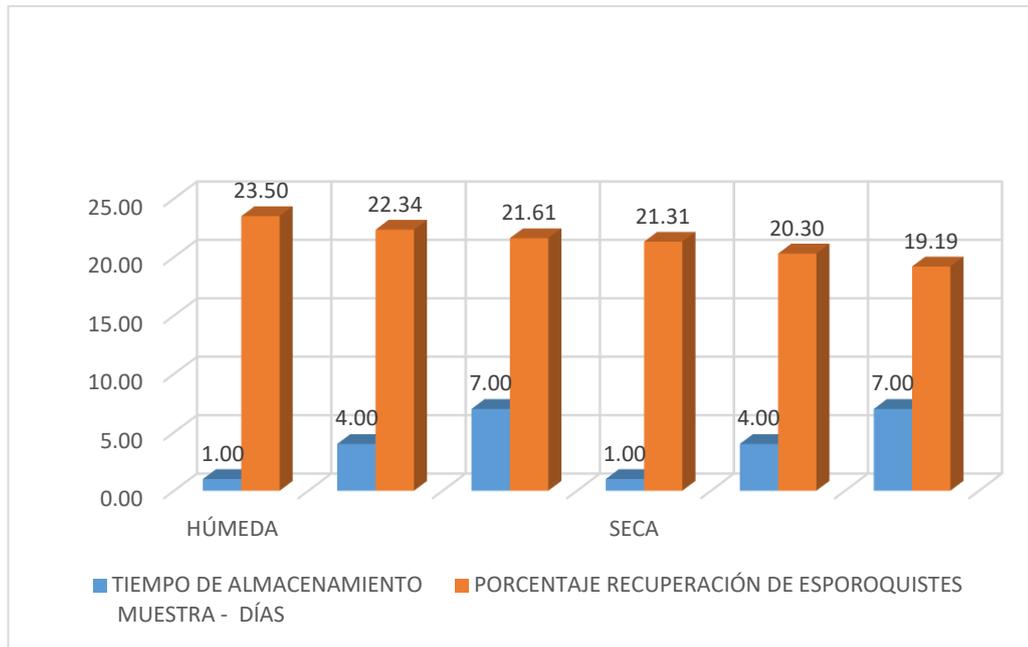
- Leguía, Guillermo y Casas, E. (1999). Enfermedades Parasitarias y Atlas Parasitológico de Camélidos Sudamericanos. Ed. de Mar. Lima Perú. 190 pp.
- Leguía, G. y Santiago, B. (2018). Prevalencia de Sarcocystis en alpacas (*Glama pacos*) y en perros pastores de una ganadería de la Sierra Central del Perú Rvst. Biotempo -Lima. 15(1):59-62. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v15i1.1696>
- Lélu, M., Fromont, E.G., Aubert, D., Richaume, A., Afonso, E., Dupuis, E., Gotteland, C., Marnef, F., Poulle, M.L., Dumetre, A., Thulliez, P., Dardé, M.L. y Villena, I. (2011). Development of sensitive method for *Toxoplasma gondii* oocyst extraction in soil. Veterinary Parasitology. 183:59-67. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304401711004468> [Villena I. et al. \(2011\). Development of sensitive method for Toxoplasma gondii oocyst extraction in soil. Veterinary Parasitology. 183:59-67. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304401711004468](#)
- Lélu, M., Villena, I., Dardé, M.L., Aubert, D., Geers, R., Dupuis, E., Marnef, F., Poulle, M.L., Gotteland, C., Dumetre, A. y Fromont, E.G. (2012). Quantitative estimation of the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(15): 5127-5132. <https://doi.org/10.1128/AEM.00246-12>
- Lucas, J. (2012). Sarcocystis spp en el Perú. Peruvian Journal of Parasitology. Fac. Med. Vet. U.N.M.S.M. Lima. IVITA. 20(2):64-73. [https://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/pjp/v20\\_n2/pdf/a03v20n2.pdf](https://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/pjp/v20_n2/pdf/a03v20n2.pdf)
- Mamani-Linares, L.W. y Gallo, C.B. (2014). Meat quality proximatw composition and muscle fatty acid profile of young llamas (*Lama glama*) supplemented with hay or concentrate during the dry season. *Meat Sci*. 96:394-399.
- Matsou, J., Kimura, D., Rai, S.K. y Uga, S. (2004). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts from soil by modified sucrose flotation and PCR methods. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health*. 35.2:270-274. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15691123>
- Mawdsley, J.L., Brooks, A.E., Merry, R.J. (1992). Movement of the protozoan pathogen *Cryptosporidium parvum* through three contrasting soil types. *Biol Fertil Soils*. 21:30-36. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301514352>

- Mostajo, W. (1983). Sarcocistiosis en alpacas beneficiadas en el Camal Municipal de Santa Rosa Melgar- Puno. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Univ. Nac. Altp. Puno. 68 pp.
- Oscanda, L. y Bustinza, V. (1987). Inventario de la Comunidad Vegetal, determinación de la condición, mapeo de sitios y estimación de la soportabilidad ganadera en el Centro Experimental de la Universidad Nacional del Altiplano. La Raya – Puno.
- Ramirez, N.E y Sreevatsan, S. (2006). Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples. *Vet. Parasitol.* 136, 201-213. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.023>
- Rojas, M.; I. Lobato; M. Montalvo. (1993). Fauna parasitaria de camélidos sudamericanos y ovinos en pequeños rebaños mixtos familiares. *Rev. Pec. Inv. (IVITA)* 6: 22-27.
- Rojas, M. (1990). *Parasitismo de los rumiantes domésticos*. Terapia, prevención y modelos para su aprendizaje. Ed. Maijosa. Lima – Perú.
- Romero, S., Carletti, T., Franco, C.D., Moré, G., Schnittger, L., Florin-Christensen, M. (2017). La seropositividad a *Sarcocystis* de las llamas se relaciona con las prácticas de reproducción. *Vet Parasitol.* 2017; 10: 65–70.
- Saeed, M., Rashed, M., Vaughan, J. and Jabbar, A. (2018). Sarcocystosis in South American camelids. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-2748-1>
- SENAMHI: Servicio Nacional de Meteorología e hidrología. (2009). Oficina Regional Puno.
- Siguayro, R. (2008). *Evaluación agrostológica y capacidad receptiva estacional en bofedales de puna seca y húmeda del altiplano de Puno*. Tesis de Ingeniería agronómica. Universidad Nacional del Altiplano-Puno.
- Suresh, P. y Jerold, R. (1996). Comparative evaluation of several techniques for purification of *Cryptosporidium parvum* oocysts from rat feces. *Journal of Clinical Microbiology.* 34:38-40 DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.34.1.38->

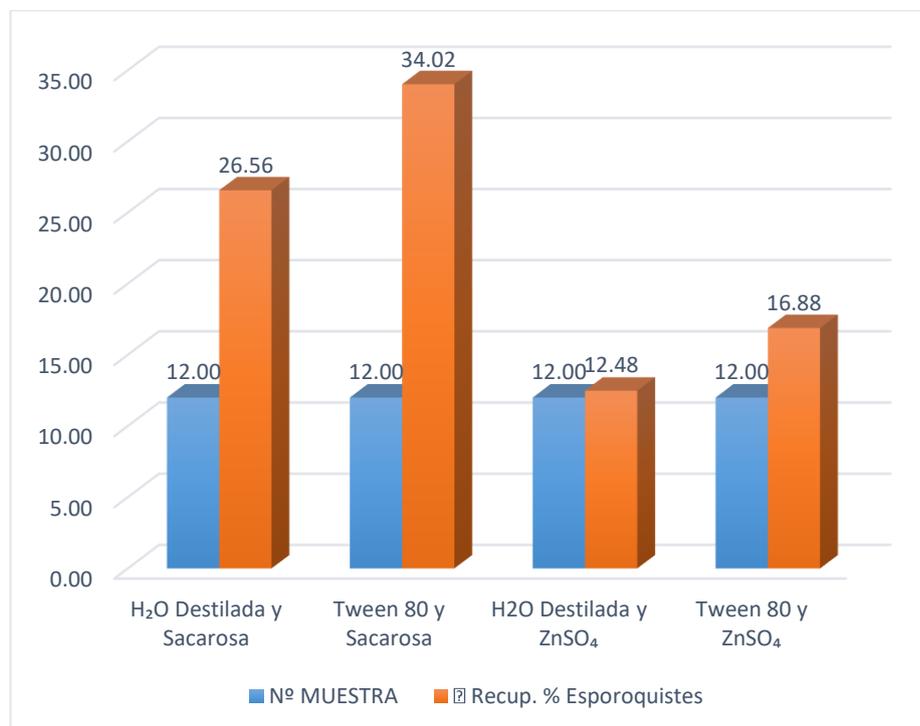
40.1996

- Tenter, A. M. (1995). Current research on Sarcocystis species of domestic animals. *Int. J. Parasitol.*, 25: 1311- 1330. URL: [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(95\)00068-D](https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00068-D)
- Vilca, M. (1991). Producción, tecnología e higiene de la carne. En: Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. FAO. Santiago, Chile. 429.
- Villena, I., Aubert, D., Gomis, P., Ferte, H., Ingland, J.C., Denis-Bistaux, H., Dondon, J.M., Pisano, E., Ortis, N. y Piñon, J.M. (2004). Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Appl. Environ Microbiology*. 70, 4035-4039 DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4035-4039.2004>
- Walker, M.J., Montemagno, C., Bryant, J.C., Ghiorse, W. (1998). Method detection limits of PCR and an immunofluorescence assay for *Cryptosporidium parvum* in soil. *Appl Environ Microbiol*. 64:2281-2283.
- White, S. (1998) Sarcocystosis: A Parasite Endemic to Andean Alpacas. *The Alpaca Registry Journal*. 3.1.
- Zilberman, A., Zimmels, Y., Starosvetsky, J., Zuckerman, U. y Armon, R. (2009). A two-phase separation method for recovery of *Cryptosporidium* oocysts from soil samples. *Water Air Soil Pollut*. 203:325-334.
- Zorogastúa, P., Quiroz, P. y Garatuza, P. (2012). Dinámica de los bofedales en el altiplano peruano boliviano. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*. 8(2):63-75.

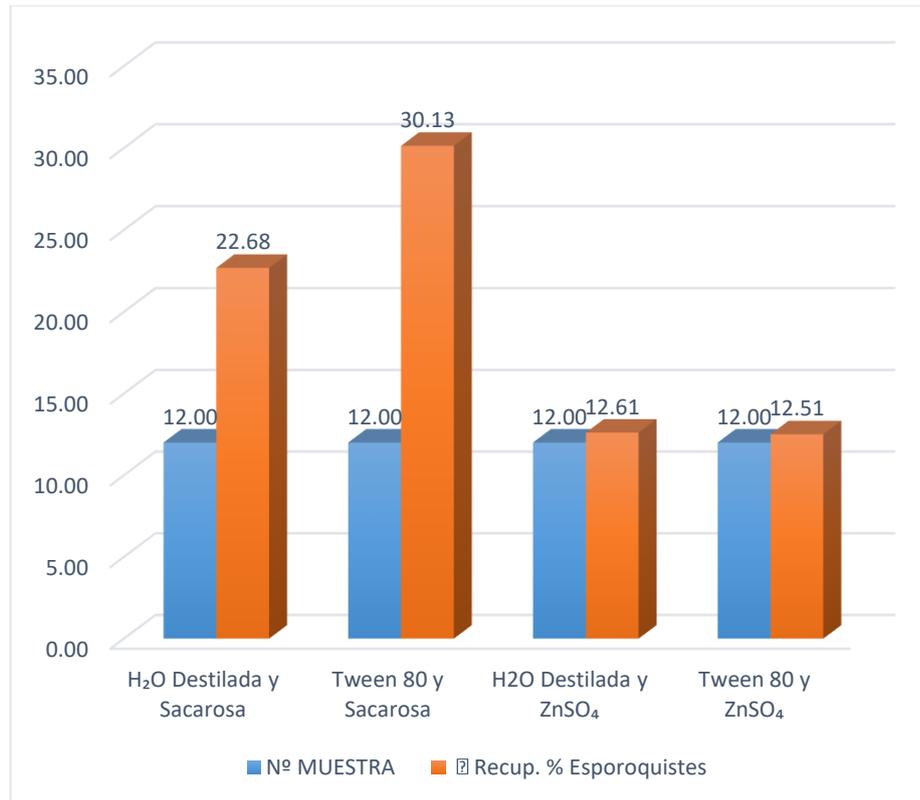
## ANEXOS



Anexo 1. Figura porcentaje de recuperación de esporoquistes de *Sarcocystis* en pastizales en función al tiempo de almacenamiento de la muestra.



Anexo 2. Figura porcentaje de recuperación de esporoquistes de *Sarcocystis* spp en función a la solución de dispersión y flotación zona húmeda



Anexo 3. Figura porcentaje de recuperación de esporoquistes de *Sarcocystis* spp en función a la solución de dispersión y flotación zona seca.

Anexo 4. Porcentaje de recuperación de esporoquistes de sarcocystis en pastizales de zona húmeda y seca en función al tiempo de almacenamiento de las muestras y soluciones utilizadas.

<sup>o</sup>	Zona	Solución de dispersión con solución flotación	Tiempo de almacenamiento (días)	% recuperación de esporoquistes
01	Húmeda	1	1	28.2
02	Húmeda	1	1	25.4
03	Húmeda	1	1	27.1
04	Húmeda	1	1	26.7
05	Húmeda	1	4	27
06	Húmeda	1	4	26.3
07	Húmeda	1	4	25
08	Húmeda	1	4	24.2
09	Húmeda	1	7	27.6
10	Húmeda	1	7	26.7
11	Húmeda	1	7	28.3
12	Húmeda	1	7	26.2
13	Húmeda	2	1	35.7
14	Húmeda	2	1	32.8
15	Húmeda	2	1	37.5
16	Húmeda	2	1	35
17	Húmeda	2	4	35.6
18	Húmeda	2	4	32.8
19	Húmeda	2	4	34.7



---

20	Húmeda	2	4	30.9
21	Húmeda	2	7	33.2
22	Húmeda	2	7	34.5
23	Húmeda	2	7	35
24	Húmeda	2	7	30.5
25	Húmeda	3	1	15.8
26	Húmeda	3	1	13.2
27	Húmeda	3	1	15.7
28	Húmeda	3	1	10.2
29	Húmeda	3	4	12.9
30	Húmeda	3	4	13.2
31	Húmeda	3	4	15.3
32	Húmeda	3	4	10.8
33	Húmeda	3	7	9.4
34	Húmeda	3	7	12.5
35	Húmeda	3	7	10.6
36	Húmeda	3	7	10.2
37	Húmeda	4	1	18.8
38	Húmeda	4	1	18
39	Húmeda	4	1	15.9
40	Húmeda	4	1	20
41	Húmeda	4	4	15.9
42	Húmeda	4	4	16.4
43	Húmeda	4	4	18.6
44	Húmeda	4	4	17.9
45	Húmeda	4	7	13.9

---



---

46	Húmeda	4	7	15.9
47	Húmeda	4	7	15.1
48	Húmeda	4	7	16.2
49	Seca	1	1	30.2
50	Seca	1	1	23.1
51	Seca	1	1	21.3
52	Seca	1	1	19.2
53	Seca	1	4	28.6
54	Seca	1	4	25.4
55	Seca	1	4	20.1
56	Seca	1	4	20.6
57	Seca	1	7	20
58	Seca	1	7	22
59	Seca	1	7	21.7
60	Seca	1	7	20
61	Seca	2	1	32.2
62	Seca	2	1	35.6
63	Seca	2	1	29.8
64	Seca	2	1	25
65	Seca	2	4	32.2
66	Seca	2	4	30.7
67	Seca	2	4	29.2
68	Seca	2	4	25.2
69	Seca	2	7	32.5
70	Seca	2	7	31
71	Seca	2	7	28

---



---

72	Seca	2	7	30.1
73	Seca	3	1	19.8
74	Seca	3	1	15
75	Seca	3	1	10.2
76	Seca	3	1	9.7
77	Seca	3	4	12.6
78	Seca	3	4	14.3
79	Seca	3	4	11
80	Seca	3	4	13.2
81	Seca	3	7	10.5
82	Seca	3	7	12
83	Seca	3	7	9.6
84	Seca	3	7	13.4
85	Seca	4	1	20.3
86	Seca	4	1	15.4
87	Seca	4	1	16.2
88	Seca	4	1	18
89	Seca	4	4	15.2
90	Seca	4	4	17
91	Seca	4	4	15.2
92	Seca	4	4	14.3
93	Seca	4	7	12
94	Seca	4	7	14.9
95	Seca	4	7	15
96	Seca	4	7	14.3

---



**Leyenda:**

**N** : Número de muestra.

**Zona** : Pastura de Zona Húmeda (Bofedal)

Pastura de Zona Seca.

**Tiempo:** Almacenamiento muestra (1, 4 y 7 días)

Solución de dispersión con solución de Flotación.

**1:** Agua destilada y sacarosa.

**2:** Tween 80 y sacarosa.

**3:** Agua destilada y sulfato de Zinc.

**4:** Tween 80 y Sulfato de Zinc.

Anexo 5. Porcentaje de recuperación de esporoquistes de zona seca en función al tiempo de almacenamiento de la muestra y soluciones utilizadas

<b>.Zona</b>		<b>Seca</b>		
<b>Sol. De flotación + Sol. de dispersión</b>	<b>Sacarosa + Agua destilada</b>	<b>Sacarosa + Tween 80</b>	<b>Sulfato de Zinc + Agua Destilada</b>	<b>Sulfato de Zinc + Tween 80</b>
<b>Tiempo de almacenamiento Muestra</b>	<b>Sub muestras</b>	<b>Sub muestras</b>	<b>Sub muestras</b>	<b>Sub muestras</b>
<b>1 DÍA</b>	30.2	32.2	19.8	20.3
	23.1	35.6	15.0	15.4
	21.3	29.8	10.2	16.2
	19.2	25.0	9.7	18.0
	$\hat{X} = 23.5$	$\hat{X} = 30.7$	$\hat{X} = 13.7$	$\hat{X} = 17.5$
<b>4 DÍAS</b>	28.6	32.2	12.6	15.2
	25.4	30.7	14.3	17.0
	20.1	29.2	11.0	15.2
	20.6	25.2	13.2	14.3
	$\hat{X} = 23.7$	$\hat{X} = 29.3$	$\hat{X} = 12.8$	$\hat{X} = 15.4$
<b>7 DÍAS</b>	20.0	32.5	10.5	12.0
	22.0	31.0	12.0	14.9
	21.7	28.0	9.6	15.0
	20.0	30.1	13.4	14.3
	$\hat{X} = 20.9$	$\hat{X} = 30.4$	$\hat{X} = 11.4$	$\hat{X} = 14.1$

Anexo 6. Porcentaje de recuperación de esporoquistes de zona húmeda en función al tiempo de almacenamiento de la muestra y soluciones utilizadas.

<b>Zona</b>		<b>Seca</b>		
<b>Sol. De flotación + Sol. de dispersión</b>	<b>Sacarosa + Agua destilada</b>	<b>Sacarosa + Tween 80</b>	<b>Sulfato de Zinc + Agua Destilada</b>	<b>Sulfato de Zinc + Tween 80</b>
<b>Tiempo de almacenamiento Muestra</b>	<b>Sub muestras</b>	<b>Sub muestras</b>	<b>Sub muestras</b>	<b>Sub muestras</b>
<b>1 DÍA</b>	28.2	35.7	15.8	18.8
	25.4	32.8	13.2	18.0
	27.1	37.5	15.7	15.9
	26.7	35.0	10.2	20.0
	$\hat{X} = 26.8$	$\hat{X} = 35.3$	$\hat{X} = 13.7$	$\hat{X} = 18.2$
<b>4 DÍAS</b>	27.0	35.6	12.9	15.9
	26.3	32.8	13.2	16.4
	25.0	34.7	15.3	18.6
	24.2	30.9	10.8	17.9
	$\hat{X} = 25.6$	$\hat{X} = 33.5$	$\hat{X} = 13.1$	$\hat{X} = 17.2$
<b>7 DÍAS</b>	27.6	33.2	9.4	13.9
	26.7	34.5	12.5	15.9
	28.3	35.0	10.6	15.1
	26.2	30.5	10.2	16.2
	$\hat{X} = 27.2$	$\hat{X} = 33.3$	$\hat{X} = 10.7$	$\hat{X} = 15.3$

Anexo 7. Porcentaje de recuperación de esporoquistes de pastizales en función a la solución de flotación y dispersión.

<b>Zona</b>	<b>Humeda</b>		<b>Seca</b>	
<b>Concentración</b>	<b>10<sup>3</sup></b>		<b>10<sup>3</sup></b>	
<b>Esporoquistes/Muestra</b>				
Sol. De flotación + Sol. De dispersión.	Número de Muestras	Promedio % Recuperación	Número de Muestras	Promedio % Recuperación
Sacarosa + Agua Destilada	12	26.5	12	22.7
Sacarosa + Tween 80	12	34.0	12	30.1
Sulfato de Zinc + Agua Destilada	12	12.5	12	12.6
Sulfato de Zinc + Tween 80	12	16.9	12	15.6
<b>TOTAL</b>	<b>48</b>		<b>48</b>	

Anexo 8. Porcentaje de recuperación de esporoquistes en pastizales en función a la solución de dispersión y tiempo de conservación de muestras, cuando se utiliza el método de flotación con sacarosa.

Zona		Humeda			Seca	
Concentración		$10^3$			$10^3$	
Esporoquistes por Muestra						
Sol. De Dispersión	N° días almacenamiento muestra	N° de Muestras	Promedio % Recup.	N° días de almacenamiento muestra	N° de Muestras	Promedio % Recup.
Agua Destilada	1	4	26.8	1	4	23.5
	4	4	25.6	4	4	23.7
	7	4	27.2	7	4	20.9
Tween 80	1	4	35.3	1	4	30.7
	4	4	33.5	4	4	29.3
	7	4	33.3	7	4	31.4

Anexo 9. Porcentaje de recuperación de esporoquistes en pastizales en función a la solución de dispersión y tiempo de conservación de muestras, cuando se utiliza el método de flotación con sulfato de zinc.

Zona		Humeda			Seca	
Concentración		10 <sup>3</sup>			10 <sup>3</sup>	
Esporoquistes por Muestra						
Sol. De Dispersión	Nº días almacenamiento muestra	Nº de Muestras	Promedio % Recuperación	Nº días almacenamiento muestra	Nº de Muestras	Promedio % Recuperación
Agua Destilada	1	4	13.7	1	4	13.7
	4	4	13.1	4	4	12.8
	7	4	10.7	7	4	11.5
Tween 80	1	4	18.2	1	4	17.57
	4	4	17.2	4	4	15.4
	7	4	15.3	7	4	14.1

Anexo 10. Medidas de resumen, porcentaje de recuperación de esporoquistes según zona.

Zona	n	Promedio	D.E.	C.V.	Min	Max
Húmeda	48	22,49	8,66	38,52	9,40	37,50
Seca	48	20,27	7,40	36,54	9,60	35,60

n: Numero de muestras, D.E.: Desviación estándar, C.V.: Coeficiente de variación, Min: Mínimo, Max: Máximo.

Anexo 11. Medidas de resumen, porcentaje de recuperación de esporoquistes según solución

<b>Solución</b>	<b>n</b>	<b>Promedio</b>	<b>D.E.</b>	<b>C.V.</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
1	24	24,62	3,28	13,31	19,20	30,20
2	24	32,07	3,22	10,03	25,00	37,50
3	24	12,55	2,54	20,28	9,40	19,80
4	24	16,27	1,99	12,24	12,00	20,30

n: Numero de muestras, D.E.: Desviación estándar, C.V.: Coeficiente de variación, Min: Mínimo, Max: Máximo.

Anexo 12. Medidas de resumen, porcentaje de recuperación de esporoquistes según tiempo

<b>Tiempo</b>	<b>n</b>	<b>Promedio</b>	<b>D.E.</b>	<b>C.V.</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
1	32	22,41	8,12	36,25	9,70	37,50
4	32	21,32	7,70	36,11	10,80	35,60
7	32	20,40	8,56	41,98	9,40	35,00

n: Numero de muestras, D.E.: Desviación estándar, C.V.: Coeficiente de variación, Min: Mínimo, Max: Máximo.

Anexo 13. Efecto de la zona sobre el porcentaje de recuperación de esporoquistes.

<b>Zona</b>	<b>Porcentaje de recuperación de esporoquistes</b>	<b>CV, %</b>
Seca	20,27 <sup>a</sup>	36,54
Húmeda	22,49 <sup>b</sup>	38,54

---

Probabilidad	0,001
--------------	-------

---

Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ )

Anexo 14. Efecto de la solución utilizada sobre el porcentaje de recuperación de esporoquistes.

---

Solución	Porcentaje de recuperación de esporoquistes	CV, %
1	24,62 <sup>c</sup>	13,31
2	32,07 <sup>d</sup>	10,03
3	12,55 <sup>a</sup>	20,28
4	16,27 <sup>b</sup>	12,24

---

Probabilidad	0,001
--------------	-------

---

Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes  
( $p < 0,05$ )

Anexo 15. Efecto del tiempo en días sobre el porcentaje de recuperación de esporoquistes.

---

Tiempo	Porcentaje de recuperación de esporoquistes	CV, %
1	22,41 <sup>b</sup>	36,25
4	21,32 <sup>ab</sup>	36,11
7	20,40 <sup>a</sup>	41,98

---

Probabilidad	0,004
--------------	-------

---

Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes  
( $p < 0,05$ )

Anexo 16. Efecto de la zona y solución utilizada sobre el porcentaje de recuperación de esporoquistes

Zona	Solución	Porcentaje de recuperación de esporoquistes	CV, %
Seca	1	22,68 <sup>c</sup>	15,73
	2	30,13 <sup>e</sup>	10,07
	3	12,61 <sup>a</sup>	22,94
	4	12,65 <sup>b</sup>	13,30
Humeda	1	26,56 <sup>d</sup>	4,66
	2	34,02 <sup>f</sup>	6,00
	3	12,48 <sup>a</sup>	18,20
	4	16,88 <sup>b</sup>	10,46
Probabilidad		0,006	

Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ )

Anexo 17. Efecto de la zona y tiempo sobre el porcentaje de recuperación de esporoquistes

Zona	Tiempo	Porcentaje de recuperación de esporoquistes	CV, %
Seca	1	21,31	15,73
	2	20,30	10,07
	3	19,19	22,94
Humeda	1	23,50	4,66
	2	22,34	6,00
	3	21,61	18,20

---

Probabilidad

0,996

---

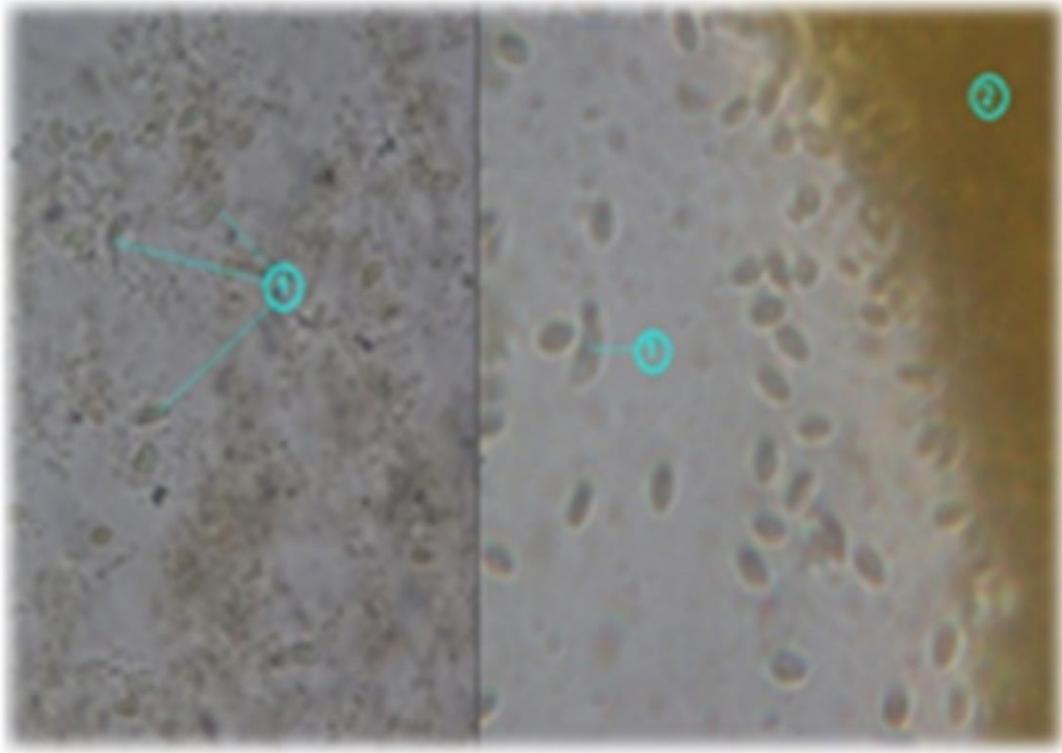
Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ )



Anexo 18. Corazón de alpaca para evaluación microscópica.



Anexo 19. *Sarcocystis lamacanis* en tejido cardíaco de alpaca.



Anexo 20. Bradizoitos de *Sarcocystis lamacanis*



Anexo 21. Esporoquistes de *Sarcocystis lamacanis* en material fecal de cachorro infectado.



Anexo 22. Tejido muscular estriado de alpaca con quistes macroscópicos (*Sarcocystis aucheniae*)



Anexo 23. Infección de cachorro con quistes macroscópicos de *Sarcocystis*



Anexo 24. Infección de cachorro con macroquistes de *Sarcocystis*



Anexo 25. Cuantificación de esporoquistes por el método de Mac Master



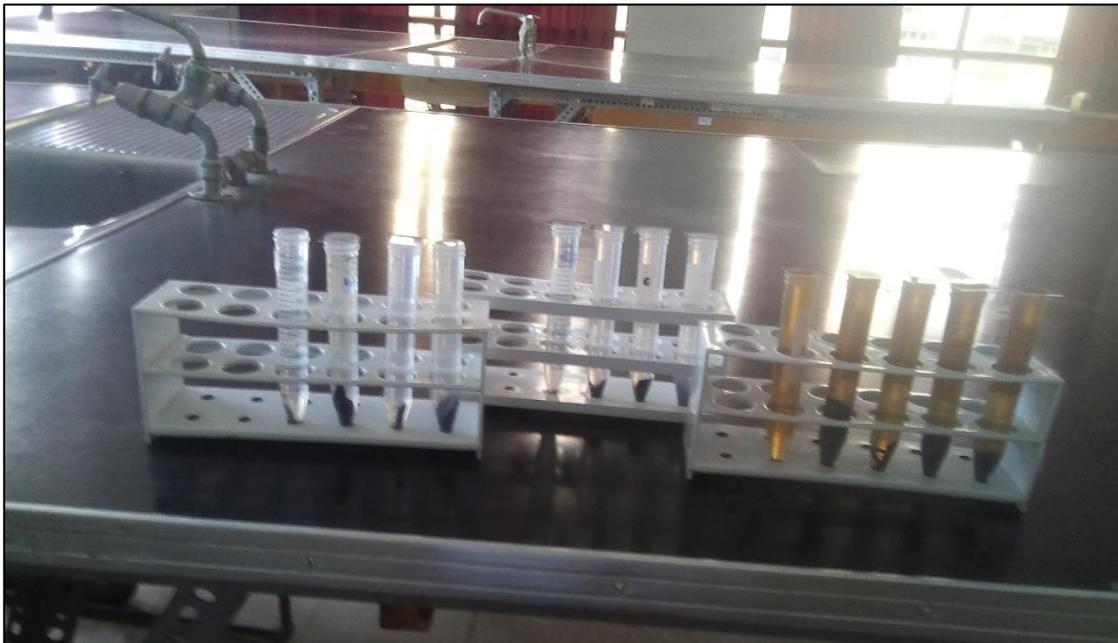
Anexo 26. Reactivos utilizados para métodos de diagnóstico.



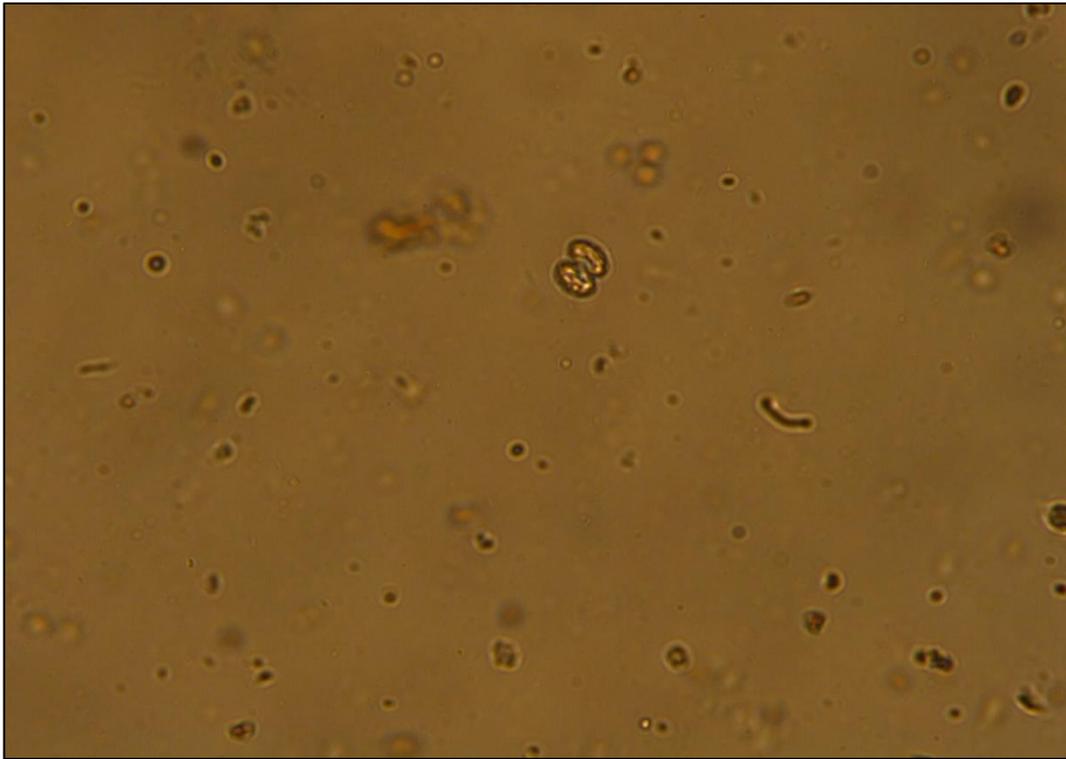
Anexo 27. Muestras en proceso de sedimentación.



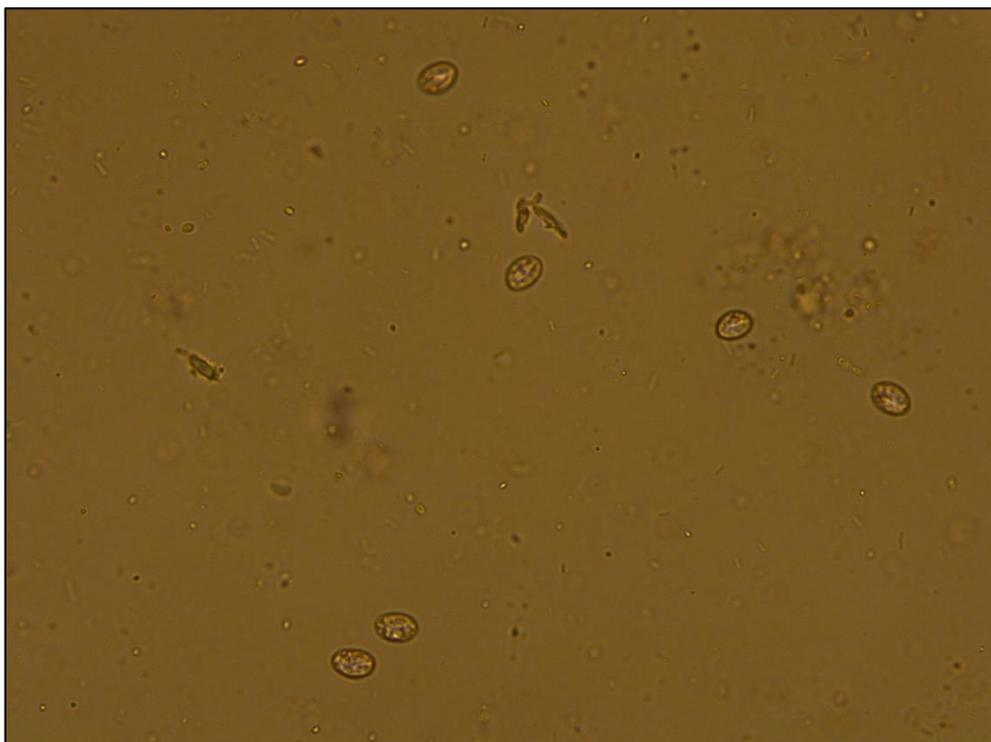
Anexo 28. Flotación de muestras con solución de sacarosa



Anexo 29. Flotación de muestras con solución de sacarosa y sulfato de zinc.



Anexo 30. Ooquistes de *Sarcocystis* spp de muestras de pastizal con método de flotación (Sacarosa y Tween 80).



Anexo 31. Esporoquistes de *Sarcocystis* spp de pastizal con método de flotación (Sacarosa y Tween 80).



### DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo FELICIANA VILCA DE DÍAZ,  
identificado con DNI 02395515 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional,  Programa de Segunda Especialidad,  Programa de Maestría o Doctorado

MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL MENCIÓN SALUD ANIMAL

informo que he elaborado el/la  Tesis o  Trabajo de Investigación denominada:

"DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE  
ESPOROQUISTES DE SARCOCYSTIS spp EN PASTIZALES DE  
CAMELIDOS SUDAMERICANOS"

Es un tema original.

Declaro que el presente trabajo de tesis es elaborado por mi persona y **no existe plagio/copia** de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por persona natural o jurídica alguna ante instituciones académicas, profesionales, de investigación o similares, en el país o en el extranjero.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no asumiré como tuyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o Internet.

Asimismo, ratifico que soy plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asumo la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento, así como de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a las disposiciones legales vigentes y a las sanciones correspondientes de igual forma me someto a las sanciones establecidas en las Directivas y otras normas internas, así como las que me alcancen del Código Civil y Normas Legales conexas por el incumplimiento del presente compromiso

Puno 16 de mayo del 2023

FIRMA (obligatoria)



Huella



Universidad Nacional  
del Altiplano Puno



Vicerrectorado  
de Investigación



Repositorio  
Institucional

### AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Por el presente documento, Yo FELICIANA VILCA DE DÍAZ identificado con DNI 02395515 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional,  Programa de Segunda Especialidad,  Programa de Maestría o Doctorado

MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL MENCIÓN SALUD ANIMAL  
informo que he elaborado el/la  Tesis o  Trabajo de Investigación denominada:

"DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE ESPOROQUISTES DE SARCOCYSTIS spp EN PASTIZALES DE CAMELIDOS SUDAMERICANOS"

para la obtención de  Grado,  Título Profesional o  Segunda Especialidad.

Por medio del presente documento, afirmo y garantizo ser el legítimo, único y exclusivo titular de todos los derechos de propiedad intelectual sobre los documentos arriba mencionados, las obras, los contenidos, los productos y/o las creaciones en general (en adelante, los "Contenidos") que serán incluidos en el repositorio institucional de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

También, doy seguridad de que los contenidos entregados se encuentran libres de toda contraseña, restricción o medida tecnológica de protección, con la finalidad de permitir que se puedan leer, descargar, reproducir, distribuir, imprimir, buscar y enlazar los textos completos, sin limitación alguna.

Autorizo a la Universidad Nacional del Altiplano de Puno a publicar los Contenidos en el Repositorio Institucional y, en consecuencia, en el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto, sobre la base de lo establecido en la Ley N° 30035, sus normas reglamentarias, modificatorias, sustitutorias y conexas, y de acuerdo con las políticas de acceso abierto que la Universidad aplique en relación con sus Repositorios Institucionales. Autorizo expresamente toda consulta y uso de los Contenidos, por parte de cualquier persona, por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales de autor y derechos conexos, a título gratuito y a nivel mundial.

En consecuencia, la Universidad tendrá la posibilidad de divulgar y difundir los Contenidos, de manera total o parcial, sin limitación alguna y sin derecho a pago de contraprestación, remuneración ni regalía alguna a favor mío; en los medios, canales y plataformas que la Universidad y/o el Estado de la República del Perú determinen, a nivel mundial, sin restricción geográfica alguna y de manera indefinida, pudiendo crear y/o extraer los metadatos sobre los Contenidos, e incluir los Contenidos en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

Autorizo que los Contenidos sean puestos a disposición del público a través de la siguiente licencia:

Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Para ver una copia de esta licencia, visita: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

En señal de conformidad, suscribo el presente documento.

Puno 16 de mayo del 2023

FIRMA (obligatoria)



Huella