

**DETERMINACIÓN DE LA ZARIGÜEYA (*Didelphis marsupialis*) COMO
POSIBLE HOSPEDADOR DEFINITIVO DEL *SARCOCYSTIS SP*, AGENTE
ETIOLÓGICO DE LA MIELOENCEFALITIS PROTOZOARIA EQUINA,
MEDIANTE ANÁLISIS DE LABORATORIO EN MUESTRAS OBTENIDAS EN EL
ÁREA RURAL DEL MUNICIPIO DE TUMACO, VEREDA VUELTA LARGA,
DEPARTAMENTO DE NARIÑO**

**ESTEBAN EDUARDO CADENA VINUEZA
ERIKA TATIANA LÓPEZ**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
PASTO - COLOMBIA
2005**

**DETERMINACIÓN DE LA ZARIGÜEYA (*Didelphis marsupialis*) COMO
POSIBLE HOSPEDADOR DEFINITIVO DEL *SARCOCYSTIS SP*, AGENTE
ETIOLÓGICO DE LA MIELOENCEFALITIS PROTOZOARIA EQUINA,
MEDIANTE ANÁLISIS DE LABORATORIO EN MUESTRAS OBTENIDAS EN EL
ÁREA RURAL DEL MUNICIPIO DE TUMACO, VEREDA VUELTA LARGA,
DEPARTAMENTO DE NARIÑO**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Médico Veterinario**

**Presidente:
KATIA LUZ ANDREA BENAVIDES ROMO
Médica Veterinaria**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
PASTO - COLOMBIA
2005**

“ Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son de responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1ro. Del acuerdo No. 324 de Octubre 11 de 1966, emanado del honorable consejo directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Firma del Presidente

Firma del Jurado

Firma del Jurado

San Juan de Pasto, 09 de noviembre de 2005

A Dios, el que siempre está conmigo y me ha dado lo mejor: mi hijo Santiago, mi familia y Juan Pablo.

Erika Tatiana López.

A mis padres Eduardo Cadena y Lidia Vinueza, quienes me brindaron la oportunidad de estudiar esta grandiosa carrera.

Esteban Cadena Vinueza.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

Doctor Darío Alejandro Cedeño Quevedo, quién fue el gestor para el desarrollo de este trabajo.

A la Fundación Colombiana de Estudios de Parásitos FUNCEP, en especial a su director científico Dr. José Luis Azumendi, por el apoyo que nos brindó mediante sus profundos conocimientos sobre el tema y la realización y financiación de los análisis de laboratorio.

A la Doctora Katia Benavides Romo por habernos apoyado y guiado en muchas ocasiones.

A la empresa Astorga S.A. quién nos brindo su apoyo en todo momento.

Al doctor Luis Fernando Cortes por el apoyo recibido.

CONTENIDO

| | Pág. |
|---|------|
| RESUMEN | |
| INTRODUCCIÓN | 20 |
| 1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA | 21 |
| 2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA | 24 |
| 3. OBJETIVOS | 25 |
| 3.1 Objetivo General | 25 |
| 3.2 Objetivos específicos | 25 |
| 4. MARCO TEÓRICO | 26 |
| 4.1 ANTECEDENTES | 26 |
| 4.2 SARCOCYSTIS | 26 |
| 4.2.1 Historia del <i>sarcocystis</i> | 27 |
| 4.2.2 Clasificación taxonómica | 29 |
| 4.2.3 Ciclo de vida | 30 |
| 4.2.4 Transmisión | 35 |
| 4.2.5 Epidemiología | 35 |
| 4.2.6 Patogenia | 37 |
| 4.2.6.1 Sarcosporidiosis | 37 |
| 4.2.6.2 Sarcocystosis | 38 |
| 4.3 ZARIGÜEYA GRIS COMUN (<i>Didelphis marsupialis</i>) | 39 |
| 4.3.1 Descripción física | 40 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3.2 Hábitos alimenticios | 41 |
| 4.3.3 Hábitat | 42 |
| 4.3.4 Reproducción | 42 |
| 4.3.5 Longevidad | 43 |
| 4.3.6 Comportamiento | 43 |
| 4.3.7 Importancia para los seres humanos | 44 |
| 4.4 HALLAZGOS CLÍNICOS Y SINTOMATOLOGÍA DE LA MEP | 45 |
| 4.5 DIAGNOSTICO DE SARCOCYSTIS | 46 |
| 4.5.1 Diagnóstico De Mieloencefalitis Protozoaria Equina (MEP) | 47 |
| 5. DISEÑO METODOLÓGICO | 49 |
| 5.1 POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO | 49 |
| 5.2 ETAPAS DEL ESTUDIO | 49 |
| 5.2.1 Método de captura | 51 |
| 5.2.2 Manejo de las zarigüeyas | 52 |
| 5.2.2.1 Recomendaciones de manejo | 52 |
| 5.2.3 Toma de muestras | 53 |
| 5.2.3.1 Obtención de sangre | 53 |
| 5.2.3.2 Obtención de materia fecal | 54 |
| 5.2.3.3 Obtención de tejidos para Histopatología | 54 |
| 5.2.4 Envío de muestras | 54 |
| 5.3 TÉCNICAS DE LABORATORIO | 55 |
| 5.3.1 Examen coprológico | 55 |
| 5.3.1.1 Técnica de flotación | 55 |

| | |
|---|-----------|
| 5.3.1.2 Inmunofluorescencia directa | 55 |
| 5.3.2 Pruebas hematológicas | 56 |
| 5.3.2.1 Cuadro hemático | 56 |
| 5.3.2.2 Titulación de toxina | 56 |
| 5.3.3 Histopatología | 57 |
| 5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 57 |
| 5.4.1 Identificación del <i>sarcocystis</i> en materia fecal mediante prueba de Inmunofluorescencia directa | 57 |
| 5.4.2 Pruebas hematológicas | 57 |
| 5.4.2.1 Cuadro hemático | 57 |
| 5.4.2.2 Titulación de toxina | 58 |
| 5.4.2.3 Relación toxina sarcocystina con hemogramas | 58 |
| 5.4.3 Histopatología | 58 |
| 6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 59 |
| 6.1 IDENTIFICACIÓN DE SARCOCYSTIS EN MATERIA FECAL | 59 |
| 6.2 CUADRO HEMATICO | 62 |
| 6.3 TITULACION DE TOXINA (SARCOCYSTINA) | 65 |
| 6.4 RELACIÓN TOXINA HEMOGRAMAS | 67 |
| 6.5 HISTOPATOLOGÍA | 70 |
| 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 74 |
| BIBLIOGRAFÍA | 77 |
| ANEXOS | 80 |

LISTA DE CUADROS

| | Pág. |
|--|------|
| Cuadro 1. Reportes de laboratorio. | 22 |
| Cuadro 2. Clasificación taxonómica de la zarigüeya gris común <i>Didelphis marsupialis</i> . | 40 |
| Cuadro 3. Resultados obtenidos en el muestreo de zarigüeyas cuadro hemático y titulación de sarcocystina. | 63 |
| Cuadro 4. Valores hemáticos de referencia <i>Didelphis virginiana</i> | 64 |
| Cuadro 5. Toxina - recuentos absolutos | 65 |
| Cuadro 6. Titulación de toxina | 67 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1. Ciclo de vida <i>Sarcocystis neurona</i> . | 31 |
| Figura 2. Ooquiste de <i>Sarcocystis</i> contenido de dos esporoquistes | 32 |
| Figura 3. Esporoquiste de <i>sarcocystis</i> con cuatro esporozoitos en su interior. | 32 |
| Figura 4. Sección de lengua mostrando tres quistes de <i>Sarcocystis</i> . | 38 |
| Figura 5. <i>Didelphis marsupialis</i> . | 40 |
| Figura 6. Habitación de la zarigüeya. | 42 |
| Figura 7. Bolsa o marsupio. | 43 |
| Figura 8. Comportamiento <i>D. marsupialis</i> | 44 |
| Figura 9. Corte histopatológico de duodeno de un canino contaminado con <i>sarcocystis</i> . | 47 |
| Figura 10. Astorga S.A. | 50 |
| Figura 11. Microfotografía de muestra fecal en zarigüeyas. | 60 |
| Figura 12. Ooquistes de <i>sarcocystis</i> en zarigüeyas muestreadas. | 61 |
| Figura 13. Resultados cuadro hemático de zarigüeyas. | 66 |
| Figura 14. Relación Toxina – Recuento de Glóbulos Rojos en muestras de zarigüeyas. | 68 |
| Figura 15. Relación Toxina- Recuento Absoluto de linfocitos en muestras de zarigüeyas. | 69 |
| Figura 16. Respuesta hemodinámica a la <i>sarcocystina</i> . | 70 |
| Figura 17. Corte histopatológico de pulmón de zarigüeya muestreada. | 71 |
| Figura 18. Corte histopatológico de hígado de zarigüeya muestreada. | 71 |

| | |
|--|----|
| Figura 19. Cortes histopatológicos de intestino de zarigüeyas muestreadas. | 72 |
| Figura 20. Presencia de Sarcocystis en I intestino delgado de Zarigüeyas muestreadas. | 72 |
| Figura 21. Cortes histopatológicos de músculo cardíaco de zarigüeyas muestreadas | 73 |

LISTA DE ANEXOS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Anexo A. Autorización CORPONARIÑO | 81 |
| Anexo B. Mapa Astorga S.A. | 82 |
| Anexo C. Identificación zarigüeya | 83 |
| Anexo D. Formato de toma de muestras | 84 |
| Anexo E. Formato de envío de muestras | 85 |
| Anexo F. Recuento glóbulos rojos Vs. Toxina | 86 |
| Anexo G. Recuento absoluto de linfocitos Vs. Toxina | 87 |

GLOSARIO

Bradizoito: etapa asexual del ciclo de vida del *Sarcocystis*.

Ciclo de vida: vida completa de un protozoo que comprende los ciclos exógenos y endógenos.

Endodiogenia: multiplicación asexual de los protozoos en la que las dos células hijas se forman dentro de la célula progenitora. Se da en *Toxoplasma* y *Sarcocystis sp*,

Endopoliogenia: reproducción asexual de los protozoos en la que la nueva progenia se produce por gemación dentro de la célula madre.

Esporocisto: saco o vesícula que contiene esporas o células reproductoras, oocysto. Envoltura que se forma alrededor de un esporoblasto cuando éste se desarrolla en la espora.

Esporogonia: esporogénea, especialmente la esporulación después de la fertilización.

Esporoquiste: toda estructura que contiene esporas o células reproductoras. Estructura en forma de saco, u oocysto, segregada por el cigoto de ciertos protozoarios antes de la formación de esporozoito.

Esporozoito: producto final de la esporogonia en los esporozoos.

Esquisonte (Meronte): forma de desarrollo por esquizogénesis de un protozoo que presenta alternancia de generaciones.

Esquizogonia: reproducción por esporulación sin fecundación; esporulación asexual.

Gametogonia: reproducción por gametos.

Linfocito B: célula que se genera en la médula ósea, precursora de las células plasmáticas tras una estimulación inmunológica adecuada.

Merogonia: desarrollo de solo una parte de un óvulo.

Merozoito: espora formada de un esquizonte en la reproducción esquizógena de los protozoos.

Métrocito: célula madre.

Mieloencefalitis: Inflamación tanto del cerebro (Encefalitis) como de la médula espinal (Mielitis).

Ooquiste: etapa de resistencia del ciclo vital de los protozoos de la familia eimeriidae. Contiene un cigoto y, bajo condiciones apropiadas, se convierte en un ooquiste infeccioso maduro. Puede permanecer inerte durante largos periodos en condiciones de sequedad.

Sarcocystina: toxina obtenida de protozoos del género sarcosporidia.

Sarcocystis: genero de protozoo del orden Sarcosporidia.

Sarcocystosis: enfermedad que rara vez produce síntomas en los animales de abasto. Causado por el estado larvario del protozoo parásito *Sarcocystis sp.*

Sarcosporidiosis: estado morbosos producido por Sarcosporidias.

RESUMEN

Con la realización del presente trabajo investigativo se pretende llenar el gran vacío que existe sobre el conocimiento, del que puede ser el hospedador definitivo (HD) del *Sarcocystis* sp., agente etiológico de la Mieloencefalitis protozoaria equina (MEP), enfermedad que ha causado grandes pérdidas sanitarias y económicas al afectar una alta población de equinos en plantaciones de palma africana cerca del municipio de Tumaco. Es apremiante entonces, determinar el ciclo del parásito, buscando su posible HD. Estudios realizados al respecto reportan como tal, en los Estados Unidos y México, al *Didelphis virginiana*, marsupial que no existe en Colombia, como HD del *Sarcocystis neurona*. Es importante resaltar que en la región dedicada a la explotación de palma africana cercana al municipio de Tumaco, se observan zarigüeyas comunes (*Didelphis marsupialis*), que por las condiciones ambientales, poseen un hábitat adecuado para éstos.

El proyecto contó con el permiso otorgado por CORPONARIÑO, para realizar estudios de laboratorio en muestras de zarigüeyas capturadas en las mulerías de Astorga S.A. Se obtuvo suero sanguíneo para analizar y titular la toxina del *Sarcocystis* "sarcocystina" por medio de la técnica de Elisa competitiva, materia fecal para verificar la presencia o ausencia de las etapas infestivas del parásito por medio de la técnica de Inmunofluorescencia directa que permitió conocer que el parásito cumple su fase sexual en el intestino y, es por tanto, (HD); además, se tomó tejidos para análisis histopatológico de los ejemplares con el fin de observar lesiones en los diferentes órganos de las zarigüeyas capturadas.

Las muestras fueron enviadas adecuadamente, en refrigeración y conservadas en formalina al 10 %, a la Fundación Colombiana de Estudios de Parásitos FUNCEP de la ciudad de Bogotá donde fueron realizadas las respectivas pruebas.

ABSTRACT

The following research intends to explain some unknown facts about the definitive host (DH) of the *Sarcocystis* sp, etiological agent of the equine protozoal myeloencephalitis (EPM), this illness has caused great health damage and economic lost as well, affecting a large population of equines in plantations of African palm near Tumaco town. It's important to determinate life 's cycle of the parasite looking for his possible definitive host. Researches have proved that the opossum *Didelphis Virginian* is the definitive host of *Sarcocystis neurona* in E.U. and México ; opossum that doesn't exist in Colombia. However in plantations of African palms exists a common opossum *Didelphis marsupialis* due to the environmental facts, this facts offer a great habitat for this specie.

The project is supported by CORPONARIÑO in order to research lab samples of opossums (*Didelphis marsupialis*) in captivity taken from Astorga S.A. Blood serum smples were taken to analyze the toxin of the *Sarcocystis* through Elisa competitive; feces as well to verify whether there is parasite presence or not through the tecnic of Inmunofluorescence direct that let knowing that the parasite gets his sexual stage in small intestine, therefore definitive host of *Sarcocystis* sp. Tissues were taken to histopatology to be analyze the damage of the organs of opossums.

The samples were sent frozen and their conservation were in 10% formalin to the Fundación Colombiana de Estudio de Parásitos FUNCEP in Bogotá, where they processed.

INTRODUCCIÓN

Colombia es uno de los países más afortunados debido a su gran biodiversidad de recursos entre flora y fauna silvestre dentro de la cuál se encuentra a la zarigüeya, marsupial frecuente en numerosas regiones del país. Como muchas especies silvestres, son reportadas como transmisores y hospedadores de enfermedades parasitarias en el hombre y los animales domésticos, uno de los principales problemas es el desconocimiento que existe acerca de estas especies en algunos aspectos, uno de los cuales tiene que ver con su posible participación como hospedero de organismos patógenos como el *Sarcocystis sp.*

Con ésta investigación se buscó y se logró esclarecer que la zarigüeya *Didelphis marsupialis* pueden tener relación con el problema de tipo sanitario que se presenta en la especie equina en las zonas aledañas al municipio de Tumaco, como lo es la Mieloencefalitis protozoaria equina, enfermedad cuyo agente etiológico es el *Sarcocystis*, protozooario que utiliza a las zarigüeyas como hospedadores definitivos.

Mediante el presente estudio se demuestra que la zarigüeya *Didelphis marsupialis* es hospedador definitivo del *Sarcocystis sp*, el cuál es un protozooario que necesita de dos hospedadores para su ciclo de vida; en la zarigüeya el parásito se reproduce sexualmente en el epitelio intestinal y el otro, es el hospedador intermediario en el que se reproduce asexualmente enquistándose en músculo estriado. Azumendi ¹ reconoce que en Colombia es poco lo que se conoce sobre los hospedadores definitivos los que son capaces de eliminar sus ooquistes en la materia fecal y contaminar agua, alimentos y así provocar la enfermedad en los intermediarios.

¹ AZUMENDI, José Luis. Mieloencefalitis protozoaria equina. En : I SEMINARIO REGIONAL DE MEDICINA VETERINARIA (3 : 2004 : San Juan de Pasto). Memorias del I Seminario Regional de Medicina Veterinaria. San Juan de Pasto : Universidad de Nariño, 2004. p. 2.

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Actualmente en Colombia no existe ningún estudio sobre el hospedador definitivo del *Sarcocystis sp.*, agente etiológico de la Mieloencefalitis Protozoaria Equina, a pesar, según Olimpo Oliver ², de que han sido diagnosticados varios casos de la enfermedad en el país.

Ubicada en la región Pacífica Nariñense, se encuentra la empresa de Palma Africana: Astorga S.A.; la cual emplea animales de carga para el transporte del fruto, principalmente los mulares y, de acuerdo con Cedeño, Azumendi y Gonzáles, los equinos de esta zona han sido víctimas frecuentes de la Mieloencefalitis Protozoaria Equina ³.

Según el médico veterinario Fernando Cortés ⁴, el historial clínico de los equinos con alteraciones patológicas, básicamente del sistema nervioso, va desde 1999 hasta la fecha; el número de animales muertos se aproxima hasta los 250. Se realizaron varios exámenes de laboratorio para descartar otras patologías que afectan el Sistema Nervioso Central, encontrando diferentes reportes de laboratorio como se puede ver en el cuadro número 1.

La Mieloencefalitis Protozoaria Equina (MEP) fue emitido por primera vez como diagnóstico definitivo para estos animales, por el doctor Darío Alejandro Cedeño Quevedo ⁵, al obtener los resultados de serología para MEP de la Fundación Colombiana de Estudios de Parásitos (FUNCEP), que reportó por medio de la técnica de Elisa competitiva títulos altos de *Sarcocystis* en tres sueros de animales susceptibles pero sanos, enviados en el año 2000. Posteriormente se instauró el siguiente tratamiento: pirimetamina (Falcidar?) una tableta cada 12 horas por setenta días, estricta hidroterapia de suero fisiológico, lactato y dextrosa, acompañado de descanso y dieta a base de pastos de corte suplementada con concentrado. Los resultados del tratamiento fueron satisfactorios porque se logró controlar en gran parte el brote de la MEP.

² OLIVER, Olimpo. Mieloencefalitis protozoica equina. En : Conferencia Mieloencefalitis protozoica equina. (1, 2003 : Bogotá). Memorias de la conferencia Mieloencefalitis protozoica equina. Bogotá : Laboratorio Genfar, 2003.p.5.

³ CEDEÑO Quevedo, Darío Alejandro; AZUMENDI, José Luis; GONZÁLES, Gustavo. Casos clínicos de Mieloencefalitis Protozoaria Equina en mulas de una granja en Tumaco. En : Revista Medicina Veterinaria UDENAR. Pasto. Vol.1, No.2; (2.000). p. 7.

⁴ ENTREVISTA A Luis Fernando Cortés Sánchez (16 de enero de 2005. Médico Veterinario de la plantación Astorga S.A.

⁵ CEDEÑO Quevedo, Darío Alejandro. Informe visita médico veterinario. INFORME DE VISITA PRESENTADO A ASTORGA S.A. Tumaco, marzo de 2000.p.1,2.

Cuadro 1. Reportes de laboratorio

| Laboratorio | Muestras | Pruebas | Diagnóstico | Causa |
|---|----------|--|--|--|
| 1. DIAGVES, año 2000 * | 2 | Histopatología | Posible Intoxicación | Contamina ción del alimento con Plomo, Arsénico u otra sustancia. |
| 2. Clínica Veterinaria Universidad de Nariño, año 2002 ** | 5 | Hematozoarios | NEGATIVO | |
| 3. CEISA, año 2004 *** | 2 | Encefalitis Rábica | NEGATIVO | |
| | 23 | Encefalitis Equina Venezolana Encefalitis Equina del Este | NEGATIVO | |
| | 8 | Hemoparásitos | NEGATIVO | |
| | 2 | Histopatología | Mieloencefalopatía Degenerativa | Dieta rica en ácidos grasos insatura- dos, torta de palmiste |
| | 18 | Brucelosis | NEGATIVO | |
| | 18 | Leptospirosis | POSITIVO Serovares <i>Hardjo</i> e <i>icterohemorragie</i> | Alta población de roedores |
| | 18 | Anemia Infecciosa Equina | POSITIVO | Títulos post- vacunales |

FUENTE: * PAYAN Moreno, Jaime. Reporte de laboratorio Diagnóstico Veterinario Especializado. REPORTE DE LABORATORIO PRESENTADO A ASTORGA S.A. Cali, marzo de 2000. p.1.

** BENAVIDES Romo, Katia. Reporte de laboratorio Clínica Veterinaria Universidad de Nariño. REPORTE DE LABORATORIO PRESENTADO A ASTORGA S.A. Pasto, marzo de 2002. p.1.

*** PORTILLA Florián, Ricardo. Resultados oficiales del laboratorio CEISA. REPORTE DE LABORATORIO PRESENTADOS A PALMAS DE TUMACO. Pasto, abril de 2004. 13 p.

Es apremiante entonces determinar el ciclo del parásito, buscando su posible hospedador definitivo; Dubey ⁶ al respecto reporta como hospedador definitivo, en los Estados Unidos y México, al *Didelphis virginiana*.

Los pobladores de la región, mediante observación directa, afirman que existe un número considerable de zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*), sobre todo en las plantaciones de palma cuyo hábitat es adecuado para estos animales, por lo cual se necesita determinar si estos especímenes pueden estar contaminando agua y alimentos, y si están relacionados con la transmisión del *Sarcocystis sp*, agente etiológico de la Mieloencefalitis protozoaria equina, enfermedad que está ligada con las mortalidades ocurridas hasta la fecha y las cuales se siguen presentando de forma esporádica.

En Colombia no se ha descrito los hospedadores definitivos para el *Sarcocystis sp*, según el informe realizado por el doctor Darío Cedeño ⁷, en la región de la Costa Pacífica de Nariño a 47 kilómetros de Tumaco, en Astorga S.A. una empresa de cultivo de palma africana se diagnosticaron, mediante determinación de toxina en sangre, en el año 2000, tres casos positivos a Sarcocystina en mulares, con títulos de 500 UI/L reportando la MEP efectiva. La región se caracteriza por ser una zona de vida de trópico húmedo, ecosistema donde es endémico este género de zarigüeya: *Didelphis marsupialis*.

Fenger ⁸ afirma que el ciclo biológico del *Sarcocystis sp.*, no se ha descrito. Merozoitos y Merontes son las únicas etapas halladas en el sistema nervioso de los caballos. El ciclo de vida del *sarcocystis spp* es heteroxea, con una etapa sexual en el tracto gastrointestinal, en el hospedero definitivo (usualmente especies carnívoras y (carroñeros) y una etapa asexual en el hospedador intermedio (presas). Los esporozoitos pasan a las heces de los hospedadores definitivos y son ingeridas por el equino que actúa como hospedador intermedio.

Los esporozoitos penetran las células epiteliales intestinales del hospedador intermedio y empieza una de las múltiples fases de reproducción asexual. Los Merozoitos se encapsulan en el sistema nervioso central del equino, siendo este un hospedador errático y no natural.

⁶ DUBEY, J.P. et al. *Sarcocystis neurona sp.* (protozoa Apicomplexa), the etiological agent of equine protozoal myeloencephalitis. *Journal of parasitology*.1991. p.77.

⁷ CEDEÑO QUEVEDO, Darío. Op. cit., p.1.

⁸ FENGER, C.K. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of *sarcocystis neurona*. *Journal of parasitology*. Vol.81. No. 6. 916-919. 1995.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

Actualmente no existen estudios serológicos, coprológicos, ni histopatológicos sobre la presencia del *Sarcocystis* en zarigüeyas *Didelphis marsupialis*, en el país, como referencia para la determinación de este como hospedador definitivo del parásito

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar a la zarigüeya gris común del género *Didelphis marsupialis* como hospedador definitivo del *Sarcocystis sp*, mediante análisis de laboratorio en muestras obtenidas de animales en el área rural del municipio de Tumaco, Vereda Vuelta Larga, Departamento de Nariño.

3.2 Objetivos Específicos

- ?? Determinar la presencia de ooquistes de sarcocystis en materia fecal de zarigüeyas capturadas.
- ?? Analizar y titular la toxina del *Sarcocystis neurona* "Sarcocystina" a nivel sanguíneo de las zarigüeyas.
- ?? Describir las lesiones histopatológicas posiblemente producidas por *Sarcocystis sp.* en zarigüeyas capturadas.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Antecedentes

Respecto al origen y la evolución del problema:

Médicos veterinarios de la región de Tumaco reportan casos clínicos en un lote de mulas con síntomas nerviosos. Los animales están en una granja donde cultivan palma africana. Está localizada a 30 kilómetros de la ciudad de Tumaco, a 9 m.s.n.m., con una temperatura de 37° C. Las mulas son utilizadas para trabajo, en ellas sacan el producto de la palma hacia la carretera. En el lapso de cuatro meses (desde el mes de Diciembre de 1999 hasta el mes de marzo de 2000) en época de lluvias, se presentó una mortalidad del 66% (72 animales). En el mes de diciembre 15 animales empezaron a manifestar síntomas de incoordinación al desplazarse, ataxia del tren posterior, arrastraban la lumbre del pie de los miembros posteriores. El apetito se mantenía, después de dos a tres semanas no podían permanecer de pie y entraban en la fase de recumbencia permanente, enflaquecían y morían. El diagnóstico basado en el cuadro clínico, la experiencia veterinarios de la región y los brotes de enfermedades que se presentan en Tumaco llevó a sospechar en un principio en tripanosomiasis. Los animales se trataron con clorhidrato de cloruro de isomeramidina, se complementó el tratamiento con fluidoterapia y reconstituyentes, obteniendo una ligera mejoría, pero en el transcurso de unos días los animales recaían y morían. En el mes de enero se hicieron necropsias, exámenes sanguíneos y bromatológicos. Se sospechó intoxicación, enfermedades por protozoarios o virales. En el mes de marzo a raíz que continuaban las muertes, se volvió realizar exámenes histopatológicos, sanguíneos y cuantificación de Sarcocystina, con ellos se diagnosticó por primera vez Mieloencefalitis Protozoaria Equina (MEP)⁹.

4.2 SARCOCYSTIS

Jacques presenta la siguiente definición: “ La Sarcosporidiosis y Sarcocystosis son enfermedades parasitarias causadas por coccidios formadores de quistes pertenecientes al género Sarcocystis cuya reproducción sexual se lleva a cabo en el tracto intestinal del hospedador definitivo y el ciclo finaliza formando quistes con bradizoitos de localización muscular en el hospedador intermediario”¹⁰.

⁹ CEDEÑO QUEVEDO, Darío Alejandro; AZUMENDI, José Luis; GONZÁLES, Gustavo. Op. Cit., p.7.

¹⁰ JACQUES EUZEB. Los parásitos de las carnes : Epidemiología, Fisiopatología, Incidencias Zoonóticas. España. Ed. Acribia, 2001.

Sarcoquistes (En griego Sarkos=Carne, Kystis=Hinchada) son las etapas asexuales terminales y son encontradas enquistadas, primariamente en músculo estriado de mamíferos, pájaros, marsupiales, y animales poiquilotérmicos. Estos animales son hospedadores intermediarios. Los números y la distribución en el cuerpo varía mucho de hospedador a hospedador. Además de su presencia en músculo esquelético, el *Sarcocystis* puede encontrarse en el sistema nervioso central, y en las fibras de Purkinje del corazón y entre el músculo¹¹.

4.2.1 Historia del Sarcocystis. Los protozoarios del género *Sarcocystis* sp. fueron reportados por primera vez en 1843 por Miescher¹², quien describió “hilos lechosos blanquecinos” en el músculo esquelético de un ratón casero. Desde entonces ha pasado por todo tipo de clasificaciones llegando, incluso, a ser considerado como un hongo. Los doctores Sprindler y Zimmerman lograron cultivos del parásito obteniendo un crecimiento comparable con un *Aspergillus* s.p. y al contaminar porcinos, con el producto del cultivo, lograron el desarrollo del parásito y reproducir la enfermedad.

A lo largo de la historia, se ha reportado el parásito en diferentes especies silvestres y en la mayoría de especies domésticas: Bovinos, suinos, caprinos, caninos, felinos, equinos e inclusive el hombre. Hoy por hoy se le considera un protozooario coccidial de la familia *Sarcocystinae*, de la subfamilia *Sarcocystidae*, del género *Sarcocystis* y se le conocen más de 120 especies, de las cuales a un alto porcentaje no se le conoce uno de sus dos hospedadores.

Desde 1888 cuando Moulé identificó el ganado como huésped intermediario de *S. hirsuta*(*Sarcocystis Bovifelis*), los bovinos han sido considerados como los principales huéspedes intermediarios de varias especies de *Sarcocystis*.

En 1957, Mc Graw y Goodbod, reportaron el primer caso de Sarcocystosis en un humano vivo, mediante la técnica de fijación de complemento.

Fayer en 1972, y Roommel reportaron que los huéspedes intermediarios del parásito eran animales herbívoros u omnívoros, que adquirirían la enfermedad por medio de la infección vía oral con esporocystos excretados en las heces de los huéspedes definitivos (carnívoros u omnívoros).

¹¹ SAMUEL, William M; PYBUS, Margo J; KOCAN, A. Alan. Parasitic diseases of wild mammals. Iowa State : University Press, 2001. p. 494.

¹² MIESCHER. Etiología de la Sarcosporidiosis y de la Sarcocystosis, citado por AZUMENDI, José Luis. Enfermedades relacionadas con el sarcocystis. Bogotá : Diseño y Recursos Gráficos 2000, 1997.p.15.

Roommel y Heydorn en 1972 ¹³ encontraron que el ciclo de vida era heterogéneo teniendo: La fase asexual en los animales que se portan como presas, denominándolos huéspedes intermediarios (HI), y la sexual en los depredadores o huéspedes definitivos (HD). Los HD del sarcocystis son los depredadores, en otras palabras, son todos los que matan otros animales para consumir su carne, mientras que los HI son aquellos animales herbívoros que van a servir de presa de los depredadores.

Esto implica que cuando un HD mata a una presa contaminada con el parásito, aquel se contamina para posteriormente eliminar las formas que contaminaran las presas.

Hay diferentes hospedadores intermediarios y definitivos para cada especie de *Sarcocystis*; por ejemplo, hay tres especies nombradas de *Sarcocystis* en el ganado: *S. cruzi*, *S. hirsuta*, y *S. hominis*. Los hospedadores definitivos para estas especies son: Canino, Felino y primates, respectivamente ¹⁴.

Según Benavides y Viteri ¹⁵ el sarcocystis se ha encontrado en todo el mundo en músculos de ovejas, vacas y muchos animales, incluyendo reptiles, aves y el hombre. Está incluido dentro de un gran número de parásitos protozoarios conocidos como coccidia.

En 1990 un *Sarcocystis neurona* como organismo fue reconocido por causar una enfermedad neurológica en un mapache en los Estados Unidos; desde entonces una enfermedad similar ha sido reportada en el visón, zorrillo, mamíferos acuáticos del océano Pacífico, entre otros.

Otros sarcocystis no identificados causan hepatitis en los osos, leones marinos y chinchillas. Únicamente una etapa de esquizonte ha sido reconocida. Los ciclos de vida de estos organismos no son conocidos.

El organismo y las lesiones en mapaches se asemejan muy cerca a la infección de *Sarcocystis neurona* de los caballos con MEP. El oposum (*Didelphis virginiana*) es el hospedador definitivo: el hospedador intermediario

¹³ ROOMMEL Y HEIDORN. Etiología de la Sarcosporidiosis y de la Sarcocystosis, citado por AZUMENDI, José Luis. Enfermedades relacionadas con el sarcocystis. Bogotá : Diseño y Recursos Gráficos 2000, 1997.p.15.

¹⁴ SAMUEL, William M; PYBUS, Margo J; KOCAN, A. Alan, Op. Cit., p. 495.

¹⁵ BENAVIDES ROMO, Katia Luz Andrea; VITERI OCAÑA, Néstor Andrés. Prevalencia del Sarcocystis en bovinos sacrificados en el matadero Frigovito de San Juan de Pasto Nariño. San Juan de Pasto, 2000, 60 p. Trabajo de grado (médico veterinario). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Pecuarias. Programa de Medicina Veterinaria

y el sarcoquiste son desconocidos. Los caballos aparecen como hospedadores intermediarios o aberrantes; los sarcoquistes no son encontrados en el caballo. La zarigüeya es el HD por lo menos para tres especies de *Sarcocystis*: *S. falcatula*, *S. neurona* y *S. Espeeri*¹⁶.

Muy poco se conoce acerca del ciclo de vida, patogenicidad y significancia clínica de la sarcocystosis en mamíferos salvajes.

La Mieloencefalitis Protozoaria Equina (MEP) es una enfermedad neurológica común en los caballos de América. Las lesiones que causa a nivel de la médula espinal fueron descritas por primera vez en los Estados Unidos por Rooney en 1964. Rooney y colegas publicaron una serie de casos en caballos criollos en Kentucky y Pensilvania. En Brasil, Macruz y colaboradores reportaron la presencia del protozoario. En ambos casos en un principio se sospechó que el organismo casual era el *Toxoplasma gondi*¹⁷.

En Colombia, hallazgo de *Sarcocystis sp* se le atribuye a Virviscas en 1934 y posteriormente a Guevara en 1974, quien reportó la presencia de un parásito alargado de contornos redondeados en el corazón de un bovino. Pero fue solo hasta 1979 cuando se confirmó la presencia de *Sarcocystis* en los bovinos¹⁸.

Azumendi, a partir de 1990 ha seguido una línea de investigación sobre *Sarcocystis* en diferentes especies, convirtiéndose en pionero sobre el estudio de este parásito en Colombia.

4.2.2 Clasificación Taxonómica

Reino: Animal
Subreino: Protozoa
Subphylum: Apicomplexa
Clase: Sporozoasida
Subclase: Coccidiasida
Orden: Eimeriorina
Familia: Sarcocystinae

¹⁶ SAMUEL, William M; PYBUS, Margo J; KOCAN, A. Alan, Op. Cit., p. 503.

¹⁷ CEDEÑO QUEVEDO, Darío Alejandro; AZUMENDI, José Luis; GONZÁLES, Gustavo. Op. Cit.,p.

¹⁸ SANCHEZ RODRIGUEZ, Karina. Prevalencia de anticuerpos contra Brucella y concentración de Sarcocystina en empleados de plantas de sacrificio y beneficio animal. Santafé de Bogotá, 2003, 163 p. Trabajo de grado (médico veterinario). UDCA. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Programa de Medicina Veterinaria.

Subfamilia: Sarcocystidae
Género: Sarcocystis
Especies: Más de 200 reportadas

4.2.3 Ciclo de Vida. Según Azumendi ¹⁹, en teoría, el ciclo de vida del *S. neurona* se comporta igual que cualquier otro *Sarcocystis sp.* Tiene un ciclo de vida obligado del tipo predador presa. Necesita dos hospedadores, uno que es el hospedador definitivo (HD), en el que se reproduce sexualmente en el epitelio intestinal, y otro que es el intermediario (HI), en el que se reproduce asexualmente, enquistándose en el músculo estriado bien sea cardíaco o esquelético. El hospedador definitivo se infecta al consumir tejidos contaminados de un HI y luego de un tiempo de incubación, el HD empieza a eliminar ooquistes que contaminan el agua y los demás alimentos de los equinos. Para los *Sarcocystis* el hospedador definitivo es un carnívoro, para lo que nos ocupa y a través de la misma técnica del DNA, los investigadores han obtenido fuertes evidencias para pensar que, en los Estados Unidos de Norteamérica, el HD del *Sarcocystis neurona* es la zarigüeya (*Didelphis virginiana*), marsupial que no existe en nuestro medio.

El HD. llega a ser infectado por ingestión de tejido muscular o nervioso conteniendo *Sarcocystis* maduros. Los Bradizoitos liberados desde el *Sarcocystis* por digestión en el estomago y en el intestino penetran la mucosa del intestino delgado y utilizando las vías linfáticas y sanguíneas llegan a invadir las células del epitelio vascular donde se transforman en gametos masculinos (micro) y femeninos (Macro). Seis horas después de la ingestión de tejidos infectados, los gametos son encontrados en el interior de vacuolas parasitóforas (PV) en las células cerca de las puntas de las vellosidades intestinales. Los macrogametos son de forma ovoide y redondeada, de 10 a 20 micras de diámetro, y contienen un solo núcleo.

Los microgametos son ovoides y elongados y contienen de uno a muchos núcleos (usualmente hasta 15), y en los microgametos maduros los núcleos se mueven hacia su periferia.

Los gametos liberados desde el microgameto activamente se mueven a la periferia del macrogameto. Después de la fertilización, una pared se desarrolla alrededor del cigoto, y el ooquiste es formado ²⁰.

¹⁹ AZUMENDI, José Luis. Mieloencefalitis protozoaria equina. En : I SEMINARIO REGIONAL DE MEDICINA VETERINARIA (3 : 2004 : San Juan de Pasto). Memorias del I Seminario Regional de Medicina Veterinaria. San Juan de Pasto : Universidad de Nariño, 2004. p. 2.

²⁰ SAMUEL, William M; PYBUS, Margo J; KOCAN, A. Alan. Op. Cit., p. 495-498.

Figura 1. Ciclo de vida *Sarcocystis neurona*



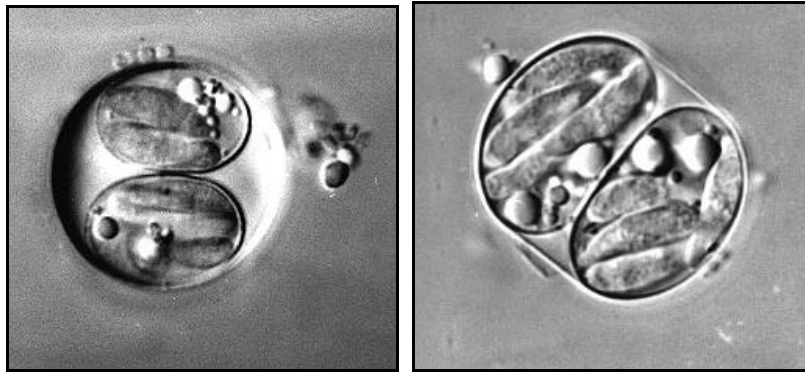
Fuente: <http://www.portalveterinaria.com/apuntes/Despuy-MieloencefalitisEquinaProtozoos.jpg>

El proceso entero de gametogonia y fertilización puede ser finalizado alrededor de 24 horas, y gametos y ooquistes pueden ser encontrados al mismo tiempo. La ubicación de la gametogonia y el tipo de células parasitadas varía con la especie de *Sarcocystis* y la etapa de gametogénesis.

El ooquiste de *Sarcocystis* esporula en la lámina propia de intestino; la masa interior del ooquiste se divide en dos esporocistes. Cuatro esporozoitos son formados en cada esporociste. Los ooquistes esporulados son generalmente

menos coloridos y de pared delgada (< 1 micra) y contiene dos esporoquistes elongados.

Figura 2. Ooquistes de sarcocystis contenido de dos esporoquistes



Fuente: www.paru.cas.cz/modryd/jezci/sarco.htm

Cada esporoquiste contiene cuatro esporozoitos elongados y un residuo granular de esporoquiste, el cual puede ser compacto o disperso. Cada esporozoito tiene un núcleo central o terminal, muchos gránulos citoplasmáticos y un cuerpo cristalóide.

La pared del ooquiste es delgada y con frecuencia se rompe. Los esporoquistes libres, sueltos en el lumen intestinal, son transportados en las heces. Ocasionalmente los ooquistes no esporulados son arrojados en las heces. Los periodos prepatente y patente varían, pero para la mayoría de especies de *Sarcocystis* los ooquistes son expulsados por primera vez en las heces entre 7 y 14 días después de la ingestión de *Sarcocystis*.

Figura 3. Esporoquiste de Sarcocystis con cuatro esporozoitos en su interior



Fuente: : www.bioltrop.org/08-diagparasito/sarcocystis.htm

El hospedador intermediario llega a ser infectado por la ingestión de esporoquistes en la comida y el agua. Los esporozoitos provienen desde el esporoquistes en el intestino delgado. El destino del esporozoito desde el tiempo de ingestión del esporoquiste hasta el desarrollo inicial en los ganglios linfáticos mesentéricos es desconocido. La primera generación Merogonia, comienza en el endotelio de las células como mínimo después de 7 días post inoculación y puede ser completada después de 15 días post inoculación.

La segunda generación merontes ha sido vista en el endotelio desde 19 a 46 días post inoculación, predominantemente en capilares pero también en pequeñas arterias, prácticamente por todo el cuerpo.

Los merontes se dividen por Endopoliogénesis. El núcleo llega a ser lobulado y se divide en muchos núcleos (hasta 37), los merozoitos se forman en la periferia. La forma y tamaño de los esquizontes (merontes) varía considerablemente. Los merontes en el músculo esquelético son más grandes que en otros tejidos. Ambas, primera y segunda generación, son localizadas dentro del citoplasma hospedador y no son rodeados por PV. Los merozoitos del *Sarcocystis* tienen las mismas organelas que los taquizoitos del toxoplasma gondi. Los merozoitos son encontrados en la sangre periférica entre 24 a 46 días post inoculación, coincidiendo con la maduración de la segunda generación de merontes. Los merozoitos en sangre son extracelulares o localizados dentro de células mononucleares no identificadas. Los merozoitos intracelulares contienen de uno a dos núcleos, y algunos se dividen en dos, aparentemente por endodiogénesis.

El número de generaciones de merogonia y el tipo de célula hospedador en la cual la merogonia puede aparecer, varía con cada especie de *Sarcocystis*, pero las tendencias son claras, por ejemplo, todas las especies de *Sarcocystis* de animales domésticos (ovejas, cabras, ganado, cerdos, caballos) forman la primera y segunda generación de merontes en el endotelio vascular, en cuanto una sola generación preexistente de merogonia ha sido encontrada en especies de *Sarcocystis* en mamíferos pequeños (ratones) y éstos generalmente en hepatocitos. Los merozoitos liberados desde la generación terminal de merogonia inician la formación de sarcocystis. El merozoito intracelular rodeado por una PV, llega a ser de redondo a ovoide, formando un metrocito que experimenta repetidas divisiones. Eventualmente el *Sarcocystis* es colmado con bradizoitos los cuales son la etapa infectiva para el predador.

El *Sarcocystis* generalmente llega a ser infeccioso alrededor de 75 días post inoculación, pero en esto hay una considerable variación entre las especies de *Sarcocystis*. El sarcocystis inmaduro contiene únicamente metrocitos, y los merontes no son infecciosos para el hospedador definitivo. No hay transmisión lactogénica.

Los sarcocystis siempre están localizados dentro de una PV en el citoplasma de la célula hospedadora. Más de un *Sarcocystis* puede ser encontrado en una célula hospedadora. El sarcocystis consta de un quiste y una pared que rodea las etapas del parásito: Metrocitos o zoitos.

Los sarcocystis inmaduros contienen metrocitos (células madres). Cada metrocito produce dos progenies por endodiogénesis; después de que aparecen tales generaciones, algunos de los metrocitos al final del proceso de endodiogénesis, producen zoitos en forma de banana, llamados bradizoitos (también llamados cistozoitos). Los bradizoitos contienen prominentes gránulos de amilopectina que se tiñen de rojo claro cuando son tratados con la coloración de PAS.

El desarrollo del sarcocystis comienza cuando un merozoito entra en la célula muscular o nerviosa. El merozoito reside en una PV y esta rodeado por una membrana vacuolar parasitófora (PVM), la cual aparece para desarrollar una pared primaria de sarcocystis. La pared primaria de sarcocystis consiste de una PVM mas una capa subyacente electrodensa; una capa granular está inmediatamente debajo de la pared primaria de sarcocystis; una septa aparece desde la capa granular atravesando el sarcocystis, separándolo en dos compartimentos los cuales contienen bradizoitos y metrocitos²¹.

De acuerdo con las hipótesis mencionadas, el *Sarcocystis falcatula* con gruesos macroquistes usaría a las aves de los órdenes passeriformes, cuculiformes columbiformes y psitaciformes como hospedadores intermediarios y la zarigüeya (*Didelphis virginiana*) como el hospedador definitivo. El equino se comportaría como un HI errático en el que no se van a formar quistes de *Sarcocystis* en el músculo, sin embargo, en él si se formarían micro colonias dentro de su sistema nervioso central, en este momento recibiría el nombre de *Sarcocystis neurona*²².

Si se tiene en cuenta que la zarigüeya (*Didelphis virginiana*), es un marsupial que se encuentra desde el sur de Canadá hasta México, y si en el país no existe la especie *Didelphis Virginiana* ¿Quién es el hospedador definitivo?. Sin embargo se se han diagnosticado algunos casos de MEP, que han sido confirmados por las autoridades sanitarias estadounidenses encargadas de este tipo de diagnósticos.

Algunos marsupiales, primates y carnívoros pueden actuar como hospedadores intermediarios y definitivos, pero usualmente no para la misma especie de sarcocystis.

²¹ Ibid., p. 495-498.

²² Ibid., p. 502.

El ciclo de vida de las especies de sarcocystis que forma sarcoquistes en animales carnívoros no se conoce.

4.2.4 Transmisión. El ciclo de vida indica que el huésped definitivo adquiere la enfermedad mediante la ingestión de las formas quísticas del parásito procedentes del huésped intermediario y éste, su vez, elimina esporoquistes por materia fecal, contaminando así el medio ambiente y a través del agua a los alimentos de consumo humano y animal.

Azumendi ²³ describe que en todos los casos se considera que la principal fuente de contaminación es la oral; sin embargo, se debe tener en cuenta la conjuntiva y las heridas contaminadas como fuentes adicionales. Investigaciones realizadas en la fundación Colombiana de Estudio de Parásitos (FUNCEP) demuestran que la piel puede servir como medio de entrada de los parásitos por contacto directo, esa afirmación es basada en el hecho de que primates no humanos contaminados por vía intradérmica presentaron la fase asexual del *Sarcocystis*, además encontraron esporozoitos viables en las uñas y colmillos de felinos, así como en las uñas y picos de aves contaminadas experimentalmente; lo que sugiere que los rasguños de estos animales pueden ser una vía de transmisión de los primates.

Otros investigadores como Dubey determinaron que esta ruta era viable al menos bajo condiciones de laboratorio para el *Sarcocystis*, al comprobar que tres de veinte cuatro ratones inoculados vía subcutánea con merozoítos de *S. neurona*, resultaron positivos a la prueba de Elisa

4.2.5 EPIDEMIOLOGÍA. La infección de sarcocystis es común en muchas especies de animales. En teoría, el 100% del ganado adulto en los Estados Unidos está infectado con este parásito. Una variedad de condiciones permiten su alta prevalencia. Un hospedador, por ejemplo, puede albergar cualquiera de muchas especies de *Sarcocystis*. Las ovejas pueden llegar a ser infectadas por alrededor de seis especies y el ganado puede tener como mucho tres especies. Además, muchos hospedadores definitivos están involucrados en la transmisión; por ejemplo, la sarcocystosis en el ganado es transmitida por felinos, caninos y primates. Los carnívoros salvajes como los coyotes extienden el parásito sobre largas distancias durante sus correrías por comida. Los ooquistes de sarcocystis y esporoquistes se desarrollan en la lámina propia y son descargados sobre un periodo de muchos meses. Los esporoquistes o quistes permanecen viables por muchos meses en el ambiente, ellos pueden ser transportados, esparcidos o protegidos por hospedadores invertebrados.

²³ AZUMENDI, José Luis. Enfermedades relacionadas con el *Sarcocystis*. Bogotá : Diseño y Recursos Gráficos 2000. 1997. p.36-37

Grandes números de esporoquistes pueden ser liberados; por lo tanto, cada porción de carne infectada puede iniciar una nueva ronda de producción de esporoquistes. Los ooquistes o esporoquistes son resistentes a la congelación y pueden permanecer largos periodos en el pasto. Aparentemente los esporoquistes pueden ser destruidos por secado y por una exposición de 10 minutos a 56°C. Sin embargo ellos son resistentes a los desinfectantes.

A diferencia de cualquier otra especie de coccidia, el *Sarcocystis* es transportado en las heces en la forma infectiva y no es dependiente de las condiciones del clima para maduración e infectividad²⁴.

Dubey²⁵ reporta que el tratamiento más efectivo para la desinfección de sarcocystis en alimento y en el ambiente es la alta temperatura que destruye los esporozoitos de *S. neurona* en comparación con otros desinfectantes como: clorhexidina, betadina, fenol, formalina entre otros.

Según Dubey²⁶ en los Estados Unidos algunas especies de aves silvestres han sido identificadas como huéspedes intermediarios de una especie exótica en Colombia llamada *Sarcocystis neurona*, que produce encefalitis, hepatitis y miocarditis y cuyo huésped definitivo es la *Didelphis virginiana*. El principal problema ha sido la aparición de los llamados huéspedes aberrantes del parásito, entre los que se incluyen los equinos en los cuales produce una grave encefalitis protozoal, hepatitis, entre otras complicaciones que por lo general son causa de muerte.

Al respecto Azumendi²⁷ expone, que la Mieloencefalitis Protozoaria Equina (MEP) es una enfermedad parasitaria que afecta el sistema nervioso de los équidos, causada por protozoarios tales como: La babesia, tripanosoma, toxoplasma y *Sarcocystis neurona*.

²⁴SAMUEL, William M; PYBUS, Margo J; KOCAN, A. Alan. Op. Cit., p. 502-503.

²⁵ DUBEY, J.P. et al. Effects of high temperature and disinfectants on the viability of *Sarcocystis neurona* sporocysts. Journal of parasitology. Vol.88. No. 6, 2002. p. 1252-1254.

²⁶ DUBEY, J.P; LINDSAY, D.S.; ROSENTHAL, B.M. Isolates of sarcocystis falcatula-like organism from south American opossums *Didelphis marsupialis* and *Didelphis albiventris* from Sao Paulo Brazil. Journal of parasitology. Vol 87. No.6. 2001.p.1449-1453.

²⁷ AZUMENDI, José Luis. Mieloencefalitis protozoaria equina. En : I SEMINARIO REGIONAL DE MEDICINA VETERINARIA (3 : 2004 : San Juan de Pasto). Memorias del I Seminario Regional de Medicina Veterinaria. San Juan de Pasto : Universidad de Nariño, 2004. p.1.

El agente más prevalente en la MEP es el *Sarcocystis neurona*, de acuerdo a los análisis del material genético, existe una evidencia bastante fuerte que el *Sarcocystis neurona* es el mismo *Sarcocystis falcatula*, ya que el genoma muestra que son muy similares las dos cadenas genéticas, sin embargo cabe aclarar que la variabilidad de la cadena del *Sarcocystis falcatula* es bastante grande, lo que puede crear un bache en la conclusión, puesto que esa variabilidad genética del *Sarcocystis* podría, en un momento determinado, permitir que se hagan conclusiones erróneas.

El mismo autor afirma, que es conveniente aclarar que el *Sarcocystis falcatula* afecta a las aves, utilizándolas como hospedadoras intermediarias, lo que quiere decir que en ellas el parásito se enquista en el músculo estriado y sólo va a servir para contaminar al depredador que ingiera su carne cruda o mal cocida.

El forraje y el agua que consumen los equinos, será contaminada por esporozoitos de *Sarcocystis neurona*, los cuales son eliminados por el HD. Así los equinos al alimentarse, ingieren la fase contaminante del *Sarcocystis* la cual realiza una multiplicación asexual precoz (merogonia) en los tejidos extraneurales antes de parasitar al sistema nervioso central.

4.2.6 Patogenia. El *Sarcocystis sp.* puede producir dos tipos de enfermedad: La sarcosporidiosis que se refiere al desarrollo de la fase asexual con la formación de quistes en el músculo estriado y cardíaco del hospedador intermediario y, la sarcocystosis que esta relacionada con la fase sexual en el intestino del hospedador definitivo.

4.2.6.1. Sarcosporidiosis. Sobre esta hay varios puntos a tener en cuenta:

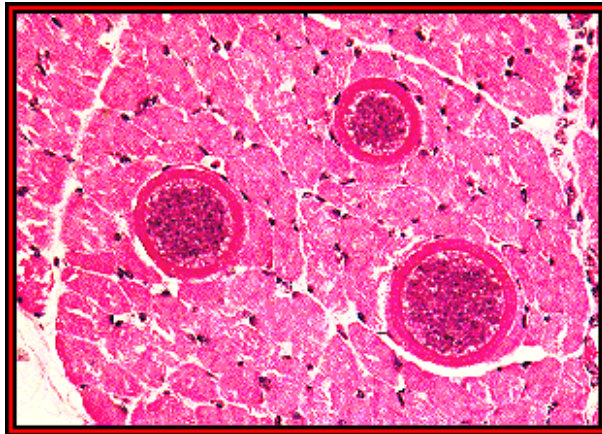
?La enfermedad puede tener tres formas de presentación: Sobreaguda, aguda y crónica. La etapa sobreaguda está relacionada con la primera generación de esquizontes que se realiza en el epitelio vascular del tubo digestivo; la aguda, con las siguientes generaciones; mientras la crónica se relaciona principalmente con la formación de quistes en los músculos esquelético y cardíaco.

?Las generaciones de esquizontes se desarrollan en el endotelio de los vasos sanguíneos, principalmente del tubo digestivo. Cuando el parásito es maduro rompe la célula que esta invadiendo y esto lleva la producción de hemorragias.

?Los esquizontes llegan a la sangre mecanismo que utilizan para transportarse. Este hecho se puede clasificar como una parasitemia, cualquier parasitemia tiene características similares y esta no es una excepción, se destaca el desarrollo del síndrome fiebre con todos sus componentes; hipertermia morbosa persistente, inapetencia y decaimiento.

?¿Los quistes ocasionalmente se rompen liberando las esporas y la toxina que contienen, entonces se genera un proceso inflamatorio en la zona, produciéndose una reacción alérgica. de tipo 1.

Figura 4. Sección de lengua mostrando tres quistes de *Sarcocystis* sp.



Fuente: Gardiner *et al.*, 1988, An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues, USDA Agriculture Handbook No. 651

4.2.6.2 Sarcocystosis. Existen pocas evidencias disponibles en la literatura sobre la patogenicidad del *Sarcocystis* en el hospedador definitivo; al respecto Gestrich, citado por Sánchez Rodríguez Karina ²⁸, en 1975, afirmó que el *Sarcocystis* es más patógeno para el huésped intermediario que para el huésped definitivo, manifestándose en este como un síndrome entérico caracterizado por una sintomatología no específica y transitoria que varía de acuerdo al estado inmunitario del huésped, la cantidad de esporocistos ingeridos y la madurez de estos.

El efecto patológico de un gran número de *sarcocystis*, está más relacionado con la actividad toxicológica de la Sarcocystina, que con el parásito en sí mismo.

La sarcocystina es una toxina producida por los quistes del *sarcocystis* que al romperse, es liberada por los esporos. Esta toxina es hemolítica y hemaglutinante, puede producir abortos y en grandes cantidades afecta al corazón, hígado, tiene una acción neuromuscular y puede ser letal.

La toxina es la responsable principal de las alteraciones que se producen en los pacientes que sufren sarcosporidiosis o sarcocystosis. La toxina es producida por el parásito mientras vive y se reproduce en el intestino del hospedador

²⁸ SÁNCHEZ RODRÍGUEZ, Karina. Op. Cit., p.76.

definitivo o en los quistes del hospedador intermediario. Cuando la toxina llega al torrente circulatorio y por medio de él va a todo el organismo del hospedador, produce una serie de cambios en la fisiología de varios órganos y sistemas:

¿?Mientras exista sarcocystina los linfocitos B se verán estimulados a reproducirse a mayor velocidad, lo que conlleva a que en muchos casos se desarrolle hiperplasia linfoide, aunque estos linfocitos no van a funcionar normalmente. El doctor Tiefert citado por Azumendi ²⁹ ha reportado la lectina que se comporta como mitógeno de los linfocitos B y a esta se le ha relacionado con las alteraciones linfocitarias existentes en bovinos que sufren sarcosporidiosis.

¿?La Sarcocystina tiene un comportamiento histaminoide, es decir que va a producir una reacción similar a la histamina: Aumenta la presión venosa y disminuye la presión arterial, con excepción que con sarcocystina no hay prurito. Media una congestión pasiva crónica con fallas en la circulación sanguínea de diferentes grados de severidad.

4.3 Zarigüeya gris común (*Didelphis marsupialis*).

De acuerdo a Emmons ²⁹ el *Didelphis marsupialis*, se ha reportado geográficamente en América Central y del Sur: Desde México a Bolivia, Paraguay y Noreste de Argentina, Trinidad y Antillas Menores. Navarro y Muñoz ³⁰ reportan al *D. marsupialis* distribuido por todo el territorio Colombiano en los diferentes tipos de bosque, de 0 hasta los 2000 m.s.n.m. Su clasificación taxonómica se puede observar en el cuadro 2.

Según la clasificación IUCN, la zarigüeya se encuentra en categoría DD: Datos insuficientes. Un taxón se incluye en la categoría de datos Insuficientes cuando no hay información adecuada para hacer una evaluación, directa o indirecta, de su riesgo de extinción basándose en la distribución y/o condición de la población. Un taxón en esta categoría puede estar bien estudiado, y su biología ser bien conocida, pero carecer de los datos apropiados sobre su abundancia y/o distribución.

Al incluir un taxón en esta categoría se indica que se requiere más información, y se reconoce la posibilidad y necesidad de que investigaciones futuras demuestren que una clasificación de amenazada pudiera ser apropiada.

²⁹ EMMONS, LOUISE H. Mamíferos de los bosques húmedos de América tropical. Santa Cruz de la Sierra : F.A.N., 1999. p.14.

³⁰ NAVARRO, José Fernando; MUÑOZ, Javier. Manual de huellas de algunos mamíferos terrestres de Colombia. Medellín : Editorial Universidad de Antioquia.,2000. p.40.

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de la Zarigüeya Gris Común.

| Descripción | Taxonomía |
|-------------|------------------------------|
| Clase | Mammalia |
| Infraclase | Metatheria |
| Orden | Marsupialia |
| Familia | Didelphidae |
| Género | Didelphis |
| Especie | <i>Didelphis marsupialis</i> |

FUENTE: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Didelphis_marsupialis.html.

4.3.1 Descripción física. Las hembras se caracterizan por ser más pequeñas que los machos, su cuerpo posee una longitud desde 263 milímetros hasta 430 milímetros, y su cola puede medir 295 milímetros hasta 450 milímetros. Se caracteriza por tener un peso de 0.60 hasta 2.40 Kilogramos; con un promedio de 1.50 Kg.

Figura 5. *Didelphis marsupialis*



Fuente: <http://www.cayaya-birding.de/index.html?http://www.cayaya-birding.de/opossum.htm>

Emmons ³¹ describe, a este tipo de zarigüeya común conocida con otros nombres como “comadreja, chucha, zorra, raposa, zorro hediondo”, se identifica por tener en su parte dorsal un pelaje denso, negro o gris jaspeado de amarillo o blanco rucio; flancos mas claros que el dorso, pelaje con dos capas de pelos largos y gruesos negros o grisáceos. Cabeza blanca rucia o crema amarillenta, mejillas amarillas, anaranjado pálido o blanco sucio, nariz rosa, orejas grandes, pelada, negra con la punta blanca. Cola del mismo largo que la longitud de la cabeza y el cuerpo, prensil con la punta totalmente desnuda, de color negro en su mitad proximal y el resto blanquecina. Vientre de color similar al dorso. Las hembras tienen bolsa ventral o marsupio poco desarrollado y abierto centralmente y sus crías pequeñas son negruzcas, con la cabeza más clara.

4.3.2 Hábitos alimenticios. El mismo autor reconoce que *Didelphis marsupialis* generalmente es nocturna, arborícola y terrestre solitaria, se alimenta principalmente de animales pequeños, aves, invertebrados, insectos, lombrices o pequeños vertebrados, incluyendo serpientes ³². Aproximadamente $\frac{1}{4}$ de su dieta consiste en frutos, y durante la estación seca, a veces de néctar. La zarigüeya común generalmente se desplaza y se alimenta en el suelo, pero puede subir a la copa de los árboles para alimentarse de frutos o de néctar.

También trepa para escapar de los peligros y para descansar a mitad de la noche. En cautiverio tienen gusto especialmente por los plátanos.

Debido a sus hábitos de alimentación, esta especie es importante para el control de mamíferos y de invertebrados pequeños, regulación de búhos y de pequeños mamíferos carnívoros.

Puede subir a la copa de los árboles para alimentarse de frutos. Habita grietas de rocas, y troncos huecos, a veces también en el cielo raso de las casas.

4.3.3 Hábitat. *D. marsupialis* tolera una gran variedad de tipos de hábitat incluyendo los bosques, el área primaria y secundaria de las plantaciones del café, áreas urbanas y suburbanas, pero no se encuentran en las elevaciones sobre 2.232 m o en regiones áridas. *D. marsupialis* es substituido por su pariente cercano, *D. albiventris* (opossum blanco-espigado), en regiones montañosas de América del Sur.

³¹ Ibid., p.14.

³² Ibid., p.14.

Figura 6. Hábitat de la Zarigüeya.



Fuente: <http://www.cayaya-birding.de/index.html?http://www.cayaya-birding.de/opossum.htm>

4.3.4. Reproducción. En la estación de acoplamiento comienza en enero, los varones marcan su territorio con saliva y las hembras construyen sus nidos en cavidades de los árboles o madrigueras. En cautiverio se ha divulgado que las hembras pueden tener un tamaño promedio de camada de diez crías, y hasta tres partos en un año.

Las hembras se consideran maduras a los 5 meses de edad y los machos 2 a 3 semanas después. El estro es inducido en cualquier etapa del año por la presencia de un macho y generalmente de 5 a 10 días de su estadía. La gestación es de 14 a 15 días. El tamaño general de la camada es de 7 a 12 pero pueden ser más, solamente sobreviven las crías que logren igualar el número de pezones. Las hembras usualmente tienen tres camadas al año, cuatro es raro. Los recién nacidos pesan 100 miligramos, tienen 1 cm. de largo. Abren los ojos alrededor de un mes de edad. La edad principal de reproducción de la hembra es después de los 18 meses. La mayoría cesa la reproducción antes de los 24 meses de edad. Ellas comienzan a mostrar signos físicos de envejecimiento a los 3 años de edad y generalmente mueren por causa natural durante el cuarto año de vida.

Los jóvenes nacen sin pelo y son muy pequeños. Este tamaño de cuerpo asombrosamente pequeño significa que 24 recién nacidos pueden caber en una cucharilla. Los recién nacidos deben encontrar a su manera el marsupio o la bolsa de su madre. Pueden moverse solamente con sus patas delanteras, que son más móviles que sus piernas traseras. Hay dos teorías en cuanto a cómo los recién nacidos encuentran el marsupio, la primera teoría dice que los recién

nacidos encuentran el marsupio por el olor, así antes del nacimiento la madre lamerá una trayectoria a la abertura de la bolsa de modo que los jóvenes puedan seguir el rastro. La segunda teoría es que las crías hallan la bolsa por gravedad. Una vez que los recién nacidos hayan encontrado el marsupio, se unen a los pezones, que entonces se hinchan en la extremidad y así evita que estos se caigan.

Figura 7. Fetos en la Bolsa o Marsupio



Fuente: <http://www.cayaya-birding.de/index.html?http://www.cayaya-birding.de/opossum.htm>

Los jóvenes crecen rápidamente y estarán listos para dejar el marsupio después de sesenta días.

Los jóvenes se destetan alrededor de 100 días. La madurez sexual se alcanza entre los 8 y 12 meses de la edad.

4.3.5. Longevidad. Estos animales no viven probablemente largo tiempo en su vida salvaje. Se ha divulgado que viven generalmente cerca de dos años en su hábitat natural, pero pueden vivir hasta siete años en cautiverio.

4.3.6. Comportamiento. Según Emmons³³, son animales nauseabundos que se revuelcan en estiércol fresco, si son manoseados, defecan y riegan orina de un olor extremadamente desagradable que quema la piel, es generalmente agresiva y amenaza con su boca abierta, enviste y muerde cuando es acorralada o atrapada, se encuentra en bosques húmedos, alrededor de lugares habitados

³³ Ibid., p.14.

por el hombre donde se alimenta en basurales.

La *Didelphis Marsupialis*. es solitaria excepto durante la estación la crianza. Estas zarigüeyas se guían principalmente por el olfato y el tacto.

Son buenas trepadoras ya que buscan sus refugios en las partes altas de árboles huecos, una guarida bajo raíces, o agujeros en la tierra. No defienden activamente una área específica o territorio, y Cuando se trasladan de un lugar cada animal (generalmente varones) marcará el área con orina y saliva. Los machos evitan el contacto con otros, y si hay encuentro, son agresivos. El comportamiento amenazador comienza con la abertura de la boca, y es seguido de silbidos, gruñidos, y finalmente muerden con gran presión.

Las hembras son más sedentarias que los machos. Los zarigüeyas meridionales no pueden mantener el calor del cuerpo debajo de una temperatura ambiental de menos de siete grados centígrados. Durante el frío, estos dormirán en guaridas, pero no invernan.

Figura 8. Comportamiento *D. Marsupialis*.



Fuente: <http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/opossum.htm>

4.3.7. Importancia para los seres humanos. En Venezuela, el *Didelphis marsupialis*, es un anfitrión importante para el parásito *Tripanosoma cruzi*, que es la fuente para la enfermedad humana conocida como enfermedad de Chagas³⁴.

³⁴ HAGMANN, K. Marsupialis didelfo (en línea). En : Accessed animal de la diversidad (2003). (Consultada: 19 ener. 2005). Disponible en la dirección electrónica: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Didelphis_marsupialis.html.

Trujillo³⁵ expone que en Colombia, algunos investigadores consideran que la zarigüeya común (*Didelphis marsupialis*) es un buen candidato para servir como reservorio de los Virus de Estomatitis Vesicular, ya que es una de las especies silvestres mayormente capturada en todas las zonas de estudio: presenta altos porcentajes de prevalencia de infección, resiste muy bien la antropización, además, su comportamiento le permite interactuar con diferentes poblaciones en los bosques y servir como posible fuente de transmisión al hombre y sus animales en el medio ambiente domiciliario y peridomiciliario.

4.4 HALLAZGOS CLÍNICOS Y SINTOMATOLOGÍA DE LA MIELOENCEFALITIS PROTOZOARIA EQUINA (MEP).

La enfermedad puede aparecer como una encefalitis cuando las colonias se ubican en el cerebro o puede aparecer como mielitis en caso de que se ubiquen en la médula espinal, sin embargo, hay muchos equinos que pueden presentar los dos tipos de manifestación comportándose entonces como mieloencefalitis, se observa que los signos de afección de la médula espinal son mas frecuentes que los encefálicos.

Los caballos con MEP afectados la médula espinal tienen debilidad y ataxia simétrica o asimétrica en una o ambas extremidades, a veces con una evidente atrofia muscular (atrofia neurogénica). Y también se puede observar pérdida de reflejos y sensibilidad cutánea en zonas determinadas.

“Esencialmente, los síntomas de la MEP están representados por disfunciones neurológicas, que en muchas ocasiones son un dato un poco vago para hacer el diagnóstico, estos síntomas son, entre otros: letargo, debilidad, condición física relativamente mala, cambios de actitud y disminución de la tolerancia al ejercicio”³⁶

Alternativamente la MEP puede cursar con síntomas mas definidos, vale la pena destacar, entre ellos: incoordinación, dificultad al pararse, cojeras sin causa aparente, en algunos casos cegueras, fallas al prensar y masticar los alimentos, parálisis facial, parálisis de la laringe, anormalidades en el movimiento de los ojos, se tropiezan con facilidad, temblores de cabeza, temblores musculares, sudoración irregular, convulsiones y postración.

³⁵ TRUJILLO et al. *Didelphis marsupialis* como un reservorio potencial u hospedero amplificador para el virus de la estomatitis vesicular serotipo *New Jersey*. En : Revista Colciencias Ciencias Pecuarias. Bogotá. Vol.16 (2003) p. 37.

³⁶ AZUMENDI, José Luis. Mieloencefalitis protozoaria equina. En : I SEMINARIO REGIONAL DE MEDICINA VETERINARIA (3 : 2004 : San Juan de Pasto). Memorias del I Seminario Regional de Medicina Veterinaria. San Juan de Pasto : Universidad de Nariño, 2004. p.3.

Dubey ³⁷ reporta, que muchos de los equinos afectados presentan síntomas de enfermedad neurológica multifocal que involucran el cerebro y la médula espinal. Esta condición es importante para el diagnóstico diferencial con otras enfermedades del sistema nervioso central, que rara vez producen lesiones multifocales.

4.5 DIAGNOSTICO DE SARCOCYSTIS

La presencia de *Sarcocystis* no es fácil de diagnosticar debido a la naturaleza generalizada de la enfermedad, a la falta de signos clínicos y a la falta de disponibilidad de pruebas serológicas comerciales. A pesar de las limitaciones para el uso de pruebas que brinden una completa seguridad en el diagnóstico; existe la posibilidad de utilizar otros métodos serológicos para la medición de metabolitos producidos por el *Sarcocystis sp.*, como es el caso de la Sarcocystina, cuya concentración en sangre puede ser determinada bien sea por técnicas biológicas o por ELISA competitiva, la cual es una de las principales herramientas de diagnóstico de los parásitos del género *Sarcocystis*.

Las pruebas de laboratorio que se requieren para diagnosticar al *Sarcocystis* son:

??Coproológico: Los análisis de la materia fecal permiten determinar los esporozoitos, esporoquistes u ooquistes, procedentes de los huéspedes definitivos del *Sarcocystis sp.*; La técnica más usada para visualizar el parásito en las heces, es la de flotación. Pero preferiblemente se debe confirmar el diagnóstico por Inmunofluorescencia Directa, debido a que los esporozoitos libres se pueden confundir fácilmente con otras estructuras. Aunque ésta técnica brinda un diagnóstico preciso de la enfermedad no es totalmente segura, pues los huéspedes definitivos pueden eliminar las formas sexuales del *Sarcocystis sp.* Intermitentemente lo que daría lugar a falsos negativos.

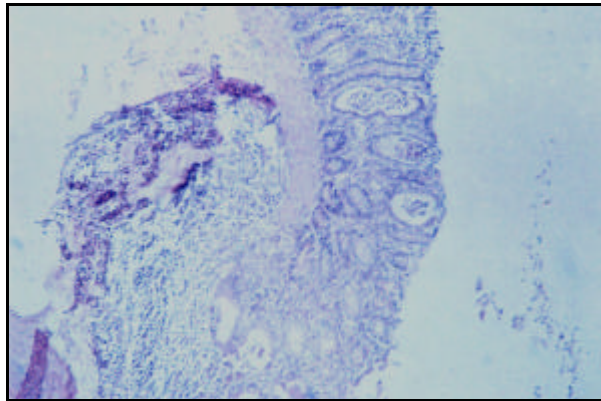
??Pruebas hematológicas: Los resultados del hemograma permiten establecer el tipo de respuesta hemática que se está presentando en el organismo y que está relacionada con la fase en que se encuentre el parásito; siendo la linfocitosis relativa y absoluta la anormalidad más sobresaliente en la enfermedad.

??De acuerdo a la Fundación Colombiana de Estudios de Parásitos (FUNCEP), el protocolo más adecuado para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de las enfermedades producidas por *Sarcocystis sp* es la demostración de esporozoitos en materia fecal y de la toxina en sangre.

³⁷ DUBEY, et al, *Sarcocystis neurona sp.* (protozoa Apicomplexa), the etiological agent of equine protozoal myeloencephalitis. Op. cit., p.7-10.

Con este esquema se confirma la presencia del parásito en el intestino y la concentración de toxina existente en la sangre, éstos sumados a las lesiones producidas por el *Sarcocystis* en tejidos, son las pautas más valiosas para el diagnóstico.

Figura 9. Corte histopatológico de duodeno de un canino contaminado con sarcocystis. El parásito se está reproduciendo en la lámina propia y se ven los oocistos saliendo a través de la cripta intestinal



Fuente: AZUMENDI, José Luis. Enfermedades relacionadas con el Sarcocystis. Bogotá : Diseño y Recursos Gráficos 2000. 1997. p. 89.

4.5.1 Diagnóstico De Mieloencefalitis Protozoaria Equina (MEP)

En el caso de la Mieloencefalitis Protozoaria Equina cuyo agente causal es el *Sarcocystis neurona*, no es posible un diagnóstico definitivo que se base únicamente por síntomas clínicos que se den en los equinos, debido a que sus signos son difíciles de distinguir de los producidos por otras enfermedades como estenosis cervical, herpes virus, mielopatía degenerativa equina, etc. El diagnóstico post mortem se confirma mediante las lesiones causadas por los protozoos en el sistema nervioso central.

Existen tres signos muy típicos que permiten sospechar de MEP , caminar tambaleante, ataxia y atrofia muscular, pero para llegar al diagnóstico definitivo se requiere de algún test específico. Algunos autores dan la respuesta al tratamiento específico como indicativo de la enfermedad.

Azumendi ³⁸ afirma que técnicas como el “Inmuno-blot” el cuál detecta la presencia de anticuerpos en suero y pruebas basadas en la demostración del RNA del parásito en el líquido cefalorraquídeo son las más usadas.

³⁸ AZUMENDI, Mieloencefalitis protozoaria equina, Op. Cit., p.3.

La positividad detectada en suero indica que el caballo ha tenido contacto con el *S. neurona*, pero no significa que esté enfermo. Mientras que el resultado positivo en líquido cefalorraquídeo demuestran la presencia del parásito como tal y confirma la enfermedad.

Tinciones inmunohistoquímicas con anti *S. neurona* en el suero puede ayudar a la diagnosis. Encontrar un gran número de sarcoquistes inmaduros o maduros todos en la misma etapa de desarrollo sugiere un diagnóstico de sarcocystosis.

Por último el diagnóstico histopatológico se utiliza en los casos que se debe recurrir a la eutanasia, tomando las muestras de sistema nervioso central.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

El muestreo de las zarigüeyas como especie silvestre, estuvo sujeto a limitantes como:

??La normatividad existente para la conservación de especies silvestres, decreto ley 1608/78 y la ley 84/89 que prohíbe la captura y el tráfico de animales silvestres.

??Su alta demanda como fuente de proteína animal para consumo humano.

??Por ser un animal silvestre el tamaño de la muestra está sujeto a un número determinado de ejemplares que se capturen para su estudio.

Por lo anterior el diseño estadístico para la determinación del tamaño de la muestra se realizó de manera dirigida o no probabilística. Por lo cual se estimó una muestra de 15 animales, de acuerdo con el número de animales autorizados por CORPONARIÑO para el estudio. De estos 15 ejemplares se tomó todas las muestras necesarias para el estudio.

5.2 ETAPAS DEL ESTUDIO

El estudio contó con el permiso emitido por CORPONARIÑO (**ver anexo A**) para la obtención de 15 ejemplares de la especie *Zarigüeya gris común (Didelphis marsupialis)*. Lo anterior con el objeto de dar cumplimiento a lo estipulado en el Decreto 309 de 2000. El cual reglamenta la investigación científica sobre diversidad biológica. Esta normatividad establece lo siguiente:

Artículo 2o. Permiso de estudio con fines de investigación científica. Las personas naturales o jurídicas que pretendan adelantar un proyecto de investigación científica en diversidad biológica que involucre alguna o todas las actividades de colecta, recolecta, captura, caza, pesca, manipulación del recurso biológico y su movilización en el territorio nacional, deberán obtener permiso de estudio, el cual incluirá todas las actividades solicitadas.

Artículo 4o. Competencia. De acuerdo a lo dispuesto por la Ley 99 de 1993, las autoridades ambientales competentes para el otorgamiento de los permisos de estudio con fines de investigación científica son: La Corporación Autónoma Regional o de Desarrollo Sostenible o los Grandes Centros Urbanos, cuando las actividades de investigación se desarrollen exclusivamente en sus respectivas jurisdicciones.

Artículo 6o. Requisitos de la solicitud. El interesado en obtener permiso de estudio con fines de investigación científica en diversidad biológica deberá presentar una solicitud escrita a la autoridad ambiental competente.

Artículo 21. Prohibición de comercializar especímenes o muestras obtenidos con fines de investigación científica. Los especímenes o muestras obtenidos en ejercicio del permiso de estudio con fines de investigación científica en diversidad biológica de que trata el presente decreto, no podrán ser aprovechados con fines comerciales³⁹.

El trabajo se desarrolló en una plantación de cultivo de palma africana a 47 kilómetros del municipio de Tumaco, Departamento de Nariño, vereda Vuelta Larga, Astorga S.A. (**Ver anexo B**).

Figura 10. Astorga S.A.



³⁹ MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE. Decreto 309 de 2000. Santafé de Bogotá : Ministerio de Medio Ambiente. 2000. 13 p.

Para la recolección del fruto de palma, se emplean animales de tracción como los mulares ya que son especies que llegan hasta lugares donde es imposible la entrada de vehículos de transporte, encontrándose una gran población de equinos, entre los cuales se ha presentado cuadros confirmados de MEP desde el año 2000. En relación a lo anterior, el trabajo buscó identificar a la zarigüeya como hospedador definitivo del *Sarcocystis sp*, causante de la patología en equinos mencionada, para lo cual se cumplieron tres fases:

?Se comprobó la clasificación taxonómica de la zarigüeya de la zona, remitiendo un espécimen al Depósito de Material Biológico del programa de Biología de la Universidad de Nariño, donde se realizó la identificación fenotípica (**ver anexo C**).

?Los animales fueron capturados por los pobladores, originalmente para su propio consumo, se realizó una inspección general que consistió en observar si los animales presentaban algún tipo de lesión, trauma visible y su condición corporal para ser tenidos en cuenta en los resultados de laboratorio. Posteriormente, se les tomó muestras hematológicas: Sangre entera en tubos con anticoagulante (EDTA) y para la obtención de sueros la recolección se realizó en tubos sin anticoagulante; en el cuál se determinó la presencia de la toxina del *Sarcocystis* “Sarcocystina” con la técnica de Elisa competitiva. La sangre entera fue utilizada para los análisis de hemograma completo con las técnicas comunes de laboratorio. Finalmente las zarigüeyas fueron regresadas a las personas que anteriormente las habían capturado, para su sacrificio y consumo, a través de su colaboración se logró obtener muestras de tejido de órganos como: Corazón, hígado y pulmón; además de la toma de diferentes partes de intestino: Duodeno, yeyuno, ileón y ciego con contenido fecal, para verificar la presencia del parásito por la técnica de Inmunofluorescencia directa.

?Las muestras de sangre fueron conservadas con hielo seco, las muestras de materia fecal y tejidos para histopatología se conservaron en formalina al 10%, se rotularon y enviaron en reveras de icopor con sumo cuidado a la ciudad de Bogotá, se remitieron a la Fundación Colombiana de Estudios Parasitológicos (FUNCEP), al director: Dr. José Luis Azumendi, dedicado al estudio específico de este parásito. En este centro se realizaron los procesos de análisis de todas las muestras, las cuales se enviaron por vía aérea desde Tumaco hacia FUNCEP. Al finalizar el muestreo los autores realizaron un viaje a la ciudad de Bogotá para el procesamiento y análisis de las muestras.

5.2.1 Método de captura Las quince zarigüeyas que se obtuvieron para la toma de las muestras (sangre, materia fecal y tejidos) fueron capturadas por los nativos de la región los cuales permitieron realizar el muestreo requerido para el estudio, esto con el objeto de dar cumplimiento a las recomendaciones exigidas por la autorización de CORPONARIÑO.

5.2.2 Manejo de las zarigüeyas. Los animales capturados por los pobladores fueron colocados en jaulas de 60 cm de ancho, 1 metro de largo por 70 cm de alto, con el fin de observar y describir alguna anomalía visible. Cada espécimen se mantuvo en cautiverio por un período de 2 horas hasta completar el muestreo.

Para la toma de muestra de sangre y material fecal fue necesaria la restricción manual de las zarigüeyas, si no se sujetan adecuadamente éstas pueden morder, hasta desgarrar la piel humana, sus reflejos son muy rápidos y morderán cualquier cosa que se mueva cerca de ellas. El método sugerido por Gilley ⁴⁰ para su manipulación es levantarlas lentamente por la base de la cola y ser sostenidas debajo de sus miembros delanteros o sobre sus espaldas y alrededor de la sección media. Debe usarse guantes de carnaza como protección para la captura si se va a realizar procedimientos médicos o en animales agresivos.

5.2.2.1 Recomendaciones de manejo. Existen una serie de pautas importantes a tener en cuenta a la hora de manejar estos animales, disminuyendo los riesgos y accidentes innecesarios.

??Tratar a los animales considerando sus necesidades reales, estableciendo una diferencia sensata entre los animales y el hombre. Las caricias pueden causar más daño que beneficio a los animales silvestres debido a que no están habituados y pueden estresarse, contrario a lo que ocurriría con un animal doméstico el cual se tranquilizaría con las mismas caricias.

??Al intentar capturar a un animal, no “empujarlo” hacia el riesgo.

??No manipular a los animales hasta no tener un plan claro de acción y todos los elementos listos.

??Disminuir la estimulación de los diferentes sentidos de los animales, absteniéndose de hacer ruido, disminuir la intensidad de la luz o cubrir los ojos.

??Evitar también hacer movimientos bruscos.

⁴⁰ UNIVERSIDAD DEL TOLIMA. Diplomado Internacional Medicina de Fauna Silvestre Neotropical Memorias 2. Zoo standards for Keeping newworld marsupials in captivity : Entrar a E: Medicina 2/memorias 2/medicina de mamíferos/AZA/neotropical opossums standars ?CD ROM? : Cali : Universidad del Tolima, 2004. Requerimientos hardware : Pentium 200 MHZ o superior; 32 MB de memoria RAM; 40 MB de espacio libre en disco duro; resolución en pantalla 800 x 600; unidad de CD ROM 4 X. Requerimientos de software : Windows 95 o superior; Microsoft Internet Explorer 4.5 o superior

¿?Cuando se suministre alimento, no debe caerse en el error de “servir” el alimento como si fuera para la persona que lo está haciendo. Se debe partir en trozos pequeños y contarlos es una buena alternativa para verificar que el animal está consumiendo.

“Todo cambio de dieta debe hacerse de manera progresiva, ya que su aparato digestivo requiere tiempo para adaptarse a nuevos ingredientes. Si no se hace el cambio lentamente, el animal puede morir “⁴¹.

5.2.3 Toma de muestras. La apropiada obtención y manejo de las muestras es indispensable para asegurar la exactitud y confiabilidad de los resultados.

5.2.3.1 Obtención de sangre. Una vez que la zarigüeya estuvo bien sujeta se procedió a la punción de la vena Yugular.

La yugular es el sitio recomendado para realizar la punción con el fin de obtener grandes volúmenes de sangre. Es muy móvil y puede ser algo difícil inmovilizarla. Pueden ocurrir grandes hematomas si no se tiene el cuidado para obtener una completa homeostasis. Una vez localizada se comprime ligeramente en la base del cuello.

Se procedió a depilar el área para una posterior desinfección con algodón y alcohol, del sitio de punción y así evitar contaminaciones de las muestras.

La vena se dilata con sangre y se hace mas visible, paso seguido se realiza la punción con aguja hipodérmica estéril y desechable calibre 21 a 23 G con una longitud de media a una pulgada. Después de la punción se mantiene la presión en el vaso para asegurar la homeostasis.

Se utilizó jeringas con capacidad de 10 ml, para la toma de sangre y su posterior distribución de la siguiente manera: 5 ml de sangre en tubos al vacío con tapa lila para la toma de la muestra con anticoagulante EDTA con capacidad de 10 ml. “Es el anticoagulante que mejor conserva las células y de mayor uso en todos los casos que requieren de cuadro hemático y hemoparásitos”⁴².

⁴¹ UNIVERSIDAD DEL TOLIMA. Diplomado Internacional Medicina de Fauna Silvestre Neotropical Memorias 1. Laboratorio clínico en fauna silvestre : Entrar a: E: Medicina 1/memorias 1/laboratorio clínico/laboratorio clínico 2004 ¿CD ROM? : Cali : Universidad del Tolima, 2004. Requerimientos hardware : Pentium 200 MHZ o superior; 32 MB de memoria RAM; 40 MB de espacio libre en disco duro; resolución en pantalla 800 x 600; unidad de CD ROM 4 X. Requerimientos de software : Windows 95 o superior; Microsoft Internet Explorer 4.5 o superior.

⁴² LABORATORIO MEDICO VETERINARIO. Manual de toma, almacenamiento y transporte de muestras para diagnóstico veterinario. Bogotá. LMV. 2003. 10 p.

Los cinco mililitros restantes en la jeringa fueron depositados en tubos al vacío sin anticoagulante, con tapa roja y capacidad de 10 ml, con el objeto de obtener suero sanguíneo lo cual se realizó de la siguiente forma: una vez se recolectó la sangre en el tubo, se colocó en una canastilla de tal forma que estos quedarán con una inclinación de 45 grados y así lograr la retracción del coagulo y la separación del suero.

5.2.3.2 Obtención de materia fecal. Para la recolección de materia fecal se utilizó el siguiente procedimiento:

??La muestra emitida espontáneamente fue la adecuada para realizar el examen coprológico por que así se evito estresar a los animales y su contaminación con agentes externos; cuando no es posible se debe usar un laxante salino como el sulfato de sodio para que los esporozoitos conserven sus características; los laxantes con aceite se eliminan en pequeñas gotas que dificultan su observación.

??La muestra fue recolectada en recipientes estériles de plástico, con boca ancha y tapa hermética, diseñado para la toma y manejo de la materia fecal con capacidad de 30 ml, se tomó aproximadamente 10 gramos de cada zarigüeya, cuando la muestra fue emitida de forma espontánea, las heces se recogieron de la parte superior que no tenia contacto con el piso.

??En todos los animales fue posible realizar el anterior procedimiento debido a su comportamiento, ya que cuando se sienten amenazados defecan y orinan constantemente, como método de defensa. La muestra fue manipulada con guantes.

??Como la eliminación de los parásitos en la materia fecal no es constante, el estudio de varias muestras aumenta la probabilidad de encontrar parásitos; por lo cual se envió dos muestras de materia fecal de cada zarigüeya.

5.2.3.3 Obtención de tejidos para Histopatología. Una vez los pobladores de la región sacrificaban las zarigüeyas, donaron las vísceras de las cuales se tomó: corazón, hígado, pulmón e intestino. De estos órganos se realizaron cortes delgados de máximo 1 cm de grueso desde la superficie hasta la mitad del espesor del órgano a muestrear. Se colocó los tejidos seleccionados en una solución de formol al 10%, con una relación de una parte de tejido por 10 de formol. Se usaron frascos de boca ancha de material plástico y herméticos.

5.2.4 Envío de muestras. Todas las muestras fueron debidamente rotuladas con la identificación de cada animal, fecha, sexo, nombre científico e inspección general antemortem, y listado de muestras remitidas y la información se recolecto en los formatos de toma y envió de muestras (**Ver anexo D y E**).

Para la conservación y posterior envío al laboratorio FUNCEP, las muestras fueron colocadas en cajas de icopor con hielo seco y cubierto de aserrín para evitar el contacto directo de los recipientes, una vez finalizado este procedimiento se enviaron por vía aérea al laboratorio en Bogotá.

5.3 TÉCNICAS DE LABORATORIO

El procesamiento de todas las muestras fue realizado en el laboratorio de la Fundación Colombiana de Estudio de Parásitos de la ciudad de Bogotá, donde se realizaron los siguientes procedimientos:

5.3.1 Examen coprológico. Los análisis de la materia fecal permiten determinar los esporozoitos, esporoquistes u ooquistes, procedentes de los huéspedes definitivos del *Sarcocystis*, la técnica mas usada para visualizar el parásito en las heces es la de flotación y se debe confirmar el diagnostico por Inmunofluorescencia directa.

5.3.1.1 Técnica de flotación. consiste en realizar una suspensión de las heces en agua, aproximadamente 2 gramos en 30 ml de agua. En un recipiente con tapón que se debe agitar vigorosamente hasta que se produce la suspensión.

- Llenar un tubo cónico de centrífuga de 15 ml en sus tres cuartas partes con la suspensión.
- Colocar el tubo en la centrífuga a 1.500 rpm durante 3 a 5 minutos.
- Eliminar el liquido sobrenadante del tubo vertiéndolo suavemente.
- Al sedimento resultante se le añade liquido de flotación, el cual es una solución de sacarosa que contiene 450 gramos de azúcar disuelto en 340 ml de agua.
- Se coloca el tubo en la centrífuga a 1.500 rpm durante 3 a 5 minutos.
- Con el tubo mantenido verticalmente se introduce una varilla de vidrio de extremo plano, hasta que su extremo tropiece con la superficie del liquido.
- Se toca con la varilla en el centro de un porta objetos limpio dejando el liquido sobre el.
- Aplicar un cubre objetos al liquido del porta objetos y examinar sistemáticamente la preparación a un aumento bajo.

5.3.1.2 Inmunofluorescencia directa. Se recomienda utilizar esta técnica para la Determinación y confirmación de esporozoitos, esporoquistes u ooquistes de *Sarcocystis* en materia fecal. Emplea anticuerpos monoclonales con marcación

fluorescente para la detección de estos. Es más sensible que la sucrosa y sulfato de zinc para detectar heces infectadas, sobre todo cuando la concentración de oocistos es reducida. El método requiere instrumental especial y las muestras pueden remitirse en formol al 10% o formol ácido acético-acetato sódico.

5.3.2 Pruebas hematológicas.

5.3.2.1 Cuadro hemático. Se midieron los siguientes parámetros: Recuento de Glóbulos rojos, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina y recuento de glóbulos blancos mediante el uso de cámara electrónica de conteo celular y recuento diferencial de neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, monocitos y basófilos con técnica de extendido sanguíneo y tinción de Wright.

5.3.2.2 Titulación de Toxina. Se cuantificó la concentración de toxina "Sarcocystina" en suero sanguíneo mediante la técnica de Elisa competitiva realizada por FUNCEP. Descripción de la técnica:

- Preparar soluciones al 1,0 ;1.5 y 2.0% de toxina en PBS.
- Sembrar 150 microl./pozo, en cubetas de 96 pozos inmulo 1 MR
- Incubar por una hora a 37°C.
- Incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
- Lavar 2 veces con PBS-Tween 0.5%
- Bloquear una hora a 37°C con PBS-Tween-Leche 5%.
- Lavar dos veces con PBS-Tween 0.5%
- Colocar 50microl/pozo de anticuerpo conjugado (Acc) diluido en PBS-Tween-Leche, usando diluciones dobles dese 1:2 hasta 1:2048.
- Incubar 1 hora a 37°C.
- Lavar 5 veces con PBS Tween.
- Preparar la solución reactiva.
- Agregar 100microl/pozo de solución reactiva.
- Revelar en oscuridad por 5 a 10 minutos.

- Frenar la reacción
- Leer.
- Con las lecturas de absorbancia trazar la gráfica y calcular las concentraciones óptimas de toxina y conjugado, a través del punto de equilibrio de la reacción, de esta forma se conocerá la cantidad de Acc. Necesaria para saturar la toxina existente en los pozos.

5.3.3 Histopatología. Para el análisis histopatológico se procesaron las muestras así: Para la fijación de los tejidos se colocan en formol al 10% para poder ser llevados a un procesador donde van a tomar deshidratación en alcoholes y xiloles, luego se hace un proceso de rehidratación también con alcoholes y xiloles para terminar en un recipiente con parafina para hacer los moldes. Una vez obtenida la forma se llevan las muestras para corte en el micrótopo, posteriormente se montan en láminas y se las lleva a un proceso de secado a 60°C durante 60 minutos para luego ser coloreados.

5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.4.1 Identificación de *Sarcocystis sp.* en materia fecal mediante prueba de Inmunofluorescencia directa. Para la prueba de Inmunofluorescencia directa se tomaron 15 muestras de materia fecal de *Didelphis marsupialis* de la plantación de palma africana Astorga S.A.

Para el estudio se aplicó un diseño de muestreo no probabilístico, los datos obtenidos permitieron determinar la tasa de prevalencia de *Sarcocystis sp.* en la zona muestreada:

$$\text{Tasa de prevalencia} = \frac{\text{Muestras positivas a Sarcocystis}}{\text{No. De muestras analizadas}} \times 100$$

5.4.2 Pruebas hematológicas

5.4.2.1 Cuadro hemático. FUNCEP realizó quince hemogramas completos de las muestras de zarigüeyas enviadas. Los resultados de cuadro hemático se relacionaron con los valores de referencia del pariente más cercano *Didelphis virginiana* del sistema I.S.I.S. (International Species Information System) y se comparó con los parámetros hemáticos de *Didelphis marsupialis* obtenidos, con los valores de *D. Virginia* reportada en este sistema con el fin de establecer relación con el estado de salud de los animales y los efectos de la toxina.

5.4.2.2 Titulación de toxina. De acuerdo con Azumendi⁴³ el valor de referencia significativo de titulación de toxina (sarcocystina) corresponde a concentraciones en sangre mayores a 50 UI/L. Valor a tener en cuenta para la comparación de las concentraciones de sarcocystina reportadas.

5.4.2.3 Relación toxina (sarcocystina) con hemogramas. Con la ayuda del programa informativo aplicado a la estadística STAT GRAPHICS y de las herramientas de Excel, se realizó la prueba de regresión simple entre las variables Toxina (sarcocystina) con cada uno de los parámetros hematológicos: Recuento de glóbulos rojos, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina, glóbulos rojos nucleados, concentración de hemoglobina corpuscular media recuento de glóbulos blancos, neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, monocitos, bandas, basófilos, y los recuentos absolutos de cada línea blanca; con el fin de establecer la relación entre la toxina y las concentraciones de las células sanguíneas.

Al realizar el análisis de la relación entre los parámetros hemáticos y toxina se determinó que solo existen diferencias estadísticamente significativas en Toxina Vs. Recuento de glóbulos rojos y Toxina Vs, recuento absoluto de linfocitos.

5.4.3 Histopatología. Se tomó muestras para histopatología a 9 *Didelphis marsupialis*, en relación con los resultados se aplicó estadística descriptiva para analizar los resultados reportados.

⁴³ ENTREVISTA AL doctor José Luis Azumendi Ollo (26 de mayo de 2005). Director científico de la Fundación Colombiana de Parásitos.

6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 IDENTIFICACIÓN DE SARCOCYSTIS EN MATERIA FECAL

La prevalencia estimada de *Sarcocystis sp.* en materia fecal para las zarigüeyas capturadas en Astorga S.A. fue del 100%, ya que en el total de los animales muestreados, en los resultados reportados por la Fundación Colombiana de Estudio de Parásitos (FUNCEP), todas las muestras arrojaron datos positivos a la presencia de ooquistes de *Sarcocystis sp.* a través de la observación directa del parásito por medio de las técnicas de flotación e Inmunofluorescencia directa.

$$\text{Tasa de Prevalencia} = \frac{\text{Muestras positivas a Sarcocystis}}{\text{No. De muestras analizadas}} \times 100$$

$$\text{Tasa de prevalencia} = \frac{15}{15} \times 100$$

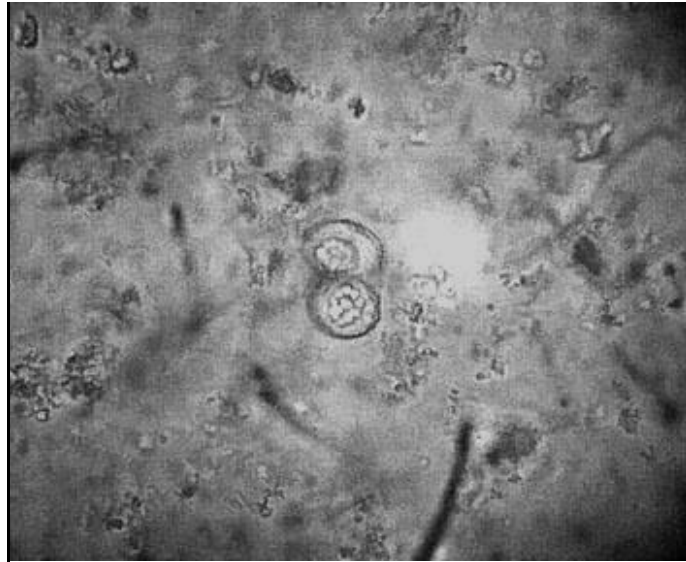
$$\text{Tasa de Prevalencia} = 100\%$$

De acuerdo el diseño de muestreo no probabilístico, esta prevalencia es válida solo para la zona de muestreo realizado en Astorga S.A. ubicada en la vereda Vuelta Larga, municipio de Tumaco.

Estos altos niveles no sorprenden debido a que coinciden con los estudios de prevalencia y distribución de *Sarcocystis sp.* en diferentes especies animales incluyendo animales silvestres. Además estos resultados podrían sugerir un alto endemismo del parásito en la zona.

La significativa prevalencia encontrada en este estudio merece ser tenida en cuenta ya que cabe la posibilidad que exista una relación directa o indirecta de las zarigüeyas (*D. marsupialis.*) con la transmisión de la Mieloencefalitis protozoaria Equina (MEP) debido al contacto permanente entre las dos especies. Por sus hábitos nocturnos estos marsupiales llegan a alimentarse de los restos de alimento en los comederos como la torta de palimiste y pastos de corte que se suministra a los equinos en la plantación. Es preciso anotar que existe la posibilidad que las zarigüeyas a través de las heces, puedan estar contaminando agua y alimentos existentes en los lotes de trabajo, debido a los casos reportados anteriormente en Astorga S.A. donde fueron diagnosticados 24 mulares confirmados con MEP por el Doctor Azumendi en el año 2000. Además de las muertes que han ocurrido en la región hasta la fecha , 250 aproximadamente y se le han atribuido a dicha patología.

Figura 11 . Microfotografías de extendido de heces de zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*) muestreadas (40x).



Fuente: Laboratorio FUNCEP

Figura 12. Ooquistes de Sarcocystis en zarigüeyas (*D. marsupialis*) muestreadas (40X).



Fuente: Laboratorio FUNCEP

6.2 CUADRO HEMÁTICO

Al realizar la comparación de los datos obtenidos de los hemogramas de las 15 zarigüeyas muestreadas (*Didelphis marsupialis*), con la referencia de rangos fisiológicos de *Didelphis virginiana* reportados en el sistema I.S.I.S. sobre cuadro hemático se obtuvo que:

- La mayoría de los animales no presentaron alteraciones hematológicas ya que gran parte de los rangos estaban dentro de los parámetros reportados como normales en I.S.I.S. y a la inspección general se observaron aparentemente normales.
- Lo anterior sugiere que estos son portadores asintomáticos del *Sarcocystis*, característica que podría relacionarse con las pocas evidencias disponibles en la literatura sobre la patogenicidad del parásito en el Hospedador Definitivo; “según comentarios de Gestrich, el *Sarcocystis* es más patógeno para el hospedador intermediario que para el hospedador definitivo; Dubey afirmó que el parásito no es patógeno para el hospedador definitivo ⁴⁴”.

⁴⁴ AZUMENDI, José Luis. Enfermedades relacionadas con el *Sarcocystis*. Op, cit. p.78.

Cuadro 5. Toxina – Recuentos Absolutos en muestras de zarigüeyas muestreadas.

| No. | Toxina | AB-NEU | AB-LIN | AB-EOS | AB-MON | AB-BAN | AB-BAS | AB-GRN |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 79 | 7,38 | 3,32 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 2 | 94 | 10,46 | 5,48 | 0,50 | 0,00 | 0,00 | 0,17 | 0,33 |
| 3 | 95 | 28,24 | 6,15 | 0,72 | 1,09 | 0,00 | 0,00 | 1,81 |
| 4 | 123 | 5,41 | 11,32 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,17 | 0,00 |
| 5 | 131 | 5,24 | 3,22 | 0,37 | 0,18 | 0,00 | 0,18 | 0,09 |
| 6 | 153 | 0,90 | 2,55 | 0,23 | 0,00 | 0,00 | 0,08 | 0,00 |
| 7 | 154 | 5,92 | 11,27 | 1,72 | 0,00 | 0,00 | 0,19 | 0,19 |
| 8 | 209 | 9,06 | 11,27 | 1,33 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,87 |
| 9 | 214 | 9,33 | 10,60 | 1,06 | 0,21 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 10 | 220 | 24,89 | 9,38 | 6,12 | 0,41 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 11 | 240 | 8,32 | 7,75 | 2,84 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,19 |
| 12 | 261 | 7,47 | 7,00 | 1,27 | 0,16 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 13 | 321 | 2,36 | 10,70 | 0,83 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 14 | 335 | 5,04 | 12,42 | 1,94 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 15 | 393 | 18,32 | 13,65 | 1,33 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

Solo un pequeño porcentaje mostró diferencias en su cuadro hemático:

De las 15 zarigüeyas muestreadas, el 13.33% tuvo disminución en el recuento de glóbulos rojos, 6.6% presentó disminución en el hematocrito, 13.33% mostró aumento en el volumen corpuscular medio, 20% expuso disminución de la hemoglobina, 6.6% indicó leucocitosis, 13.33% reveló neutrofilia absoluta.

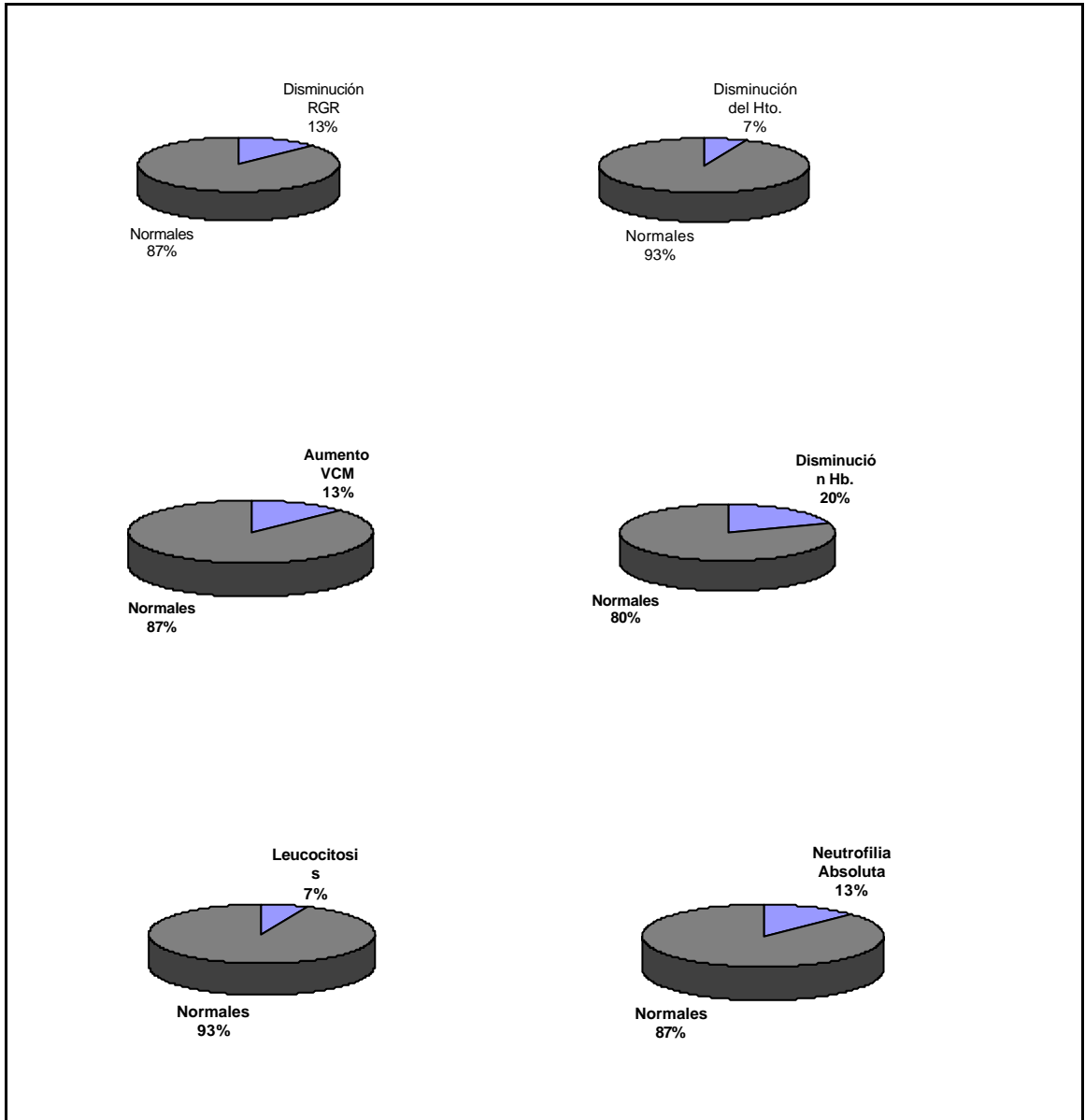
Los anteriores cambios no solo se pueden atribuir a la presencia del *Sarcocystis* como tal sino también a factores como nutrición, estrés, medio ambiente, traumas y enfermedades no detectadas por la inspección clínica.

6.3 TITULACION DE TOXINA (SARCOCYSTINA)

Según los reportes emitidos por FUNCEP, en las 15 muestras se tituló Sarcocystina por encima del valor de referencia (50 UI/L), con un mínimo de 79 UI/L, un máximo de 393 UI/L y un promedio de 201.46 UI/L (cuadro 3). Valores a tener en cuenta por el efecto toxicogénico de la toxina. Al respecto Azumendi ⁴⁵ afirma que el efecto patológico del *Sarcocystis* está relacionado más con el efecto toxicológico de la toxina que con el parásito en sí mismo, así la toxina circulante es la principal responsable de las alteraciones que se producen en los

⁴⁵ Ibid., p.78-80.

Figura 13. Resultados cuadro hemático zarigüeyas.



animales que sufren *sarcosporidiosis* o *sarcocystosis*.

La toxina es producida por el parásito mientras vive y se reproduce en el intestino del hospedador definitivo o en los quistes del hospedador intermediario. Cuando la toxina llega al torrente circulatorio y por medio de este va a todo el organismo del hospedador, produce una serie de cambios en el funcionamiento de varios órganos y sistemas como el efecto mitogénico sobre linfocitos B; debido a su

comportamiento histaminoide causa congestión pasiva crónica con sus consecuencias, entre otros.

Cuadro 6. Titulación de toxina en muestras de Zarigüeyas

| No. | Toxina (Sarcocystina) UI/L |
|-----|-------------------------------|
| 1 | 79 |
| 2 | 94 |
| 3 | 95 |
| 4 | 123 |
| 5 | 131 |
| 6 | 153 |
| 7 | 154 |
| 8 | 209 |
| 9 | 214 |
| 10 | 220 |
| 11 | 240 |
| 12 | 261 |
| 13 | 321 |
| 14 | 335 |
| 15 | 393 |

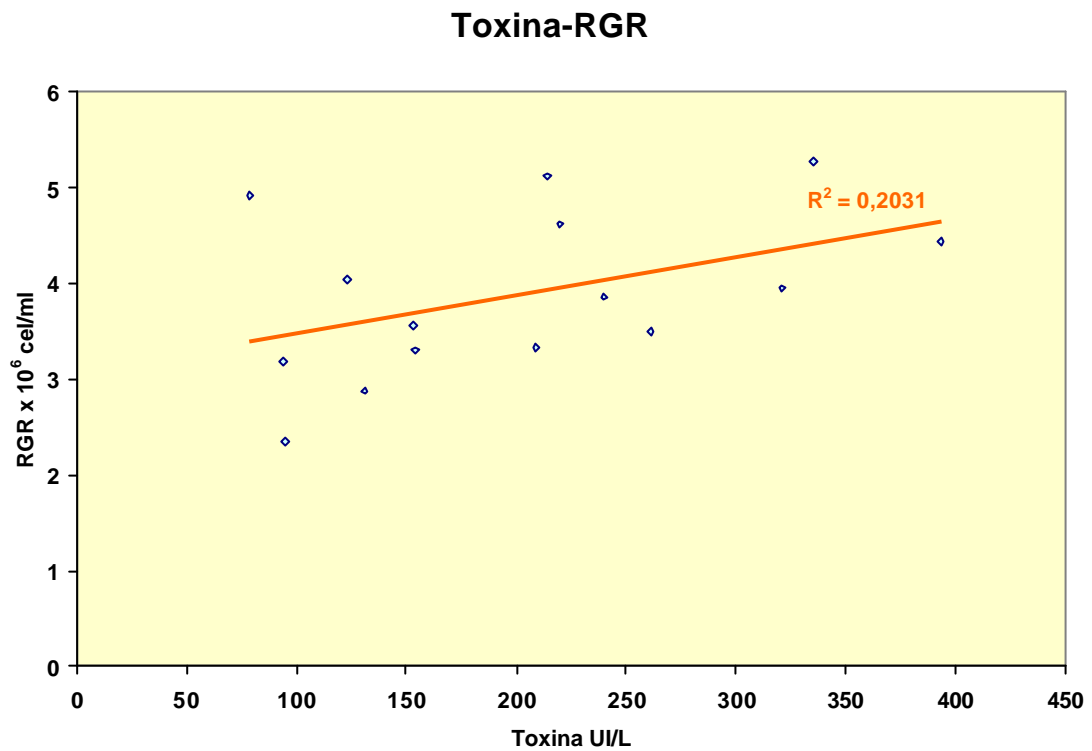
Azumendi describe que el proyecto de investigación “Sarcocystis en Colombia y estudios preliminares mostraron que realmente las lesiones encontradas en los hospedadores no eran causadas por acción directa del parásito, sino por alguna o algunas sustancias de su metabolismo”⁴⁶.

6.4 RELACIÓN TOXINA – HEMOGRAMAS

De acuerdo a la prueba de regresión simple realizada mediante el programa STAT GRAPHICS se encontró una relación estadísticamente significativa entre Toxina – Recuento de Glóbulos Rojos (RGR) Y Toxina – Recuento absoluto de Linfocitos. **(ver anexos F y G)**

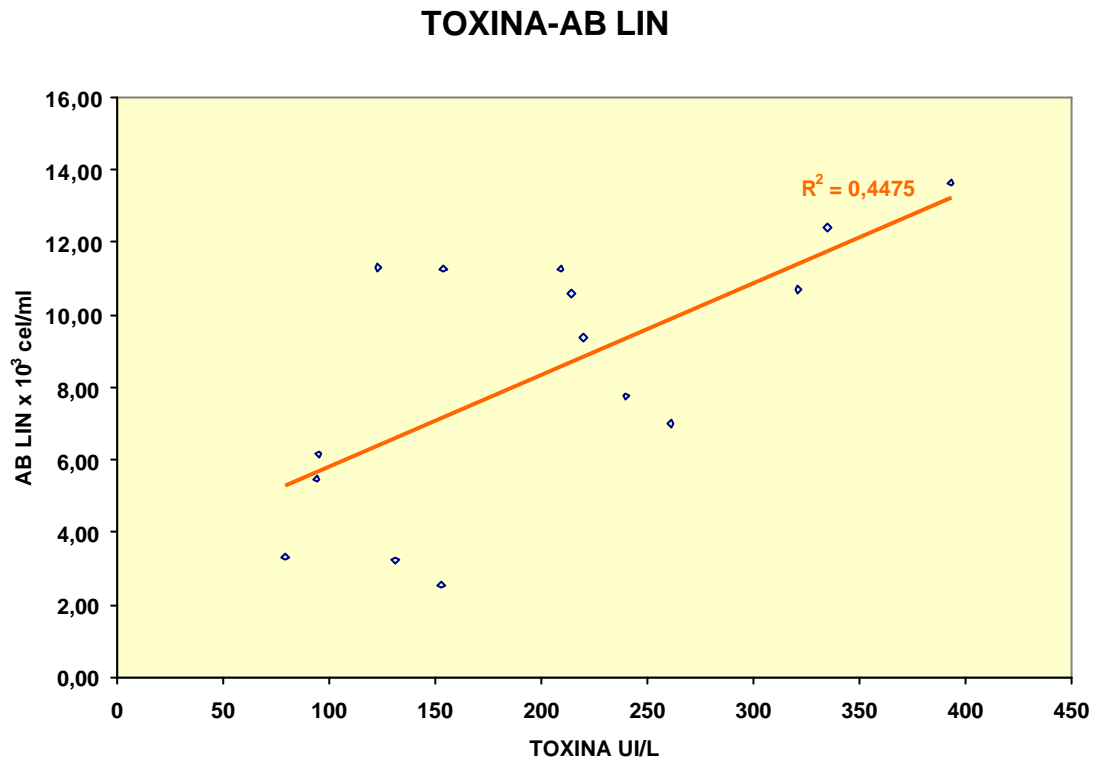
⁴⁶ Ibid., p. 81.

Figura 14. Relación toxina (Sarcocystina) – Recuento de glóbulos Rojos en muestras de zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*)



La figura 12 y el análisis del programa muestran que existe una relación relativamente débil entre sarcocystina y Recuento de Glóbulos Rojos, con un 20.31% de variabilidad en RGR. La línea de tendencia muestra que a mayor título de toxina el RGR es mayor. Este Resultado puede deberse al efecto de la toxina a nivel circulatorio debido a su comportamiento histaminoide, la toxina va a producir una reacción similar a la histamina, aumenta la presión venosa y disminuye la presión arterial, causando una congestión pasiva crónica que conlleva a una hipoxia generalizada y la respuesta compensatoria del organismo se muestra con un aumento de glóbulos rojos (eritrocitosis).

Figura15. Relación Toxina – Recuento absoluto de linfocitos en muestras de zarigüeyas (*D. Marsupialis*)



La figura 13 y el análisis del programa muestran que existe una fuerte relación entre la toxina y el recuento absoluto de linfocitos, con un porcentaje de variabilidad del 44.75% en este recuento.

A pesar que los animales no presentan linfocitosis absoluta al compararlos con los valores fisiológicos de referencia de *Didelphis virginiana*, se observa que la línea de tendencia muestra que a mayor titulación de toxina aumenta el recuento absoluto de linfocitos.

Mientras exista la toxina “Sarcocystina”, los linfocitos B se verán estimulados a reproducirse a mayor velocidad de la normal, lo que conlleva a que en muchos casos se desarrolle una hiperplasia linfoide y además se debe tener en cuenta que estos linfocitos no van a funcionar normalmente.

Azumendi ⁴⁷ describe que se ha reportado una molécula de la sarcocystina, la

⁴⁷ Ibid., p. 81.

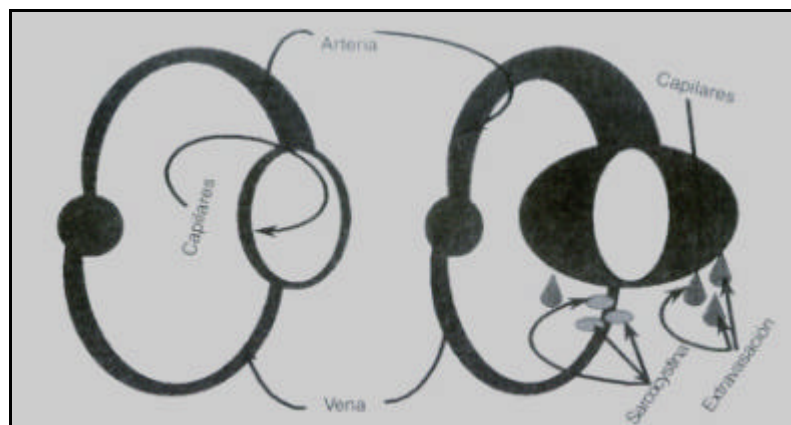
lectina que se comporta como mitógeno de los linfocitos B, y a esta se le ha relacionado con las alteraciones linfocitarias existentes en bovinos que sufren sarcosporidiosis, además se le ha atribuido la capacidad de estimular a los monocitos en la producción y liberación de factor necrosante tumoral.

En investigaciones realizadas por el mismo autor y colaboradores, han podido confirmar el hecho, realizando contaminaciones experimentales en diferentes especies y correlacionando en casos clínicos los recuentos de linfocitos con los recuentos de Sarcocystina en sangre.

6.5 HISTOPATOLOGÍA

En las 9 zarigüeyas muestreadas para Histopatología se obtuvo que: El 55 % : se observó con una congestión pasiva manifiesta principalmente en corazón, hígado, pulmón e intestino. Una anomalía que se puede atribuir a la respuesta hemodinámica a la Sarcocystina: Su efecto toxicogénico produce el aumento de la presión venosa y la disminución de la presión arterial hace que la sangre se acumule en los capilares sanguíneos, dilatándolos al punto de lograr que los poros intercelulares sean lo suficientemente grandes para permitir la extravasación de líquidos y en ocasiones también componentes morfos (células). En el hospedador intermediario la toxina en grandes cantidades afecta el corazón y al hígado pudiendo ser mortal.

Figura 16 . Respuesta hemodinámica a la Sarcocystina. Se esquematiza lo que se puede considerar el estado normal de la circulación sanguínea (mitad izquierda) y lo que sucede por el efecto toxicogénico de la sarcocystina (mitad derecha)



Fuente: AZUMENDI, José Luis. Enfermedades relacionadas con el Sarcocystis. Bogotá : Diseño y Recursos Gráficos 2000. 1997. p. 89.

Figura 17. Corte histopatológico de pulmón de zarigüeya muestreada.

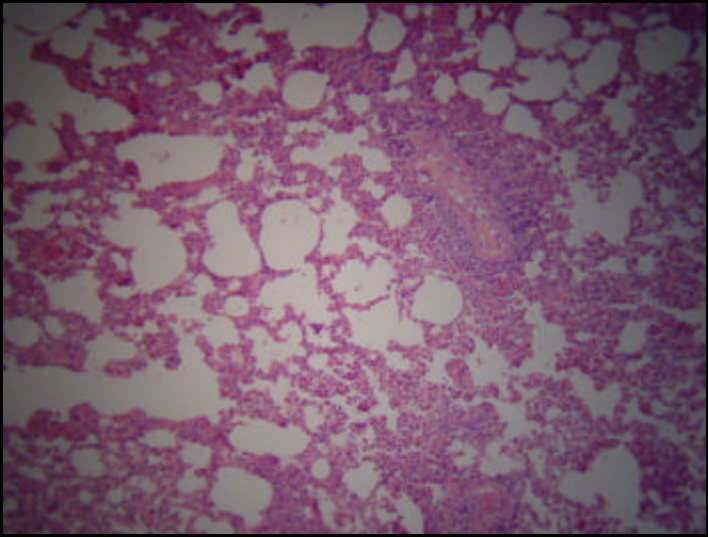
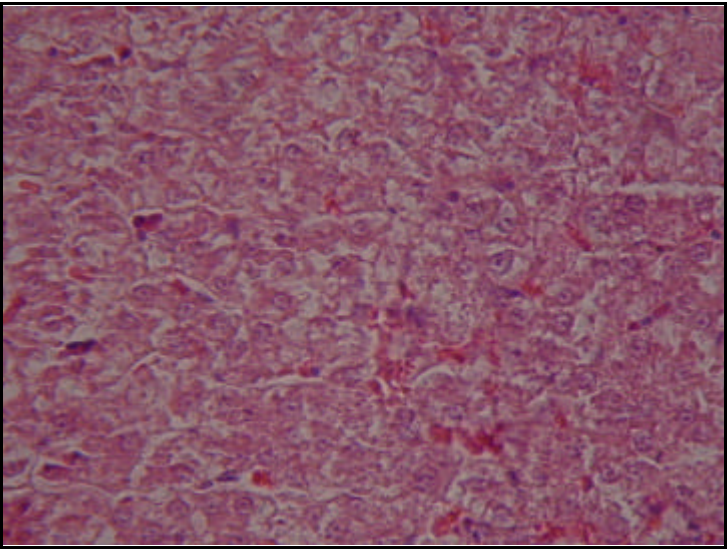
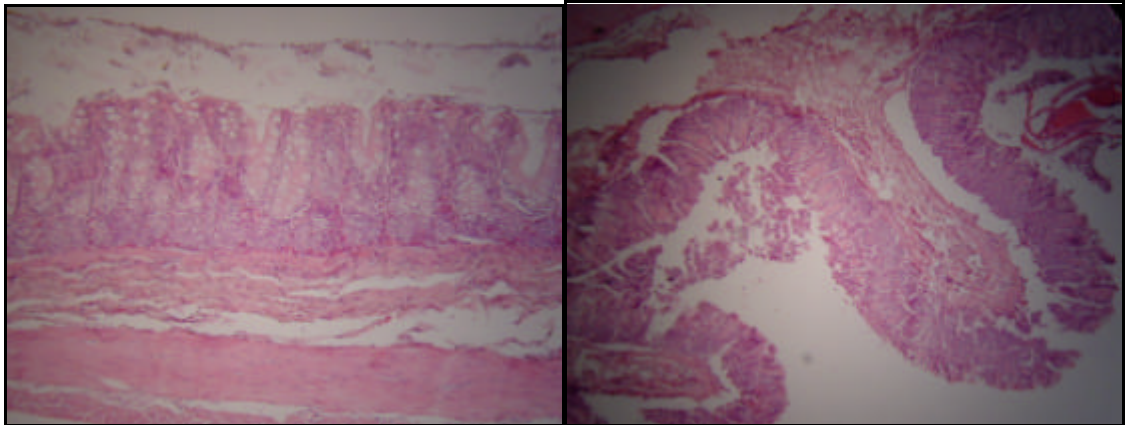


Figura18. Corte histopatológico de hígado de zarigüeya muestreada



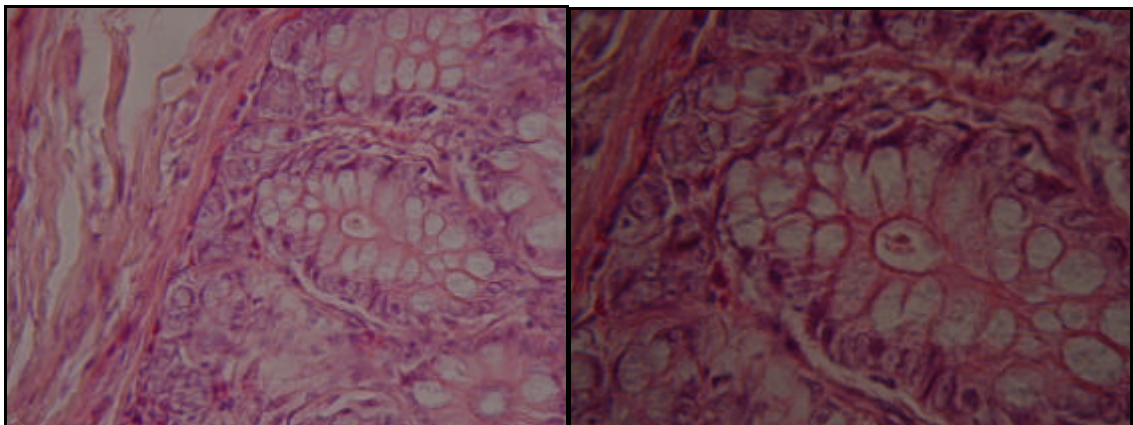
De la 9 zarigüeyas el 77.7% presentó enteritis focal, posiblemente debido al ciclo sexual del *Sarcocystis* en las células epiteliales del intestino delgado.

Figura 19. Cortes histopatológicos de intestino de zarigüeyas muestreadas.



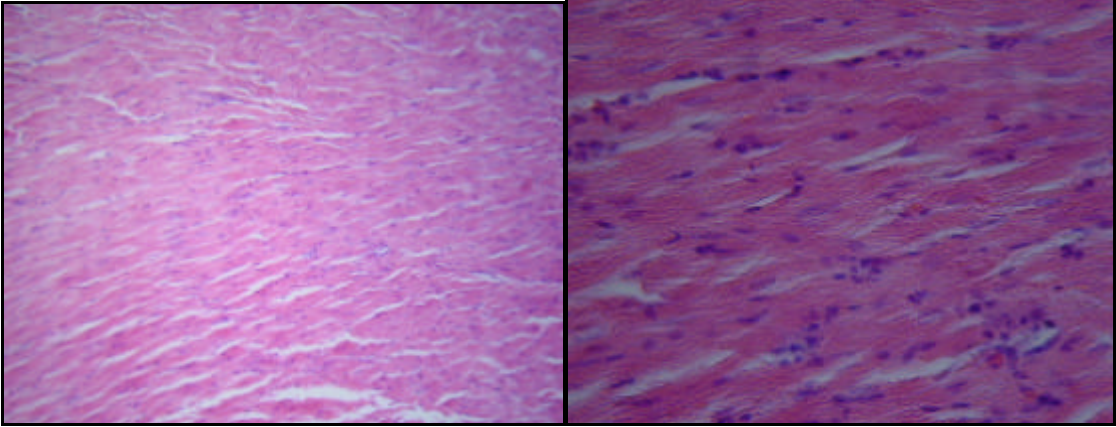
El 22.2% de las zarigüeyas mostró la presencia del parásito en lámina propia de intestino delgado, lo que demuestra el ciclo sexual del *sarcocystis*, comprobando la hipótesis en las zarigüeyas muestreadas de ser hospedadores definitivos.

Figura 20. Cortes histopatológicos de intestino delgado de zarigüeyas muestreadas. Nótese la presencia de *Sarcocystis*.



En ninguna de las muestras para histopatología se halló la presencia de quistes en músculos, este resultado corrobora y excluye al parásito de tener una fase de reproducción asexual con presencia de quistes, característica que identifica a los hospedadores definitivos del parásito.

Figura 21. Cortes histopatológicos de músculo cardíaco en zarigüeyas muestreadas.



7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

- Se concluye que Las zarigüeyas estudiadas eliminan ooquistes de sarcocystis en materia fecal y la observación en lámina propia de Intestino delgado revela que el parásito esta cumpliendo su fase sexual a nivel intestinal, lo cuál corrobora completamente la hipótesis que la especie en mención es hospedador definitivo del *Sarcocystis sp* en la zona muestreada.
- De acuerdo a los resultados obtenidos de los exámenes coprológicos de las 15 zarigüeyas, se concluye que en todas las muestras se encontró ooquistes de *Sarcocystis* lo que determina una prevalencia del 100%. Prevalencia válida solo para la zona muestreada.
- Los resultados obtenidos del recuento de sarcocystina en zarigüeyas, superan el parámetro normal de referencia 50 UI/L , las 15 muestras presentaron titulación de sarcocystina con un mínimo de 79 UI/L, un máximo de 393 UI/L y un promedio de 201.46 UI/L. De acuerdo a esto, se concluye que la presencia del parásito es indiscutible en esta especie.
- La mayoría de los animales muestreados se encontraron aparentemente sanos al analizar y comparar sus hemogramas pero con resultados positivos al sarcocystis, lo que permite pensar en una fuerte tolerancia por parte de esta especie a la toxina del parásito.
- Los resultados de histopatología de 9 zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*), permiten esclarecer que estas no se comportan como hospedadores intermediarios ya que no se encontró quiste de sarcocystis en músculo.
- De acuerdo al protocolo de diagnóstico de *Sarcocystis* recomendado por FUNCEP, en relación al análisis de hemogramas Vs. Sarcocystina se comprobó que existe variabilidad entre el recuento absoluto de linfocitos y la cantidad de sarcocystina presente el las zarigüeyas; lo cual tiene relación con los efectos de la toxina reportados en la literatura.
- Debido al desconocimiento que se tiene en cuanto a los hospedadores definitivos del sarcocystis neurona, causante de la Mieloencefalitis protozoaria equina en los mulares de Astorga S.A. S concluye que la zarigüeya tiene un papel importante en la transmisión del sarcocystis, debido a la posible contaminación de alimentos como la torta de palmiste, o la contaminación de agua y pastos debido a la presencia de este protozoario en la materia fecal de estos animales.

7.2 RECOMENDACIONES

- Dada la alta prevalencia del *Sarcocystis* sp encontrada en zarigüeyas, se recomienda realizar otros estudios que comprueben que los ooquistes eliminados por estos marsupiales corresponden a la especie *Sarcocystis neurona* y, así poder establecer la cadena epidemiológica de la mieloencefalitis protozoaria equina en Colombia con relación a sus hospedadores definitivos, intermediarios o aberrantes.
- Los estudios posteriores deberían estar encaminados a realizar el aislamiento del parásito obtenido de las heces de las zarigüeyas, replicándolo en un medio de cultivo para ser inoculado en equinos y reproducir la enfermedad en ambiente controlado, con el fin de comprobar si las zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*) tiene relación con la transmisión del *Sarcocystis neurona*.
- Se debe suministrar información a los habitantes de la región respecto a las consecuencias que puede traer el consumo de las zarigüeyas como fuente de proteína animal. Es importante mencionar que el *Sarcocystis* es zoonótico y los humanos que consumen estos animales se pueden contaminar. Al conocer esta información es posible que este estudio contribuya en la conservación de la *Didelphis marsupialis*, la cual es altamente traficada y amenazada por los habitantes de esta región.
- En futuros estudios epidemiológicos sobre *Sarcocystis*, se recomienda a Médicos Veterinarios correlacionar los aspectos clínicos con la prevalencia de *Sarcocystis* sp, para observar y determinar las posibles variaciones del comportamiento del parásito en los huéspedes definitivos.
- Se recomienda que el presente estudio sea la base para investigaciones posteriores en el país en cuanto a pruebas de laboratorio de animales silvestres y de este modo se realicé aportes para conocer datos de referencia clínicos (hematológicos, fisiológicos y de química sanguínea) para incrementar la base de datos de estas especies.
- Para prevenir la sarcosporidiosis y sarcocystosis es necesario el control del parásito rompiendo su ciclo de vida. Esto se puede lograr mediante la implementación de cebos con principios activos que actúen contra este tipo de coccidias en lugares estratégicos como mulerías, establos y corrales. Además los cuerpos de los animales que mueran en las explotaciones deben ser , removidos y enterrados antes de que los carnívoros o carroñeros los consuman.
- Para el control del posible contagio de Mieloencefalitis Protozoaria en los equinos de la empresa Astorga S.A. se recomienda establecer estrategias que minimicen

la posibilidad de transmisión del parásito a los hospedadores intermediarios o aberrantes (equinos) mediante la adopción de medidas como:

- Al suministrar a los equinos la torta de palmiste en horas de la tarde se debe dar poca cantidad o la cantidad necesaria para que no se acumule por las noches y llame la atención de las zarigüeyas que se acercan a los comederos para alimentarse.

- Cambiar el agua de los bebederos todas las mañanas.

- Evitar acumuló de basura y desperdicios cerca de los establos, para que evitar que este tipo de animales se acerquen a los sitios de permanencia de los animales domésticos.

- Modificar el régimen de trabajo de las mulas en lo posible que trabajen 4 y descansen 3.

- Controlar el estrés de los animales, este es un factor predisponente para que el Sarcocystis al encontrar a los equinos inmunodeprimidos se active y libere su toxina, sustancia que causa la enfermedad en etapa aguda.

- Para evitar brotes de Sarcocystis, se debe desinfectar y el tratamiento mas efectivo es el calor, ya que los desinfectantes comunes no atacan con facilidad los esporoquistes del Sarcocystis neurona en el alimento de los equinos y el medio ambiente.

- Finalmente se recomienda realizar investigaciones posteriores ampliando el área de muestreo y el número de animales alrededor de la zona muestreada con el fin de dar un diagnostico concluyente con respecto a los hospedadores que intervienen en el ciclo del parásito y así extrapolar los resultados a otras regiones del país.

BIBLIOGRAFÍA

AZUMENDI, José Luis. Enfermedades relacionadas con el *Sarcocystis*. Bogotá : Diseño y Recursos Gráficos 2000. 1997. 160 p.

_____. Mieloencefalitis protozoaria equina. En : I SEMINARIO REGIONAL DE MEDICINA VETERINARIA (3 : 2004 : San Juan de Pasto). Memorias del I Seminario Regional de Medicina Veterinaria. San Juan de Pasto : Universidad de Nariño, 2004. 6 p.

AZUMENDI, José Luis; GRANDA, I. Efectos de la toxina de *sarcocystis*. En : Revista salud animal. Santa Fé de Bogotá. Vol. 17, No.1,(1995). p.273-284.

BENAVIDES ROMO, Katia Luz Andrea; VITERI OCAÑA, Néstor Andrés. Prevalencia del *Sarcocystis* en bovinos sacrificados en el matadero Frigovito de San Juan de Pasto Nariño. San Juan de Pasto, 2000, 60 p. Trabajo de grado (médico veterinario). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Pecuarias. Programa de Medicina Veterinaria.

BUS, B. M. Manual veterinario de laboratorio. Zaragoza : Editorial Acribia. 1982. 467p.

CEDEÑO Quevedo, Darío Alejandro. Enfermedades neurológicas en equinos. En : I SEMINARIO REGIONAL DE MEDICINA VETERINARIA (2 : 2004 : San Juan de Pasto). Memorias del I Seminario Regional de Medicina Veterinaria. San Juan de Pasto : Universidad de Nariño, 2004. 26 p.

_____. Informe visita médico veterinario. INFORME DE VISITA PRESENTADO A ASTORGA S.A. Tumaco, marzo de 2000. 2 p.

CEDEÑO Quevedo, Darío Alejandro; AZUMENDI, José Luis; GONZÁLES, Gustavo. Casos clínicos de Mieloencefalitis Protozoaria Equina en mulas de una granja en Tumaco. En : Revista Medicina Veterinaria UDENAR. Pasto. Vol.1, No.2; (2.000). p.7,8,9,10,11.

DUBEY, J. P. ; LINDSAY, D. S.; KWOK, O.C.; SHEN, S.K. The gamma interferon knockout mouse model for *Sarcocystis* neurona comparison of infectivity of sporocysts and merozoites and routes of inoculation. Journal of parasitology. Vol.87. No.5. 2001.p.1171-1173.

DUBEY, J. P. ; LINDSAY, D. S.; REZENDE, P. C. B. ; COSTA, A. J. Characterization of an Unidentified *Sarcocystis falcatula* like Parasite from the south American Opossum, *Didelphis albiventris* from Brazil. Journal of Eukaryotic Microbiology. Vol 47. No. 6.2000. p.538-534.

DUBEY, J. P. ; LINDSAY, D. S.; VENTURINI, L.; VENTURINI C. Characterization of *Sarcocystis falcatula* isolates from the argentinian opossum, *Didelphis albiventris* Journal of Eukaryotic microbiology. Vol. 47. No. 3. 2000. p 260-263.

DUBEY, J. P. ; SPEER, C. A.; BOWMAN, D. D.; HORTON, K. M.; VENTURINI, C. L. Experimental transmission of *Sarcocystis speeri* Dubey and Lindsay, 1999 from the south American opossum (*Didelphis albiventris*) to the North American opossum (*Didelphis virginiana*). Journal of parasitology. Vol. 86. No. 3. 2000. p.624-627.

DUBEY, J. P.; SAVILLE, W. J.; SREEKUMAR, C.; SHEN, S. K. LINDSAY, D. S.; PENA, H. F.; VIANNA, M. C.; GENNARI, S. M.; REED, S. M. Effects of high temperature and disinfectants on the viability of *Sarcocystis neurona* sporocysts. Journal of parasitology. Vol.88. No. 6, 2002. p. 1252-1254.

DUBEY, J.P. *Sarcocystis neurona* sp. (protozoa Apicomplexa), the etiological agent of equine protozoal myeloencephalitis. Journal of parasitology. 1991. p.7,77,212,218.

DUBEY, J.P; LINDSAY, D.S.; ROSENTHAL, B.M. Isolates of sarcocystis falcatula-like organism from south American opossums *Didelphis marsupialis* and *Didelphis albiventris* from Sao Paulo Brazil. Journal of parasitology. Vol 87. No. 6. 2001. p.1449-1453.

EMMONS, LOUISE H. Mamíferos de los bosques húmedos de América tropical. Santa Cruz de la Sierra : F.A.N., 1999. p.14,15,16,17,18,19.

FENGER, C.K. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of sarcocystis neurona. Journal of parasitology. Vol.81. No. 6. 916-919. 1995.

HAGMANN, K. Marsupialis didelfo (en línea). En : Accessed animal de la diversidad (2003). (Consultada: 19 ener. 2005). Disponible en la dirección electrónica: -----

http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Didelphis_marsupialis.html.

JACQUES EUZEB. Los parásitos de las carnes : Epidemiología, Fisiopatología, Incidencias Zoonóticas. España. Ed. Acribia., 2001.

LABORATORIO MEDICO VETERINARIO. Manual de toma, almacenamiento y transporte de muestras para diagnóstico veterinario. Bogotá : LMV. 2001. 9 p.

MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE. Decreto 309 de 2000. Santafé de Bogotá : Ministerio de Medio Ambiente. 2000. 13 p.

NAVARRO, José Fernando; MUÑOZ, Javier. Manual de huellas de algunos mamíferos terrestres de Colombia. Medellín : Editorial Universidad de Antioquia.,2000. 120p.

OLIVER, Olimpo. Mieloencefalitis protozoica equina. En : Conferencia Mieloencefalitis protozoica equina. (1, 2003 : Bogotá). Memorias de la conferencia Mieloencefalitis protozoica equina. Bogotá : Laboratorio Genfar, 2003. 13 p.

QUIJANO VODNIZA, Armando José. Mecanismos e instrumentos para la planificación, seguimiento y evaluación de los proyectos de investigación. San Juan de Pasto : Impresores Johndan., 2004. 136 p.

SAMUEL, William M; PYBUS, Margo J; KOCAN, A. Alan. Parasitic diseases of wild mammals. Iowa State : University Press, 2001. p. 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504.

SANCHEZ RODRIGUEZ, Karina. Prevalencia de anticuerpos contra Brucella y concentración de Sarcocystina en empleados de plantas de sacrificio y beneficio animal. Santafé de Bogotá, 2003, 163 p. Trabajo de grado (médico veterinario). UDCA. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Programa de Medicina Veterinaria.

TIZARD, Ian. Inmunología Veterinaria. México : Interamericana. Mc Graw Hill, 1989. p. 136,137,138,139.

TRUJILLO et al. *Didelphis marsupialis* como un reservorio potencial u hospedero amplificador para el virus de la estomatitis vesicular serotipo *New Jersey*. En : Revista Colciencias Ciencias Pecuarias. Bogotá. Vol.16 (2003) p. 37.

UNIVERSIDAD DEL TOLIMA. Diplomado Internacional Medicina de Fauna Silvestre Neotropical Memorias. ?CD ROM? : Cali : Universidad del Tolima, 2004. Requerimientos hardware : Pentium 200 MHZ o superior; 32 MB de memoria RAM; 40 MB de espacio libre en disco duro; resolución en pantalla 800 x 600; unidad de CD ROM 4 X. Requerimientos de software : Windows 95 o superior; Microsoft Internet Explorer 4.5 o superior

ANEXOS

Anexo A. Autorización CORPONARIÑO



CORPORACION AUTONOMA REGIONAL DE NARIÑO

EL SUBDIRECTOR DE CONOCIMIENTO Y EVALUACIÓN AMBIENTAL DE
CORPONARIÑO

AUTORIZA

A los señores, ERIKA TATIANA LOPEZ Y ESTEBAN CADENA VINUEZA, Estudiantes del Programa Medicina Veterinaria de la Universidad de Nariño para realizar la utilización de 15 ejemplares de la especie *Zarigüeya Gris Común* (*Didelphis marsupialis*) localizados en dos plantaciones de palma africana, Municipio de Tumaco, con el objeto de realizar estudios histopatológicos, hematológicos y coprológicos para determinar que este animal es el hospedador definitivo del parásito: *Sarcocystis neurona*, agente etiológico de la Mieloencefalitis protozoaria equina, enfermedad que está disminuyendo progresivamente la población equina (mulos y caballos) en el área de influencia de la zona de palma africana.

Lo anterior con el objeto de dar cumplimiento a lo estipulado en el artículo 1608/74, artículo 87 y 90 sección segunda de la caza científica, que contempla la relación con prácticas con fines de estudios. Los titulares de permiso de estudio podrán tomar en ejercicio de la caza científica los individuos, especímenes o productos indispensables para el desarrollo de su investigación o estudio dentro del País, pero no podrán sacarlos del País ni comercializar con ellos de ninguna forma ni por sí ni por interpuestas personas.

Con la captura de estos animales no se afectará la población de esta especie puesto que presenta alta abundancia en la zona.

Complementariamente se recomienda;

- > Utilizar los ejemplares para su estudio los capturados por los pobladores de la zona sin tener que recurrir a nuevas capturas.
- > No sacar estos animales y/o subproductos de ellos fuera del País.
- > Los animales capturados por los pobladores de la zona que van a ser utilizados por los estudiantes en el proyecto de investigación deben ser colocados en jaulas cómodas que no atenten contra la salud del animal.
- > Inmediatamente se termine el estudio enviar un resumen ejecutivo a Corponariño con resultados y conclusiones de la investigación.
- > El tiempo de duración de esta autorización será de sesenta (60) días a partir de su notificación.

La presente autorización, se profiere en Pasto, a los cuatro (4) días del mes de Marzo de 2005.


JORGE AUGUSTO CHAVEZ MENDEZ

Preparó: Armando Arroyo O.
Revisó: José Luis Priore

PASTO: CALLE 25 No. 7 ESTE - OFICINA LOPE VIA LA CAROLINA - A. AEREO 1478 - TELEFONO: PBX. 7309282 - FAX: 7309425
IBALÉ: CARRETERA 1a. No. 36 - 385 AX PANAMERICANA - TELEFONO: 733820 - FAX: 733144
TUMACO: TERMINAL MARITIMO - ISLA EL MORRO - TELEFONOS: 272347 - 272087 - FAX: 272086
TUQUERRES: FINCA LA JARDINERA Km. 4 - VIA SAPUYES - TELEFONO: 7280596
LA UNION: BARRIO 4 DE JUNIO - TELEFONO: 7285411

Anexo C. Identificación *Didelphis marsupialis*



Universidad de Nariño
MUSEO DE HISTORIA NATURAL

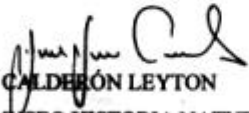
San Juan de Pasto, Agosto 3 de 2005

Doctora
KATIA LUZ ANDREA BENAVIDES ROMO
Médica veterinaria
Programa Medicina Veterinaria
Universidad de Nariño

Cordial saludo

Atendiendo su solicitud del 1 de junio de 2005 de identificar un ejemplar de un mamífero depositado en la colección biológica del Museo de Historia de Natural de la Universidad de Nariño me permito informar que el ejemplar corresponde a la especie *Didelphis marsupialis*. Para su identificación nos basamos en las descripciones realizadas por Emmons H 1997.

Para nosotros y como una función del Museo de Historia Natural será un placer seguir colaborando con sus investigaciones, por lo cual ha sido grato prestar este servicio.

Atentamente

JHON JAIRO CALDERÓN LEYTON
DIRECTOR MUSEO HISTORIA NATURAL
UNIVERSIDAD DE NARIÑO
MSC CIENCIAS BIOLÓGICAS UNIVALLE.

Anexo

Cita bibliográfica.

Emmons, Louise 1997. Neotropical Rainforest Mammals: a field guide/text by Louise H Emmons; illustrations by Francois Feer.- segunda edición. The University Chicago Press.

Anexo D. Formato de toma de muestras

INSTITUCIÓN:

Fecha: _____

RESEÑA:

Nombre Científico: _____

Sexo: _____ EDB*: _____ N° Animal: _____

Lugar de Extracción: _____ Procedencia _____

Anamnéscos: _____

Alimentación: _____

Estado de Salud:

Observaciones:

MUESTRAS DE LABORATORIO

Sangre Completa _____

Sitio de punción: _____

Suero _____

Heces _____

Lugar de la toma: _____

Orina _____

TEJIDOS:

Corazón _____

Hígado _____

Pulmón _____

Intestino _____

Observaciones (Hallazgos de necropsia)

* EDB (Estado de desarrollo biológico).

Responsable: _____

Anexo E. Formato de envío de muestras

Clase de muestras _____ N° animal _____

Fecha y Hora de recolección

Forma de conservación:

Forma de Envío

Destino: _____ Ciudad: _____ Entidad _____

Tiempo estimado de transporte _____

Responsable: _____

Anexo F. Simple Regression - RGR vs. TOXINA

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + b \cdot X$

 Dependent variable: RGR
 Independent variable: TOXINA

| Parameter | Estimate | Standard Error | T Statistic | P-Value |
|-----------|------------|----------------|-------------|---------|
| Intercept | 3.08028 | 0.488522 | 6.30532 | 0.0000 |
| Slope | 0.00401249 | 0.00220417 | 1.8204 | 0.0918 |

Analysis of Variance

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|---------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| Model | 2.06077 | 1 | 2.06077 | 3.31 | 0.0918 |
| Residual | 8.0842 | 13 | 0.621862 | | |
| Total (Corr.) | 10.145 | 14 | | | |

Correlation Coefficient = 0.450702
 R-squared = 20.3132 percent
 R-squared (adjusted for d.f.) = 14.1835 percent
 Standard Error of Est. = 0.788582
 Mean absolute error = 0.622994
 Durbin-Watson statistic = 1.90057 (P=0.3059)
 Lag 1 residual autocorrelation = -0.09661

The StatAdvisor

 The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between RGR and TOXINA. The equation of the fitted model is

$$RGR = 3.08028 + 0.00401249 \cdot TOXINA$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.10, there is a statistically significant relationship between RGR and TOXINA at the 90% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 20.3132% of the variability in RGR. The correlation coefficient equals 0.450702, indicating a relatively weak relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0.788582. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.

The mean absolute error (MAE) of 0.622994 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the P-value is greater than 0.05, there is no indication of serial autocorrelation in the residuals.

Anexo G. Simple Regression - AB_LIN vs. TOXINA

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + b \cdot X$

 Dependent variable: AB_LIN
 Independent variable: TOXINA

| Parameter | Estimate | Standard Error | T Statistic | P-Value |
|-----------|-----------|----------------|-------------|---------|
| Intercept | 3.31354 | 1.72635 | 1.91939 | 0.0772 |
| Slope | 0.0252746 | 0.00778918 | 3.24484 | 0.0064 |

Analysis of Variance

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|---------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| Model | 81.7658 | 1 | 81.7658 | 10.53 | 0.0064 |
| Residual | 100.955 | 13 | 7.76578 | | |
| Total (Corr.) | 182.721 | 14 | | | |

 Correlation Coefficient = 0.668947
 R-squared = 44.749 percent
 R-squared (adjusted for d.f.) = 40.4989 percent
 Standard Error of Est. = 2.78672
 Mean absolute error = 2.06774
 Durbin-Watson statistic = 1.85155 (P=0.2721)
 Lag 1 residual autocorrelation = 0.0537316

The StatAdvisor

 The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between AB_LIN and TOXINA. The equation of the fitted model is

$$AB_LIN = 3.31354 + 0.0252746 \cdot TOXINA$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between AB_LIN and TOXINA at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 44.749% of the variability in AB_LIN. The correlation coefficient equals 0.668947, indicating a moderately strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 2.78672. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.

The mean absolute error (MAE) of 2.06774 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the P-value is greater than 0.05, there is no indication of serial autocorrelation in the residuals.