

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO**

**HEREDIA**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



Comparación de protocolos de conservación de muestras para la obtención  
de ADN de *Sarcocystis aucheniae*: Análisis de cantidad y pureza.

Tesis para optar el Título Profesional de:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**Linda Josephina Cabrera Ruiz**

**Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Lima, Perú**

**2026**

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

| N° | APELLIDOS Y NOMBRES           |
|----|-------------------------------|
| 1. | Cabrera Ruiz, Linda Josephina |

(Agregar filas adicionales si hay más autores)

Pertenecientes al programa de la carrera profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, autores del trabajo titulado: **Comparación de protocolos de conservación de muestras para la obtención de ADN de *Sarcocystis aucheniae*: Análisis de cantidad y pureza.**, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el **Título Profesional** bajo la modalidad de **Tesis**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

| N° | APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE  | FACULTAD | NIVEL DE ASESORÍA |
|----|----------------------------------|----------|-------------------|
| 1. | Serrano Martinez, Marcos Enrique | FAVEZ    | Asesor            |

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **8%**, según el reporte emitido por el software Turnitin® (identificador de entrega: **trn;oid:::1:3627438134**; fecha de entrega: **14-08-2026**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: Lima, 14 de agosto de 2026

Firma del asesor  
N° DNI: 09822964  
ORCID: 0000-0002-4452-2666

Firma del Co-asesor  
N° DNI: .....  
ORCID: .....

## **FUENTE DE FINANCIAMIENTO**

La realización de esta tesis para optar al Título Profesional de Médico Veterinario Zootecnista ha sido posible gracias al apoyo financiero brindado por el Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados (PROCIENCIA) subvencionado por CONCYTEC (Convenio de Gestión N° PE501087971-2024-PROCIENCIA-CONCYTEC).

## **TABLA DE CONTENIDO**

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| AGRADECIMIENTOS .....            | 4  |
| DEDICATORIA .....                | 5  |
| RESUMEN .....                    | 6  |
| ABSTRACT.....                    | 7  |
| INTRODUCCIÓN .....               | 8  |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....       | 14 |
| RESULTADOS .....                 | 22 |
| DISCUSIÓN .....                  | 32 |
| CONCLUSIONES .....               | 38 |
| RECOMENDACIONES.....             | 39 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... | 40 |
| ANEXOS .....                     | 45 |

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a los Drs. de la facultad por el apoyo brindado en todo este proceso, a la Mg. Patricia Serrano por orientarme en el desarrollo de esta investigación; a mi mamá por darme la oportunidad de estudiar en una universidad privada; a mi papá y hermanos por todo el apoyo para que yo pueda estudiar sin descuidarme; gracias a mis amistades que motivaron y aconsejaron no rendirme; sin ustedes, este logro no hubiese concluido.

## **DEDICATORIA**

Dedico mi tesis en especial a mis padres, por su apoyo incondicional, su esfuerzo y por ser mi inspiración para alcanzar mis metas; a mis hermanos por apoyarme y comprender que muchas veces necesitaba ayuda; a mis mascotas, Brizzy, Canela, Clavo y Mishina que siempre se quedaron hasta tarde acompañándome a estudiar y no se ofuscaron cuando tuve que llevarlas a la universidad para que pueda aprender de ellas en las clases prácticas, este logro lleva huellas de ustedes. También dedicado a mis amistades que me acompañaron en todo este camino, en cada alegría, preocupación y tristeza, a los que me aconsejaron no rendirme, me enseñaron a no preocuparme por el paso del tiempo y me recordaron que cada persona tiene su propio ritmo para alcanzar sus metas.

Este logro también le pertenece a cada uno de ustedes.

## RESUMEN

El objetivo del estudio fue comparar la eficiencia de diferentes protocolos de conservación de muestras para la obtención de ADN de *Sarcocystis aucheniae*, mediante el análisis de su cantidad y pureza. Dichas muestras provinieron de tejido muscular de alpaca. Se emplearon 108 macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* extraídos del músculo cervical de alpaca procedente de la región de Puno. El estudio presentó tres fases de desarrollo: (1) Conservación de las muestras que fueron distribuidas en tres medios de conservación (suero fisiológico 0.9%, etanol al 70% y formol al 10%), a tres tiempos de almacenamiento (24 horas, 15 días y 30 días) y cuatro temperaturas de conservación (4 °C, -20 °C, -80 °C y -196 °C), con tres repeticiones por combinación experimental. (2) La extracción de ADN mediante el uso del protocolo de cola de ratón del kit comercial ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega). (3) Espectrofotometría en NanoDrop™ para medir la cantidad y pureza del ADN extraído. El estudio reportó que los resultados de la cantidad y pureza del ADN variaron dependiendo del medio de conservación y del tiempo de almacenamiento. Se halló diferencia entre grupos (medio-temperatura) que influye significativamente en la cantidad de ADN obtenido, siendo el etanol al 70% el protocolo más eficaz para la conservación de muestras de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae*, ya que permitió obtener ADN con mayor cantidad y pureza especialmente en periodos de almacenamiento prolongados, representando una opción confiable para investigaciones moleculares en parasitología veterinaria.

**Palabras clave:** *Sarcocystis*, Conservación de muestras, Temperatura de conservación, Medios de conservación.

## ABSTRACT

The objective of this study was to compare the efficiency of different sample preservation protocols for obtaining *Sarcocystis aucheniae* DNA by analyzing its quantity and purity. The samples were obtained from alpaca muscle tissue. 108 *Sarcocystis aucheniae* macrocysts were extracted from the cervical muscle of alpacas from the Puno region. The study had three phases. (1) Preservation of the samples, which were distributed among three preservation media (0.9% physiological saline, 70% ethanol, and 10% formalin), at three storage times (24 hours, 15 days, and 30 days), and four storage temperatures (4 °C, -20 °C, -80 °C, and -196 °C), with three replicates per experimental combination. (2) DNA extraction was performed using the mouse tail protocol of the commercial ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System kit (Promega). (3) Spectrophotometry was performed using NanoDrop™ to measure the quantity and purity of the extracted DNA. The study reported that the results for DNA quantity and purity varied depending on the preservation medium and storage time. Differences were found between groups (medium-temperature) that significantly influenced the quantity of the DNA obtained, with 70% ethanol being the most effective protocol for preservation of *Sarcocystis aucheniae* macrocyst samples, as it allowed obtaining DNA with greater quantity and purity, especially during prolonged storage periods, representing a reliable option for molecular research in veterinary parasitology.

**Keywords:** *Sarcocystis*, sample preservation, preservation temperature, preservation media.

## INTRODUCCIÓN

En el Perú se pueden encontrar cuatro especies de camélidos sudamericanos (CSA) como son: vicuñas, guanacos, alpacas y llamas. Entre ellos se clasifican como CSA silvestres y CSA domésticos; las vicuñas y guanacos son camélidos silvestres, mientras las alpacas y llamas se consideran como CSA domésticos. (Avilés *et al.*, 2018). Los CSA domésticos pueden presentar enfermedades parasitarias como la sarcocystiosis, uno de los agentes parasitarios de la enfermedad es el *Sarcocystis sp.*, el cual puede afectar a las alpacas; en un estudio experimental donde inocularon *Sarcocystis sp.* en las crías de alpaca, concluyeron que la infección afecta significativamente la ganancia de peso (Chávez *et al.*, 2008).

El *Sarcocystis spp.* pertenece al phylum Apicomplexa, familia Sarcocystidae; es un parásito protozooario intracelular, el cual presenta ciclo de vida indirecto, esto quiere decir que requiere de un hospedero intermediario y un hospedero definitivo (Ayala, 2018). Uno de los hospederos intermediarios del *Sarcocystis spp.* es la alpaca, este parásito se reproduce de manera asexual formando macroquistes y microquistes que se ubican en los paquetes musculares. Por otro lado, los caninos tanto domésticos como silvestres se consideran como hospederos definitivos, en ellos el parásito se reproduce de manera sexual formando esporoquistes y ooquistes de los cuales salen al ambiente por las heces (Chávez *et al.*, 2008).

El ciclo biológico del *Sarcocystis spp.*, inicia cuando el hospedero definitivo ingiere carne o agua contaminada, el cual contiene bradizoitos que invadirán las células intestinales y se desarrollan para formar gametos (fase sexual), originando ooquistes maduros que serán excretados al ambiente mediante las heces (Lucas, 2012). Posterior a ello el hospedero intermediario ingiere los ooquistes mediante pasto o agua contaminada, en el intestino las

enzimas intestinales provocan la esporulación el ooquiste a 4 esporozoitos, del cual invadirá células endoteliales vasculares de los ganglios linfáticos mesentéricos para reproducirse (fase asexual) por esquizogonia que contienen esquizontes nucleados; los merozoitos se librea al torrente sanguíneo invadirán a otras células endoteliales vasculares (arteria, venas y capilares) diseminando la infección hacia los miocitos del musculo esquelético, músculo cardiaco y en células nerviosas, así formando al sarcocisto (Wieser *et al.*, 2024).

En la revisión bibliográfica realizada por Avilés, se menciona que los productos y subproductos de los camélidos sudamericanos son una fuente de desarrollo de pueblos andinos, en la venta de carne, fibra, piel, guano, transporte e investigación (Avilés *et al.*, 2018). La producción de carne para consumo humano se ve afectada por la contaminación con parásitos como es la *sarcocystiosis*, generando pérdidas económicas para el sector ganadero e industrial debido al decomiso de las carcasas (Mamani *et al.*, 2019)

La detección de sarcocystis en la carne de alpaca dependerá de la edad, es por ello que, en un estudio realizado en la provincia de Lucanas, Ayacucho, concluyeron que el porcentaje de infección con *Sarcocystis aucheniae* en alpacas jóvenes menores a 2 años fue del 15,1%, mientras que en alpacas adultas mayores a 2 años fue de 16,9% (Velasquez *et al.*, 2019). Por otro lado la presencia de los microquistes en tejido muscular cardiaco dependería de mayor irrigación, por este motivo Gonzales realizó un estudio en Huancavelica con la finalidad de determinar la mayor presencia de los microquistes en las aurículas, los ventrículos o el ápice del corazón, concluyendo que en el ápice hay mayor presencia de los microquistes 91.78% debido a que presenta mayor porcentaje de masa muscular habiendo mayor irrigación a comparación de las otras zonas del corazón (Gonzales, 2020).

En un estudio realizado en Argentina y Perú, Moré *et al.* (2016) propusieron el nombre de *Sarcocystis masoni* a los quistes microscópicos y *Sarcocystis aucheniae* a los quistes macroscópicos hallados en llama, guanaco y alpaca. Las muestras fueron evaluadas por microscopía óptica, microscopía electrónica y estudio molecular. Los microquistes presentaron medidas de 800  $\mu\text{m}$  x (35-95  $\mu\text{m}$ ) x 2,5-3,5  $\mu\text{m}$ , mientras los macroquistes son de color amarillo pálido y de tamaño 1,2 cm de largo x 50  $\mu\text{m}$  de espesor (Moré *et al.*, 2016). Para la conservación de muestra biológicas, Mesa y Bernal en el año 2005 realizaron una recopilación de protocolos de preservación de muestras biológicas, donde indican que es imprescindible establecer condiciones de almacenamiento que garantice la integridad de los tejidos para prevenir la degradación del ADN, ya que el calor favorece a la descomposición de las muestras, por lo cual concluyeron que la mejor manera de evitar el deterioro es en condiciones de refrigeración y que el nitrógeno líquido es la mejor opción ya que evita la actividad biológica que favorece a la degradación de los tejidos (Mesa *et al.*, 2006).

La evaluación de la pureza y la cantidad de ADN extraído de *Sarcocystis spp.* es esencial para garantizar la confiabilidad de los análisis moleculares posteriores, como PCR, secuenciación o estudios filogenéticos. La cantidad de ADN se mide comúnmente en nanogramos por microlitro (ng/ $\mu\text{L}$ ) mediante espectrofotometría (p. ej., NanoDrop) o fluorometría, lo que permite conocer el rendimiento de la extracción y determinar si hay suficiente material genético para las técnicas de amplificación. Una concentración adecuada evita fallas en la reacción en cadena de la polimerasa y asegura resultados reproducibles. La pureza del ADN se evalúa generalmente por la relación de absorbancia A260/A280 y A260/A230. Un valor cercano a 1,8 indica ADN libre de proteínas, mientras que valores más bajos sugieren contaminación proteica o de fenoles (Burbano *et al.*, 2017). La pureza es crítica, ya que compuestos residuales pueden inhibir enzimas

como la Taq polimerasa, afectando la amplificación de genes específicos del parásito (Wilson, 1997). En el caso de *Sarcocystis spp.*, estos parámetros son fundamentales para estudios de identificación de especies, epidemiología molecular, rastreo de ciclos de vida y detección de zoonosis. Una extracción de alta calidad permite comparar cepas, diseñar estrategias de control en animales hospedadores y contribuir a la vigilancia de enfermedades parasitarias que impacta a la salud pública y producción ganadera (Bräuning *et al.*, 2016).

La cuantificación y pureza de ADN de la muestra se realiza por espectrofotometría UV, el cual se puede realizar por NanoDrop, la cual usa longitudes de onda cortas con la finalidad de obtener diferentes concentraciones de ácidos nucleicos, usando método de absorbancia directa A260, el NanoDrop puede medir concentraciones entre 1 pg/uL y 15 000 ng/uL; también mide la calidad de la muestra mediante relaciones A260/280 o A260/230 para ADN o ARN respectivamente, la muestra pura entre 1.8 - 2.2 y muestra contaminada menor a 1.8 (Desjardins *et al.*, 2010). Otra técnica de cuantificación es Qubit, es un método de fluorescencia, este presenta un rango de medición entre 0.2-100 ng/uL (kit Qubit dsDNA HS) y 2-1000ng/uL (Qubit dsDNA BR), (Thermo Fisher Scientific). Estudios realizados para mejorar el diagnóstico molecular de la pureza y concentración de ADN de *Sarcocystis spp.* en corazones de bovinos, donde evaluaron cuatro protocolos de extracción de ADN (kit comercial Wisard, modificación del kit comercial, reactivo DNAzol y bromuro cetil-trimetilamonio) concluyeron que el protocolo donde modificaron al kit comercial (Wisard) presentó mejor concentración y pureza de ADN ( $52 \pm 9.3$  ng/uL) y  $2.1 \pm 0.1$  (260/280 nm) respectivamente (Bräunig *et al.*, 2016). En Letonia recolectaron muestras de intestino de marta europeas que fueron conservadas a -20 °C, se liberó esporocistos del *Sarcocystis* con la finalidad de analizar su ADN y secuenciar filogenéticamente (Prakas *et al.*, 2025). Otro estudio en lobos de

Minnesota, caracterizó la ultraestructura y genética de los sarcocistos; donde almacenaron las muestras en alcohol al 95% y a -20 °C para evaluar la pureza y la concentración del ADN (Gupta *et al.*, 2024).

Existen diversas investigaciones sobre la evaluación de la efectividad de métodos de conservación convencional como el etanol y DESS (mezcla saturada de DMSO, EDTA y NaCl) para preservar la integridad y la morfología del ADN en especímenes, indicaron que el almacenamiento de tejido en DESS conservó ADN de alto peso molecular en todas las especies analizadas a temperatura ambiente (15°C-30°C) (Ogiso-Tanaka *et al.*, 2025). En Egipto, secuenciaron el ADN de *Sarcocystis fusiformis* y *Sarcocystis cruzi* pertenecientes a las especies de *Sarcocystis spp.* de los quistes microscópicos y macroscópicos obtenidos de la carne de búfalo congelada, dichos quistes fueron conservados en alcohol a 70% y congelados a -20 °C (Mousa *et al.*, 2016).

Para obtener ADN de alta calidad se realizó una investigación comparando cinco métodos de preservación de tejido en diferentes medios (Etanol 96% a -20°C, Etanol 96% - 0.1mM EDTA, Tampón de Longmire 0.1M tris + 0.1M EDTA + 0.01M NaCl + 0.5% w/v, DMSO-NaCl 20% DMSO + sobresaturación de NaCl  $\geq 98\%$  y CTAB-NaCl  $\geq 99\%$  +  $\geq 98\%$  NaCl) con diferentes pesos de muestra donde no se preservó criogénicamente, con el cual el Tampón de Longmire mostró mejor resultado entre protocolos de extracción (Hleap *et al.*, 2009).

Si bien se han desarrollado estudios sobre la conservación de la carne de llama a 4°C para la medición de los macroquistes y microquistes (Moré *et al.*, 2016), también para el secuenciamiento de ADN de especies de *Sarcocystis spp.* conservados en alcohol al 70% a -20°C (Mousa *et al.*, 2016), la literatura presenta vacíos importantes en la evaluación sistemática de distintos medios de conservación y temperatura, particularmente en *Sarcocystis aucheniae*. No dispone de información comparativa que permita determinar

qué protocolo de conservación preserva mejor la cantidad y pureza del ADN de este parásito, limitando así la eficiencia de los análisis moleculares posteriores.

En este contexto, el presente estudio se enfocó en la comparación de diferentes protocolos de conservación de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* que estarán presentes en la carne de cuello de alpaca para determinar la cantidad y pureza de su ADN, la investigación es relevante debido a la importancia sanitaria del parásito en camélidos sudamericanos.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. LUGAR DE ESTUDIO

El estudio se realizó en el Laboratorio de Parasitología Animal y Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

## 2. TIPO DE ESTUDIO

La presente investigación fue un estudio de tipo experimental descriptivo, enfocado en comparar diferentes protocolos de conservación de muestras de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* mediante el análisis de la cantidad y la pureza del ADN obtenido.

## 3. POBLACIÓN OBJETIVO Y TAMAÑO DE MUESTRA

### 3.1. MUESTRA DE MÚSCULO

Se utilizó el músculo cervical de la carne de alpaca (*Vicugna pacos*) procedente de un centro de beneficio de la región de Puno, Perú, recolectado en octubre de 2025. La carne correspondió a una alpaca macho de aproximadamente seis años, seleccionada debido a que los animales adultos presentan mayor probabilidad de infección parasitaria (Velásquez *et al.*, 2019). La carne fue transportada en menos de 24 horas desde el centro de beneficio al laboratorio, mientras se refrigeraba ( $7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.2 TAMAÑO DE MUESTRA:

La evaluación del tamaño de muestra fue realizada con base en las 3 categorías: medio de conservación, tiempo de conservación y temperatura de conservación. En cada categoría presentó variaciones (**Cuadro 1**):

-Medio de conservación: 3 variaciones: suero fisiológico comercial 0.9% NaCl (Medifarma), etanol comercial 70% (Alkofarma) y formol 10% (Alkofarma, formol de 40% diluido hasta el 10%).

-Tiempo de conservación: 3 variaciones: 24 horas, 25 días y 30 días

-Temperatura conservación: 4 variaciones: 4 °C (refrigerador de laboratorio), -20 °C (congelador convencional), -80 °C (ultracongeladora) y -196 °C (tanque criogénico con nitrógeno líquido). Los instrumentos usados para los equipos de refrigeración y congelación son los siguientes: termómetro de sonda para el refrigerador de laboratorio, el congelador convencional y la ultracongeladora presentaron indicadores digitales de temperatura, la temperatura del congelador convencional osciló entre -15 °C y -20 °C, mientras la ultracongeladora varió entre -80 °C a -79 °C; en el caso de tanque criogénico con nitrógeno líquido se usó la varilla medidora de nitrógeno líquido.

Es por ello que las combinaciones experimentales se obtuvieron:

$$\text{COMBINACIONES: } 3 \times 3 \times 4 = 36$$

A la vez se realizaron 3 repeticiones por cada variación, por lo tanto, se evaluó la cantidad y pureza de ADN de 108 macroquistes.

$$\text{Tamaño de muestra: } 36 \times 3 = 108 \text{ macroquistes}$$

Para cada combinación de medio, temperatura y tiempo de conservación se analizaron 3 réplicas, lo que permitió comparar los 36 grupos experimentales. Además, las comparaciones se agruparon por factor (por ejemplo, comparando únicamente los medios a una temperatura y un tiempo específicos) con el fin de evaluar qué condiciones,

individuales o combinadas, influyeron significativamente en la cantidad y la pureza del ADN.

**Cuadro 1.** Evaluación por grupos (medios de conservación y diferentes temperaturas)

|                   | 4 °C | - 20 °C | - 80 °C | - 196 °C |
|-------------------|------|---------|---------|----------|
| Suero fisiológico |      |         |         |          |
| 24 horas          | 3    | 3       | 3       | 3        |
| 15 días           | 3    | 3       | 3       | 3        |
| 30 días           | 3    | 3       | 3       | 3        |
| Etanol            |      |         |         |          |
| 24 horas          | 3    | 3       | 3       | 3        |
| 15 días           | 3    | 3       | 3       | 3        |
| 30 días           | 3    | 3       | 3       | 3        |
| Formol            |      |         |         |          |
| 24 horas          | 3    | 3       | 3       | 3        |
| 15 días           | 3    | 3       | 3       | 3        |
| 30 días           | 3    | 3       | 3       | 3        |

## CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

### Criterios de inclusión:

- Macroquistes del músculo del cuello de alpaca, músculo del cuello de alpaca refrigerados adecuadamente (que lleguen frescos al laboratorio).
- Macroquistes morfológicamente intactos (pared externa/cápsula no presente ruptura).

- Macroquistes de tamaño (0.5 cm – 1.2 cm) y peso (4 mg aproximadamente).

#### Criterios de exclusión:

- Macroquistes dañados que a la manipulación se partan o rompan.
- Macroquistes calcificados.

## **4. VARIABLES DE ESTUDIO**

#### Variables Independientes:

- Medio de conservación (% de concentración)
- Temperatura de conservación (°C)
- Tiempo de conservación (días)

#### Variables Dependientes:

- Cantidad de ADN (ng/μL)
- Pureza de ADN (1.8 – 2.0, mediante la relación A260/A280)

## **5. RECOLECCIÓN, PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS**

### **5.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS:**

#### **5.1.1. OBTENCIÓN DE MACROQUISTES**

Se utilizaron macroquistes sugerentes de *Sarcocystis aucheniae* obtenidos del músculo cervical de alpaca (*Vicugna pacos*). Los macroquistes fueron identificados inicialmente mediante evaluación macroscópica (Ramos, 2023) y observación estereoscópica, considerando características compatibles con la especie, tales como: forma elongada y blanquecina, consistencia firme, localización intramuscular, tamaño entre 0.5 y 1.2 cm.

Posteriormente, se verificó su integridad estructural antes del procesamiento experimental. La extracción de los macroquistes se realizó utilizando bisturí estéril N.º 21 bajo condiciones asépticas. Cada macroquiste fue manipulado individualmente para evitar contaminación cruzada y colocado inmediatamente en el medio de conservación correspondiente.

### **5.1.2. RECOLECCIÓN DE MACROQUISTES**

En el laboratorio, los macroquistes fueron:

- Identificados visualmente.
- Extraídos cuidadosamente del músculo cervical.
- Lavados con solución salina estéril para eliminar residuos tisulares.
- Medidos (0.5 y 1.2 cm) y pesados (aproximadamente 4 mg por muestra).
- Colocados individualmente en tubos estériles de 1.5 ml con el medio de conservación asignado.

Posteriormente, las muestras fueron almacenadas según la temperatura y el tiempo experimentales correspondientes. El almacenamiento según la temperatura fue gradual: cada 10 minutos se pasó de 4 °C, después a -20 °C, posterior a -80 °C y finalmente a -196 °C.

## **5.2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS:**

### **5.2.1. CONSERVACIÓN DE MACROQUISTES**

Las condiciones de conservación de cada macroquiste colocado en tubos estériles fueron las siguientes:

- Cada macroquiste se le añadió 1 ml del medio de conservación (suero fisiológico 0.9%, etanol al 70% y formol al 10%).

- Cada tubo estéril fue colocado a gradualmente en temperaturas de conservación (4 °C, -20 °C, -80 °C y -196 °C).
- El tiempo de conservación de cada muestra fueron: 24 horas, 15 días y 30 días (Puente, 2020).

A partir de esta distribución, los grupos (medio-temperatura) a evaluar fueron definidos de la siguiente manera:

- 1= S- 4= Suero fisiológico a 4 °C
- 2= S- -20= Suero fisiológico a -20 °C
- 3= S- -80= Suero fisiológico a -80 °C
- 4= S- -196= Suero fisiológico a -196 °C
- 5= E- 4= Etanol a 4 °C
- 6= E- -20= Etanol a -20 °C
- 7= E- -80= Etanol a -80 °C
- 8= E- -196= Etanol a -196 °C
- 9= F- 4= Formol a 4 °C
- 10= F- -20= Formol a -20 °C
- 11= F- -80= Formol a -80 °C
- 12= F- -196= Formol a -196 °C

Para cada grupo se utilizaron 3 repeticiones. Después de ello se realizó la obtención de ADN.

### **5.2.2. OBTENCIÓN DE ADN**

La extracción de ADN se realizó siguiendo las instrucciones del protocolo de cola de ratón del kit comercial ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega).

El procedimiento incluyó:

1. Descongelamiento gradual de muestras según la temperatura de almacenamiento.  
Las muestras crioconservadas a -196 °C fueron transferidas a la ultracongeladora (-80 °C), luego de 10 minutos se pasó a una congeladora (-20 °C) y posteriormente a otros 10 minutos a la refrigeradora (4 °C). Finalmente, 10 minutos más para que las muestras fuesen expuestas a la temperatura ambiente del laboratorio.
2. Separación del macroquiste del medio conservante.
3. Lavados con solución salina estéril para eliminar residuos químicos de los medios de conservación
4. Cada macroquiste fue colocado en tubos de microcentrífuga.
5. Homogeneización mecánica del tejido a través del uso de un agitador vórtex.
6. Lisis celular mediante tampón de lisis (TLA) y proteinasa K (PK).
7. Incubación para digestión proteica de 24 horas a 56 °C.
8. Purificación mediante columnas de sílica, uso de tampón lisis celular (CLD), ARNasa y tampón de unión (BBA).
9. Lavado y elución final del ADN en buffer libre de nucleasas.

Cada etapa de extracción se realizó bajo condiciones de bioseguridad y se utilizaron guantes de nitrilo, mascarilla y cabina de bioseguridad (SafeFast Classic).

### **5.3. MEDICIÓN DE CANTIDAD Y PUREZA DEL ADN**

La cuantificación y evaluación de pureza del ADN se realizaron después de haberse obtenido el ADN, y se efectuaron mediante espectrofotometría utilizando el equipo Thermo Scientific NanoDrop™. En el cual se realizaron tres repeticiones por muestra, con la finalidad de comparar las medianas entre grupos.

Se registraron:

- Cantidad de ADN: expresada en ng/μL.

- Pureza del ADN: determinada mediante la relación A260/A280.

Los criterios de interpretación de Pureza del ADN fueron:

- 1.8 – 2.0: ADN de pureza óptima
- menor a 1.8: contaminación proteica o fenólica
- mayor a 2.0: posible contaminación con ARN o pH.

Cada muestra se midió en triplicado para asegurar la reproducibilidad.

#### **5.4. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS**

Los datos de las variables de cantidad y pureza del ADN se organizaron en una base de datos digital y fueron analizados mediante estadística descriptiva e inferencial. Se evaluó la distribución de las medianas de la cantidad y pureza de los grupos mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov (K-S) comprobando que no sigue la distribución normal ( $p < 0,05$ ), es por ello que se optó por realizar un método estadístico no probabilístico, la prueba de Kruskal-Wallis ( $\alpha = 0,05$ ), la cual analizó los resultados entre los 12 grupos conservados a un mismo tiempo de conservación y evidenció diferencias significativas entre ellos; cuando se detectaron diferencias significativas, se realizó la prueba de medianas. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Stata versión 17.

## RESULTADOS

Los resultados observados en la conservación de muestras a las 24 horas, en el análisis por la Kolmogorov-Smirnov (K-S), mostraron que los valores de cantidad de ADN presentaron  $p < 0.0001$ ; además, los valores de pureza de ADN presentaron  $p = 0.162$ . Esto quiere decir que los valores de cantidad no presentan distribución normal, mientras que los valores de pureza presentan distribución normal. Por otro lado, la prueba de Kruskal-Wallis mostró que los valores de la cantidad de ADN presentaron  $p = 0.034$ , además, los valores de pureza de ADN presentaron  $p = 0.047$ . Esto quiere decir que existen diferencias significativas en la cantidad y pureza entre las distintas temperaturas. La comparación entre las muestras sometidas a un mismo medio (suero fisiológico) fue entre los grupos 1, 2, 3 y 4; el grupo que presentó mayor cantidad de ADN (80,30 ng/ $\mu$ L) y un valor de pureza de 2,12 fue el grupo 1. Por otro lado, las muestras en etanol (5, 6, 7 y 8), el grupo que presentó mayor cantidad de ADN (160,73 ng/ $\mu$ L) y un valor de pureza de 2,21 fue el grupo 5; por último, las muestras en formol (9, 10, 11 y 12), el grupo que presentó mayor cantidad de ADN (82,20 ng/ $\mu$ L) y un valor de pureza de 2,14 fue el grupo 11.

En el Cuadro 2 se presenta la estadística descriptiva de la variable cantidad y pureza del ADN obtenido dentro de los grupos conservados a las 24 horas. Este análisis se realizó con las medianas de las tres repeticiones de cada grupo para obtener la mediana de la cantidad de ADN (Anexo 1) y la mediana de la pureza de ADN (Anexo 2) almacenados a 24 horas. Esto quiere decir que con respecto a la cantidad de ADN: se observa que entre los 12 grupos el que presenta mayor cantidad de ADN es el grupo 5 y los grupos 2, 10, 12 y 4 son los que presentan menor cantidad de ADN. Mientras que la pureza del ADN: se observa que el grupo 2 presenta ADN dentro del rango óptimo (1.85-2.0). En el Gráfico

1 (Prueba de mediana) se presenta la mediana global de Cantidad de ADN, fue 42,583 ng/ $\mu$ L entre los 12 grupos a las 24 horas, donde los grupos 1, 5, 6, 7, 8, 9, y 11 presentan medianas por encima de la mediana global y los grupos 2, 3, 4, 10 y 12 presentan medianas por debajo de la mediana global; mientras en el Gráfico 2 (Prueba de mediana) se presenta la mediana global de Pureza de ADN, fue 2,122 entre los 12 grupos a las 24 horas, donde los grupos 5, 6 y 9 presentan medianas por encima de la mediana global y los grupos 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11 y 12 presentan medianas cercanas o por debajo de la mediana global.

Los resultados observados en la conservación de muestras a los 15 días, en el análisis por la Kolmogorov-Smirnov (K-S), mostraron que los valores de cantidad de ADN presentaron  $p < 0.0001$ ; además, los valores de pureza de ADN presentaron  $p = 0.200$ . Esto quiere decir que los valores de cantidad no presentan distribución normal, mientras que los valores de pureza presentan distribución normal. Por otro lado, la prueba de Kruskal-Wallis mostró que los valores de la cantidad de ADN presentaron  $p = 0.004$ , además, los valores de pureza de ADN presentaron  $p = 0.125$ . Esto quiere decir que existen diferencias significativas en la cantidad, mientras que en pureza no hay diferencias significativas. Entre los 3 medios de las muestras sometidas a suero fisiológico (1, 2, 3 y 4), el grupo que presentó mayor cantidad de ADN (110,56 ng/ $\mu$ L) y un valor de pureza de 2,18 fue el grupo 1. Por otro lado, las muestras en etanol (5, 6, 7 y 8), el grupo que presentó mayor cantidad de ADN (32,36 ng/ $\mu$ L) y un valor de pureza de 2,07 fue el grupo 5; por último, las muestras en formol (9, 10, 11 y 12), el grupo que presentó mayor cantidad de ADN (68,90 ng/ $\mu$ L) y un valor de pureza de 2,09 fue el grupo 9.

En el Cuadro 3 se presenta la estadística descriptiva de la variable cantidad y pureza del ADN obtenido dentro de los grupos conservados a los 15 días. Este análisis se realizó con las medianas de las tres repeticiones de cada grupo para obtener la mediana de la cantidad de ADN (Anexo 3) y la mediana de la pureza de ADN (Anexo 4) almacenados a los 15 días. Esto quiere decir que con respecto a la cantidad de ADN: se observa que entre los 12 grupos el que presenta mayor cantidad de ADN es el grupo 1 y los grupos 10, 12, 11 y 7 son los que presentan menor cantidad de ADN. Mientras que la pureza de ADN: se observa que el grupo 1 presenta 2,18 y los grupos 5, 6, 8, 10 y 11 presentan ADN óptimo (1,85-2,00). En el Gráfico 3 (Prueba de mediana) se presenta la mediana global de Cantidad de ADN, fue 33,533 ng/ $\mu$ L entre los 12 grupos a las 15 días, donde los grupos 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 9 presentan medianas por encima de la mediana global y los grupos 6, 8, 10, 11 y 12 presentan medianas por debajo de la mediana global; mientras en el Gráfico 4 (Prueba de mediana) se presenta la mediana global de Pureza de ADN, fue 2,105 entre los 12 grupos a los 15 días, donde los grupos 1, 2, 3, 4, 5, 8 y 12 presentan medianas por encima de la mediana global y los grupos 6, 7, 9, 10 y 11 presentan medianas cercanas o por debajo de la mediana global.

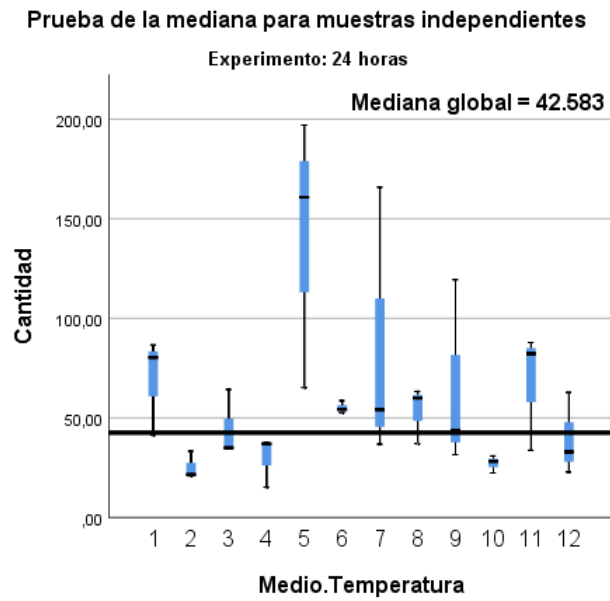
Los resultados observados en la conservación de muestras a los 30 días, en el análisis por la Kolmogorov-Smirnov (K-S), mostraron que los valores de cantidad de ADN presentaron  $p = 0.003$ ; además, los valores de pureza de ADN presentaron  $p < 0.0001$ . Esto quiere decir que los valores de cantidad y pureza no presentan distribución normal. Por otro lado, la prueba de Kruskal-Wallis mostró que los valores de la cantidad de ADN presentaron  $p = 0.004$ ; además, los valores de pureza de ADN presentaron  $p = 0.072$ . Esto quiere decir que existen diferencias significativas en la cantidad, mientras que en pureza no hay diferencias significativas. Las muestras en suero fisiológico (1, 2, 3 y 4); el grupo que presentó mayor cantidad de ADN (189,90 ng/ $\mu$ L) y un valor de pureza de 2,22 fue el

grupo 1. Por otro lado, las muestras en etanol (5, 6, 7 y 8), el grupo que presentó mayor cantidad de ADN (131,03 ng/ $\mu$ L) y un valor de pureza de 2,20 fue el grupo 5; por último, los grupos en formol (9, 10, 11 y 12), el grupo que presentó mayor cantidad de ADN (89,83 ng/ $\mu$ L) y un valor de pureza de 2,17 fue el grupo 9.

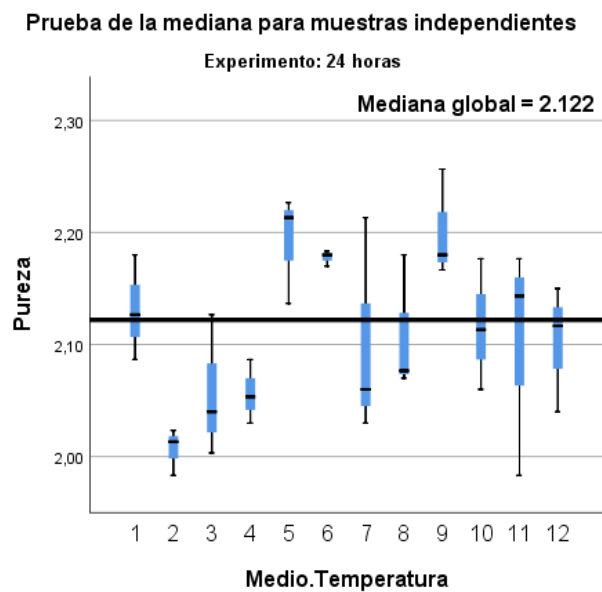
En el Cuadro 4 se presenta la estadística descriptiva de la variable cantidad y pureza del ADN obtenido dentro de los grupos conservados a los 30 días. Este análisis se realizó con las medianas de las tres repeticiones de cada grupo para obtener la mediana de la cantidad de ADN (Anexo 5) y la mediana de la pureza de ADN (Anexo 6) almacenados a los 30 días. Esto quiere decir que con respecto a la cantidad de ADN: se observa que entre los 12 grupos los que presentan mayor cantidad de ADN son los grupos 1 y 5, y los grupos 10, 11 y 12 son los que presentan menor cantidad de ADN. Mientras que la pureza de ADN: se observa que el grupo 1 presenta 2,22 y el grupo 5, 2,20. En el Gráfico 5 (Prueba de mediana) se presenta la mediana global de Cantidad de ADN, fue 48,667 ng/ $\mu$ L entre los 12 grupos a los 30 días, donde los grupos 1, 3, 5, 6, 8 y 9 presentan medianas por encima de la mediana global y los grupos 2, 4, 7, 10, 11 y 12 presentan medianas por debajo de la mediana global; mientras en el Gráfico 6 (Prueba de mediana) se presenta la mediana global de Pureza de ADN, fue 2,160 entre los 12 grupos a los 30 días, donde los grupos 1, 3, 5, 8, 9 y 11 presentan medianas por encima de la mediana global, los grupos 2, 4, 7 y 10 presentan medianas próximas la mediana global y los grupos 6 y 12 presentan medianas inferiores a la mediana global.

**Cuadro 2.** Estadística descriptiva de los valores de las variables cantidad y pureza dentro de los grupos conservados a las 24 horas.

| Cantidad (ng/μL) |         | Pureza (A260/280) |         |
|------------------|---------|-------------------|---------|
| Grupos           | Mediana | Grupos            | Mediana |
| 5                | 160,73  | 5                 | 2,21    |
| 11               | 82,20   | 6                 | 2,18    |
| 1                | 80,30   | 9                 | 2,18    |
| 8                | 59,93   | 11                | 2,14    |
| 6                | 54,20   | 1                 | 2,12    |
| 7                | 54,16   | 10                | 2,11    |
| 9                | 43,86   | 12                | 2,11    |
| 4                | 37,00   | 8                 | 2,07    |
| 3                | 34,96   | 7                 | 2,06    |
| 12               | 32,93   | 4                 | 2,05    |
| 10               | 28,20   | 3                 | 2,04    |
| 2                | 20,60   | 2                 | 2,01    |



**Gráfico 1.** Cantidad de ADN entre los grupos (medio-temperatura) conservados a las 24 horas.

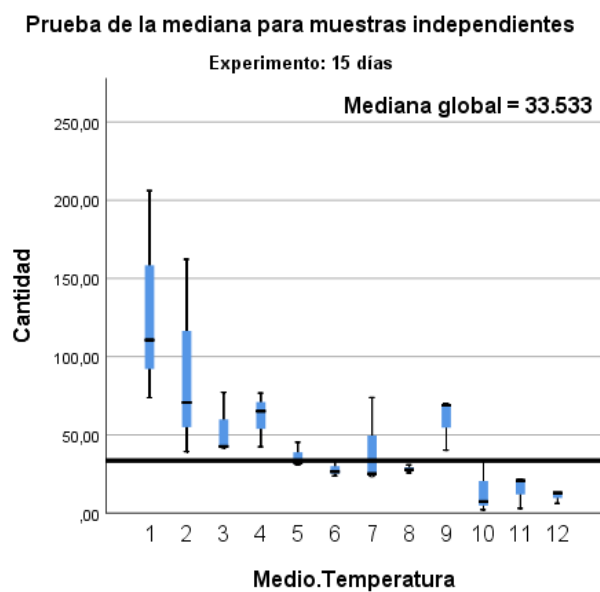


**Gráfico 2.** Pureza de ADN entre los grupos (medio-temperatura) conservados a las 24 horas

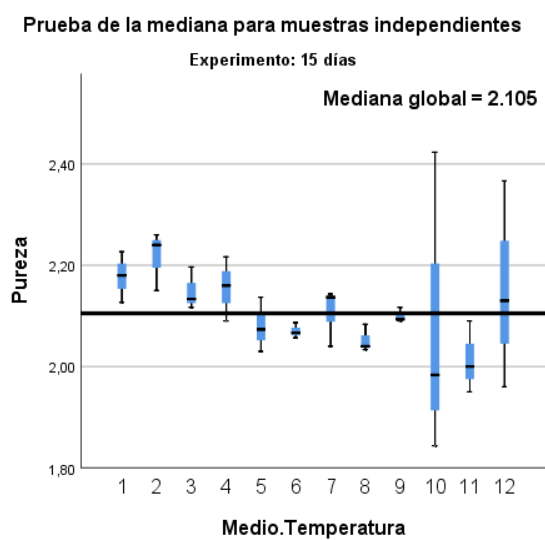
**Cuadro 3.** Estadística descriptiva de los valores de las variables cantidad y pureza dentro de los grupos conservados a los 15 días

| Cantidad (ng/μL) |                      | Pureza (A260/280) |                       |
|------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|
| Grupos           | Mediana              | Grupos            | Mediana               |
| 1                | 110,56 <sup>a</sup>  | 2                 | 2,24 <sup>a</sup>     |
| 2                | 70,63 <sup>a,b</sup> | 1                 | 2,18 <sup>a</sup>     |
| 9                | 68,90 <sup>b</sup>   | 4                 | 2,16 <sup>a,b</sup>   |
| 4                | 65,20 <sup>b</sup>   | 3                 | 2,13 <sup>a,b</sup>   |
| 3                | 42,56 <sup>b</sup>   | 7                 | 2,13 <sup>a,b,c</sup> |
| 5                | 32,36 <sup>b,c</sup> | 12                | 2,13 <sup>a,b,c</sup> |
| 8                | 27,73 <sup>c</sup>   | 9                 | 2,09 <sup>b,c</sup>   |
| 6                | 26,40 <sup>c</sup>   | 5                 | 2,07 <sup>b,c</sup>   |
| 7                | 25,06 <sup>c</sup>   | 6                 | 2,06 <sup>c</sup>     |
| 11               | 20,80 <sup>d</sup>   | 8                 | 2,04 <sup>c</sup>     |
| 12               | 12,86 <sup>d</sup>   | 11                | 2,00 <sup>c</sup>     |
| 10               | 7,4 <sup>d</sup>     | 10                | 1,98 <sup>c</sup>     |

Entre los grupos que presentan la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí, mientras presentan diferentes letras indican que las medianas son diferentes a un nivel de significancia del 5%.



**Gráfico 3.** Cantidad de ADN entre los grupos (medio-temperatura) conservados a los 15 días.

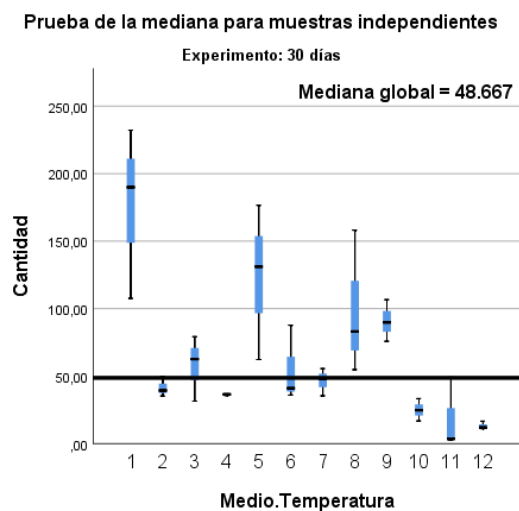


**Gráfico 4.** Pureza de ADN entre los grupos (medio-temperatura) conservados a los 15 días.

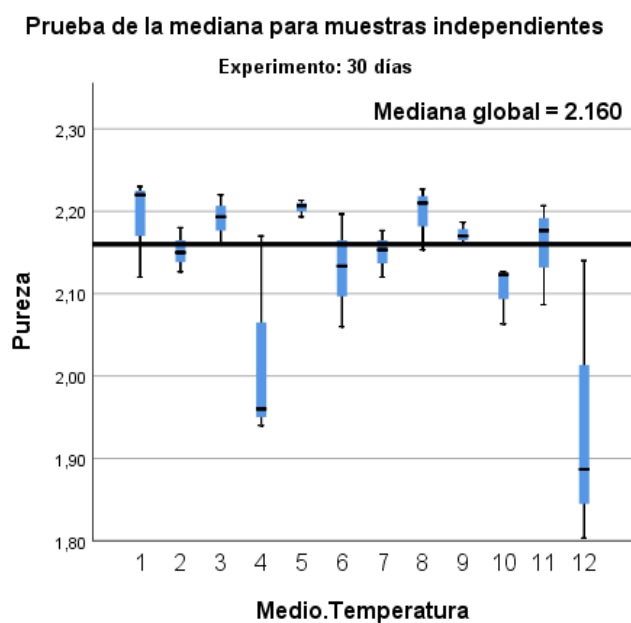
**Cuadro 4.** Estadística descriptiva de los valores de las variables cantidad y pureza dentro de los grupos conservados a los 30 días

| Cantidad (ng/μL) |                          | Pureza (A260/280) |         |
|------------------|--------------------------|-------------------|---------|
| Grupos           | Mediana                  | Grupo             | Mediana |
| 1                | 189,90 <sup>a</sup>      | 1                 | 2,22    |
| 5                | 131,03 <sup>a,b</sup>    | 8                 | 2,21    |
| 9                | 89,83 <sup>b</sup>       | 5                 | 2,20    |
| 8                | 83,13 <sup>b,c,d</sup>   | 3                 | 2,19    |
| 3                | 62,56 <sup>b,c,d,e</sup> | 9                 | 2,17    |
| 7                | 48,13 <sup>c,d,e</sup>   | 11                | 2,17    |
| 6                | 41,07 <sup>c,d,e</sup>   | 2                 | 2,15    |
| 2                | 39,36 <sup>e</sup>       | 7                 | 2,15    |
| 4                | 36,56 <sup>e</sup>       | 6                 | 2,13    |
| 10               | 24,76 <sup>f</sup>       | 10                | 2,12    |
| 12               | 12,03 <sup>g</sup>       | 4                 | 1,96    |
| 11               | 3,5 <sup>g</sup>         | 12                | 1,88    |

Entre los grupos que presentan la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí, mientras presentan diferentes letras indican que las medianas son diferentes a un nivel de significancia del 5%.



**Gráfico 5.** Cantidad de ADN entre los grupos (medio-temperatura) conservados a los 30 días.



**Gráfico 6.** Pureza de ADN entre los grupos (medio-temperatura) conservados a los 30 días.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se comparó la eficiencia de diferentes protocolos de conservación de muestras para la obtención de ADN de *Sarcocystis aucheniae*, mediante el análisis de su cantidad y pureza. Los resultados obtenidos probaron que emplear macroquistes enteros como unidad de muestra fue adecuado debido a que el tamaño y las características de las muestras fueron apropiados para realizar la comparación entre los distintos protocolos evaluados, dado que Regensburger (2015) caracterizó morfológicamente observando que midieron entre 2 y 7 mm y que contienen de 10 a 15 millones de bradizoítos, y también evaluó molecularmente a quistes macroscópicos identificando a la especie *S. aucheniae* afecta a los camélidos sudamericanos (Regensburger *et al.* 2015).

Los resultados demostraron que el medio, la temperatura y el tiempo de conservación son factores importantes que determinan la cantidad y pureza del ADN obtenido, influyendo directamente en la cantidad del ADN, evidenciándose diferencias significativas entre los grupos. El uso de suero fisiológico 0.9% reveló que este medio puede conservar las muestras, ya que se evidenciaron cantidades de ADN significativas. En la investigación realizada por Verma *et al.* (2017) se describió que la solución salina normal (0.85%) sirve como medio isotónico para la observación microscópica de merozoítos, el lavado de esporozoítos y bradizoítos, también para el almacenamiento temporal de los parásitos (Verma *et al.* 2017).

El uso de suero fisiológico como medio de conservación de muestras para la evaluación de ADN no ha sido estudiado. En una investigación de Vincek (2003) evaluó ARN de calidad extraído de tejido fresco, comparando diferentes reactivos histológicos (formalina tamponada con fosfato al 10%, etanol al 100% y xileno) y la congelación rápida del tejido con la finalidad de evaluar su efecto en la integridad de ARN; usó el suero fisiológico 0.9%

como control negativo ya que esperó encontrar ARN degradado, pero el único reactivo que degradó completamente fue el de formalina, el etanol absoluto no degradó el ARN, y el xileno degradó parcialmente el ARN pero después de 1 hora, mientras que el tejido que se incubó en suero fisiológico al 0.9% produjo ARN intacto analizados hasta las 24 horas (Vincek *et al.* 2003).

De manera similar, el uso de etanol al 70% en muestras de carne de res también presentó mayor cantidad de ADN dependiendo de los días de almacenamiento; en la investigación de Eslami *et al.* (2016) fue empleado para la conservación de muestras a -20 °C con la finalidad de comparar métodos de extracción de ADN de *Sarcocystis spp.* y la concentración de ADN obtenido fue:  $249.3 \pm 3.94$ ,  $67.8 \pm 5.1$ , y  $31 \pm 2.7$  ng/μl (Eslami *et al.*, 2016). Mientras que el formol al 10% o la formalina tamponada al 10 % se aplica principalmente para la fijación de tejidos y la preservación de muestras, afecta la calidad del ADN (Einaga *et al.* 2017). Por otro lado, el uso de formol para estudios moleculares es limitado debido a que puede degradar al ADN y sirve comúnmente como fijador de muestras histológicas; Taguchi en el 2012 determinó que el uso de formol 10% como fijador de muestras y el tiempo de fijación pueden afectar directamente en la obtención de ADN, ya que presenta fragmentación de ADN, concluyendo que el formol conserva la arquitectura tisular pero no es el medio de conservación si la finalidad de su uso es para la conservación de ADN (Taguchi *et al.* 2012).

Los hallazgos evidencian que las muestras que se colocaron en el medio de etanol al 70% presentaron mejores resultados en la cantidad de ADN obtenido hasta los 30 días de conservación y con respecto a la pureza 260/280, variaron de 2.05 a 2.20. Estos resultados se asemejan a los reportados por Eslami *et al.* (2016), quienes conservaron muestras de *Sarcocystis spp.* en etanol al 70% a -20 °C y obtuvieron ADN de calidad mediante distintos

métodos de extracción (Eslami *et al.*, 2016). Entre las 2 investigaciones se sugiere que el medio de conservación (etanol 70%) ayuda a preservar el ADN durante el almacenamiento y minimiza la degradación. No obstante, las diferencias observadas en los resultados de pureza se pueden vincular a las condiciones y al tiempo de almacenamiento o los métodos de extracción. Ogiso-Takana *et al.* (2025) indican que uno de los medios de conservación óptimos es el alcohol al 70%, ya que puede mantener la integridad morfológica de las muestras, incluso la integridad del ADN, las cuales fueron sometidas a temperatura ambiente (15-30 °C) por un tiempo prolongado de 5,5 meses. Esta conducta explicaría la variabilidad evidenciada en la pureza del ADN durante el grupo con etanol en este estudio.

El uso de otro medio de conservación evaluado fue el suero fisiológico 0.9%, presentó resultados fluctuantes según el tiempo de almacenamiento. A las 24 horas presentó pureza de ADN dentro del rango (1,85-2,0); a los 15 y 30 días presentó mayor cantidad de ADN entre los grupos evaluados; esto puede deberse a la conservación temporal de la estructura celular en el medio isotónico (Verma *et al.* 2017). En una investigación en Colombia, donde preservaron muestras en solución salina al 40%, se observó degradación del material genético. Esto se debería a que funciona más como medio temporal de conservación molecular, pero al no presentar estabilizadores puede provocar la degradación del ADN (Uribe *et al.* 2017).

Por otro lado, con el uso de formol al 10% presentó un bajo rendimiento en la cantidad de ADN, sobre todo en el almacenamiento de 30 días. Este resultado es presumible considerando que las soluciones de formaldehído pueden alterar enlaces entre proteínas y ácidos nucleicos, ya que existe la posibilidad de fragmentación del ADN y, con ello, alterar la calidad del ADN. Esto se observó en la fijación de muestras en un periodo superior a 3 días (Einaga *et al.* 2017). El descenso progresivo en la cantidad de ADN conservada en el

medio de formol al 10% concuerda con lo indicado por Eslami *et al.* (2016), donde compararon 3 métodos de extracción de ADN en tejidos infectados por *Sarcocystis spp.* y determinaron que fijadores químicos perjudican la amplificación de ADN. En este contexto, aunque el formol se utiliza en estudios de histopatología, su uso resulta insuficiente para un análisis molecular.

En caso contrario, si se hubiese analizado el ARN, los factores de conservación (medios, temperatura y tiempo) son importantes, pero analizar el ARN es más complejo, ya que es un ácido nucleico monocatenario y estructuralmente menos estable que el ADN, que es un ácido nucleico bicatenario (Sidova *et al.* 2015). En este caso, para la evaluación del ARN para estudios moleculares, es importante el manejo de las muestras para su preservación y el uso de RNAlater como estabilizador de tejido para almacenar a largo plazo, ya que protege el ARN celular (Passow *et al.* 2018). El procesamiento de muestra y las condiciones de almacenamiento influyen en la cantidad, pureza e integridad del ARN; factores como conservantes, tamaño de muestra y métodos de descongelación influyen en la calidad del ARN (Zou *et al.* 2025). En relación con la investigación, al no contar con un estabilizador de ácidos nucleicos como se usa para la evaluación de ARN, previo a la manipulación de muestras, este podría favorecer la conservación de la cantidad y la pureza, pero el descongelamiento gradual de -196°C hasta la temperatura de laboratorio podría afectar a la conservación de las muestras para evaluar el ARN.

Los resultados obtenidos evidencian que la conservación de muestras a diferentes temperaturas también puede afectar la cantidad y pureza del ADN. El uso de suero fisiológico y etanol al 70% como medios de conservación de muestras presentó mayor cantidad y pureza de ADN, los cuales se podrían considerar como alternativa para conservar otro tipo de muestras hasta por un mes, ya que favorecerían la obtención de ADN, además,

la evaluación entre las cuatro temperaturas a las que fueron sometidas las muestras, la temperatura de 4 °C presentó mayor cantidad de ADN en los tres tiempos de conservación; otra temperatura de conservación que resultó con mejores resultados fue a -20 °C en comparación con las otras dos temperaturas (-80 °C y -196 °C). Estos hallazgos indican que, según un enfoque práctico, las muestras conservadas en medios como suero fisiológico y etanol 70% se pueden usar en campo, permitiendo que las muestras puedan llegar en condiciones óptimas al laboratorio y que pueden conservarse tanto en refrigeración (4 °C) como en congelación (-20 °C); esto quiere decir que no es indispensable el uso de equipos especializados como ultracongeladora o tanque criogénico con nitrógeno líquido para conservar este tipo de muestras.

Un aspecto relevante de la investigación es que a pesar de que se evidenciaron diferentes cantidades y purezas de ADN, la evaluación a través de la relación de espectrofotometría A260/A280 mostró que algunos grupos alcanzaron un rango óptimo de pureza (1.8-2.0), de acuerdo con Thermo Fisher Scientific (2012). Valores menores a 1.8 sugieren la presencia de proteínas o compuestos fenólicos, mientras que los valores mayores a 2.0 pueden ser indicativos de posible contaminación por ARN o la alteración que genera la solución buffer. No obstante, una limitación al no comprobar la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa o PCR, y enfocarse en analizar parámetros cuantitativos (cantidad y pureza); otra limitación fue que los períodos analizados fueron concretos y no permiten determinar el tiempo máximo de conservación antes de que se produzca una pérdida considerable de calidad genética, esto podría considerarse en futuras investigaciones contemplar tiempos de almacenamiento más extensos, así como la cuantificación fluométrica para una caracterización más completa de la calidad del ADN.

Los resultados de este estudio aportan evidencia sobre la importancia de mejorar los protocolos de conservación de muestras para el diagnóstico de la sarcocistiosis. Este aporte es relevante en las áreas altoandinas de Perú, debido a que se realiza una actividad productiva importante (crianza de camélidos sudamericanos) y donde la sarcocistiosis genera impactos sanitarios y económicos considerables. La conservación eficaz de las muestras no solo eleva la calidad de los análisis genéticos, sino que también potencia la vigilancia epidemiológica y el control de enfermedades parasitarias que afectan a la producción. Por lo tanto, la implementación de protocolos de conservación válidos debe ser considerada un aspecto importante dentro de los programas de investigación y diagnóstico enfocados en *Sarcocystis aucheniae*.

## CONCLUSIONES

- El presente estudio demostró que los protocolos de conservación de muestras mostraron un impacto significativo en la cantidad de ADN extraído de *Sarcocystis aucheniae*, evidenciando variaciones entre los diferentes grupos a lo largo del tiempo de almacenamiento. De los protocolos evaluados, las muestras que se almacenaron en los medios de conservación: suero fisiológico y etanol al 70% a 4 °C mostraron el rendimiento más sobresaliente al presentar mayor cantidad de ADN, mientras que el formol al 10% presentó menor cantidad de ADN.
- Los medios de conservación que mostraron mayor capacidad para obtener el ADN, mantuvieron niveles de pureza dentro de rangos aceptables durante los periodos de tiempo de almacenamiento, estos resultados obtenidos sugieren que los medios podrían ser adecuados para estudios moleculares.
- Las temperaturas de conservación que presentaron mayor cantidad de ADN (4 °C y -20 °C) esto evidencia que la conservación de muestras puede realizarse en equipos de uso común en laboratorio, sin necesidad de usar equipos sofisticados, lo que favorecería la logística de otras investigaciones.

## RECOMENDACIONES

1. Implementar etanol al 70% como medio de conservación estándar en los estudios moleculares de *Sarcocystis aucheniae*, ya que presenta mayor pureza y un rendimiento de extracción de ADN óptimo.
2. Limitar el uso de formol al 10% para investigaciones moleculares, especialmente en lo que respecta al almacenamiento prolongado, puesto que puede disminuir la cantidad de ADN recuperado y afectar su integridad.
3. Emplear suero fisiológico únicamente en estudios a corto plazo o en ausencia de conservantes específicos, dado que puede ser eficaz en obtener resultados en cantidad en tiempos intermedios.
4. Priorizar el análisis de muestras en un plazo de 30 días tras su conservación para reducir la pérdida en la concentración de ADN.
5. Evaluar la integridad del ADN mediante métodos moleculares antes de usar un determinado medio de conservación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avilés D. F, Montero M, Barros-Rodríguez, M. 2018. Los camélidos sudamericanos: productos y subproductos usados en la región andina. *Actas Iberoamericanas en Conservación Animal AICA*, 11, 30-38.
- Ayala C. 2018. Sarcocistiosis (Arrocillo, Falsa triquina, Falso cisticercos, Sarcosporidiosis); Revisión literaria. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 5(Especial), 193-206.
- Bräunig P, Portella L, Cezar A, Libardoni F, Sangioni L, Flores F, Dias P. 2016. DNA extraction methods and multiple sampling to improve molecular diagnosis of *Sarcocystis* spp. in cattle hearts. *Parasitology Research*, 115(10), 3913–3921.
- Burbano E, Caetano de Almeida B, Otero I, Álvarez S. 2017. Manual de biología molecular: Procedimientos básicos. p. 46-48.
- Chávez A, Leyva V, Panez S, Ticona D, García W, & Pezo D. 2008. Sarcocistiosis y la eficiencia productiva de la alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 19(2), 160-167.
- Decker C. 2018. Avances en el conocimiento de la Sarcocistiosis de camélidos sudamericanos y desarrollo de herramientas para su control. Título de Doctora de Biología, Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.
- Decker C., Romero S., Ferrari A., Schnittger L., Florin-Christensen M. 2018. Detection of *Sarcocystis aucheniae* in blood of llama using a duplex semi-nested PCR assay and its association with cyst infestation. *Heliyon* 4 e00928.
- Desjardins P, Conklin D. 2010. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Vis. Exp.*(45), e2565.

- Eslami G, Manafi L, Peletto S. 2016. DNA Extraction from Beef Harboring *Sarcocystis spp.*: Comparison of Three Different Analytical Methods. *Journal of Food Quality and Hazards Control* 3; 128-133.
- Einaga N, Yoshida A, Noda H, Suemitsu M, Nakayama Y, Sakurada A, *et al.* 2017. Assessment of the quality of ADN from various formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues and the use of this DNA for next-generation sequencing (NGS) with no artifactual mutation. 12(5):e0176280.
- Gonzales G. 2020. Determinación de la ubicación de microquistes de *Sarcocystis lamacanis* en corazón de alpaca (*Vicugna pacos*) en el camal municipal de la ciudad de Huancavelica. Título de Médico Veterinario Zootecnista. Lima: Universidad Científica del Sur.
- Gupta A, S. de Araujo L, Calero-Bernal R, Humpal C, Schrage M, Carstensen M, *et al.* 2024. Molecular and morphological characterization of *Sarcocystis* infections in the muscles of gray wolves (*Canis lupus*) from Minnesota suggest they may serve as reservoirs for infection in domesticated dogs. Vol. 110 (5): 471-485.
- Hleap J, Cárdenas H, García-Vallejo F. 2009. Preservación no criogénica de tejido y extracción de ADN: una aplicación para peces cartilagosos. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4(4), 545-555.
- Lucas, J. 2012. *Sarcocystis* spp. en el Perú. *Peruvian journal of parasitology*, 20(2), 64-73.
- Mamani R, Choque D. 2019. Evaluación de las pérdidas económicas en la comercialización de la carne de Llama (*Lama glama*) con la presencia de *Sarcocystis aucheniae*, en la ciudad de El Alto. *Revista Estudiantil Agro-Vet*, 3 (2), 454-458.

- Mesa D, Bernal A. 2006. Protocolos para la preservación y manejo de colecciones biológicas. Boletín científico, Centro de Museos-Museo de Historia Natural Vol 10.
- Moré G, Regensburger C, Laura M, Pardini L, Verma S, Ctibor J, et al. 2016. *Sarcocystis masoni*, n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae), y redescrición de *Sarcocystis aucheniae* de llama (*Lama glama*), guanaco (*Lama guanicoe*) y alpaca (*Vicugna pacos*). Parasitology, 143 (5) 617-626.
- Mousa M, Hiekal F, El-Hoshy S, Radwan M, Abd W. 2016. Characterization of Sarcocystis Species Based on Traditional and Molecular Methods in imported Frozen Buffalo Meat in Egypt. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 51(1): 155-161.
- Ogiso-Tanaka E, Shimada D, Ogawa, A, Ishiyama G, Okumura K-i, Hosaka K, et al. 2025. DNA Specimen Preservation Using DESS and DNA Extraction in Museum Collections. *Biology*. Vol 14, 730.
- Passow C, Kono T, Stahl B, Jaggard J, Keene A, McGaugh S. 2018. Nonrandom RNAseq gene expression associated with RNAlater and flash freezing storage methods. *Mol Ecol Resour*. 19(2): 456-464.
- Puente P. 2020. Valoración de la viabilidad de *Sarcocystis spp.* en ganado ovino tras tratamiento térmico.
- Prakas P, Vaitkevičiūtė R, Gudiškis N, Grigaliūnaitė E, Juozaitytė-Ngugu E, Stankevičiūtė J, et al. 2025 European Pine Marten (*Martes martes*) as Natural Definitive Host of *Sarcocystis Species* in Latvia: Microscopic and Molecular Analysis. *Vet Sci*. 12(4):379.
- Ramos G. 2023. Diagnóstico macroscópico de *Sarcocystis aucheniae* en tejido muscular de alpacas (*Vicugna pacos*) y llamas (*Lama Glama*) beneficiadas en el

camal municipal de Huancavelica. Título de Ingeniero Zootecnista, Huancavelica. Universidad Nacional de Huancavelica.

- Regensburger C, Gos M, Ctibor J, Moré G. 2015. Morphological and Molecular Characteristics of *Sarcocystis aucheniae* Isolated from Meat og Guanaco (Lama guanicoe).
- Sidova M, Tomankova S, Abaffy P, Kubista M, Sindelka R. 2015. Effects of post-mortem and physical degradation on RNA integrity and quality. *Biomolecular Detection and Quantification* 5(2015) 3-9.
- Taguchi M, Inoue H, Motani-Saitoh H, Yajima D, Hayakawa M, Otsuka K, Kobayashi K, Iwase H. 2012. DNA identification of formalin-fixed organs is affected by fixation time and type of fixatives: using the AmpFlstr Identifier PCR Amplification Kit. *Med Sci Law*, 52: 12-16.
- Thermo Scientific NanoDrop, Fluotómetro Qubit™ 4. Thermofisher Scientific.
- Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers, Nucleic acid measurements. Thermofisher Scientific.
- Uribe P, Arturo B, García N, Betancur J. 2017. Preservation of obtained biopsies by colonoscopy in patients with colorectal cancer for molecular analysis. (23): 3-4.
- Velásquez L, Soncco J, Valderrama A. 2019. *Sarcocystis aucheniae* en camélidos sudamericanos y factores de riesgo en la provincia de Lucanas. *Salud y Tecnología Veterinaria*, 7(1), 8-13.
- Verma S, Lindsay D, Grigg M, Dubey J. 2017. Isolation, Culture and cryopreservation of *Sarcocystis* species. *Current Protocols in Microbiology*, 45, 20D.1.1-20D.1.27.

- Vincek V, Nassiri M, Knowles J, Nadji M, Morales A. 2003. Preservation of tissue RNA in Normal Saline. *Lab Invest* 83, 137-138.
- Wieser S, Giuliano S, Reategui J, Barriga X, Olivera, LV, Chávez M, *et al.* 2024. *Sarcocystis* spp. of new and old world camelids: Ancient origin, Present challenges. *Pathogens*, 13 (3), 196.
- Wilson I. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. p3741-3751. Vol 63.
- World Organisation for Animal Health. 2021. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.
- Yang Z-Q, Zuo Y-X, Ding B, Chen X-W, Luo J, Zhang Y-P. 2001. Identification of *Sarcocystis hominis*-like (Protozoa: Sarcocystidae) Cyst in Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) Based on 18S rRNA Gene Sequences. *American Society of Parasitologists* 87(4).
- Zou C, Yu M, Peng H, Zhang X, Deng Z, Zhou Z, Li W, Zhang S, Qian K. 2025. Optimizing RNA quality in cryopreserved tissues without preservatives: impact of preservatives, thawing methods and tissue aliquot size. *BMC Biotechnol* 25(1): 120.

## ANEXOS

**Anexo 1:** Medianas de Cantidad de ADN a las 24 horas.

| Suero Fisiológico |                     | Etanol        |                     | Formol        |                     |
|-------------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|---------------------|
| Muestras          | Cantidad<br>(ng/ul) | Muestras      | Cantidad<br>(ng/ul) | Muestras      | Cantidad<br>(ng/ul) |
| S-24h- 4- 1       | 87,10               | E-24h- 4-1    | 64,8                | F-24h- 4-1    | 120,8               |
| S-24h- 4- 2       | 80,3                | E-24h- 4-2    | 197,9               | F-24h- 4-2    | 31,6                |
| S-24h- 4- 3       | 41,4                | E-24h- 4-3    | 159,7               | F-24h- 4-3    | 43,3                |
| S-24h- -20- 1     | 21,6                | E-24h- -20-1  | 52,4                | F-24h- -20-1  | 31,0                |
| S-24h- -20- 2     | 33,3                | E-24h- -20-2  | 52,9                | F-24h- -20-2  | 28,1                |
| S-24h- -20- 3     | 20,9                | E-24h- -20-3  | 58,9                | F-24h- -20-3  | 22,2                |
| S-24h- -80- 1     | 35,1                | E-24h- -80-1  | 166,5               | F-24h- -80-1  | 80,6                |
| S-24h- -80- 2     | 61,9                | E-24h- -80-2  | 38,0                | F-24h- -80-2  | 33,7                |
| S-24h- -80- 2     | 35,1                | E-24h- -80-2  | 58,1                | F-24h- -80-3  | 87,8                |
| S-24h- -196- 1    | 39,0                | E-24h- -196-1 | 37,2                | F-24h- -196-1 | 62,8                |
| S-24h- -196- 2    | 37,1                | E-24h- -196-2 | 58,6                | F-24h- -196-2 | 32,8                |
| S-24h- -196- 3    | 15,2                | E-24h- -196-3 | 60,5                | F-24h- -196-3 | 23,5                |

**Anexo 2:** Medianas de Pureza de ADN a las 24 horas.

| Suero Fisiológico |            | Etanol        |            | Formol        |            |
|-------------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|
| Muestras          | Pureza     | Muestras      | Pureza     | Muestras      | Pureza     |
|                   | (A260/280) |               | (A260/280) |               | (A260/280) |
| S-24h- 4- 1       | 2,13       | E-24h- 4-1    | 2,12       | F-24h- 4-1    | 2,24       |
| S-24h- 4- 2       | 2,18       | E-24h- 4-2    | 2,23       | F-24h- 4-2    | 2,19       |
| S-24h- 4- 3       | 2,09       | E-24h- 4-3    | 2,22       | F-24h- 4-3    | 2,20       |
| S-24h- -20- 1     | 2,03       | E-24h- -20-1  | 2,18       | F-24h- -20-1  | 2,17       |
| S-24h- -20- 2     | 1,99       | E-24h- -20-2  | 2,18       | F-24h- -20-2  | 2,08       |
| S-24h- -20- 3     | 2,02       | E-24h- -20-3  | 2,17       | F-24h- -20-3  | 2,12       |
| S-24h- -80- 1     | 2,13       | E-24h- -80-1  | 2,22       | F-24h- -80-1  | 2,04       |
| S-24h- -80- 2     | 2,01       | E-24h- -80-2  | 2,07       | F-24h- -80-2  | 2,17       |
| S-24h- -80- 2     | 2,06       | E-24h- -80-2  | 2,08       | F-24h- -80-3  | 2,14       |
| S-24h- -196- 1    | 2,05       | E-24h- -196-1 | 2,07       | F-24h- -196-1 | 2,12       |
| S-24h- -196- 2    | 2,09       | E-24h- -196-2 | 2,13       | F-24h- -196-2 | 2,15       |
| S-24h- -196- 3    | 2,02       | E-24h- -196-3 | 2,18       | F-24h- -196-3 | 2,11       |

**Anexo 3:** Medianas de Cantidad de ADN a los 15 días.

| Suero Fisiológico |                     | Etanol        |                     | Formol        |                     |
|-------------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|---------------------|
| Muestras          | Cantidad<br>(ng/ul) | Muestras      | Cantidad<br>(ng/ul) | Muestras      | Cantidad<br>(ng/ul) |
| S-15d- 4- 1       | 208,20              | E-15d- 4-1    | 41,50               | F-15d- 4-1    | 69,00               |
| S-15d- 4- 2       | 110,40              | E-15d- 4-2    | 32,50               | F-15d- 4-2    | 70,30               |
| S-15d- 4- 3       | 72,40               | E-15d- 4-3    | 30,80               | F-15d- 4-3    | 39,60               |
| S-15d- -20- 1     | 39,70               | E-15d- -20-1  | 27,00               | F-15d- -20-1  | 7,00                |
| S-15d- -20- 2     | 74,50               | E-15d- -20-2  | 33,50               | F-15d- -20-2  | 33,70               |
| S-15d- -20- 3     | 162,50              | E-15d- -20-3  | 23,00               | F-15d- -20-3  | 2,20                |
| S-15d- -80- 1     | 77,10               | E-15d- -80-1  | 73,50               | F-15d- -80-1  | 21,50               |
| S-15d- -80- 2     | 42,40               | E-15d- -80-2  | 23,10               | F-15d- -80-2  | 2,90                |
| S-15d- -80- 2     | 41,50               | E-15d- -80-2  | 25,00               | F-15d- -80-3  | 21,80               |
| S-15d- -196- 1    | 65,90               | E-15d- -196-1 | 28,60               | F-15d- -196-1 | 12,90               |
| S-15d- -196- 2    | 43,70               | E-15d- -196-2 | 25,80               | F-15d- -196-2 | 12,90               |
| S-15d- -196- 3    | 76,70               | E-15d- -196-3 | 29,80               | F-15d- -196-3 | 6,70                |

**Anexo 4:** Medianas de Pureza de ADN a los 15 días.

| Suero Fisiológico |            | Etanol        |            | Formol        |            |
|-------------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|
| Muestras          | Pureza     | Muestras      | Pureza     | Muestras      | Pureza     |
|                   | (A260/280) |               | (A260/280) |               | (A260/280) |
| S-15d- 4- 1       | 2,23       | E-15d- 4-1    | 2,14       | F-15d- 4-1    | 2,09       |
| S-15d- 4- 2       | 2,18       | E-15d- 4-2    | 2,03       | F-15d- 4-2    | 2,12       |
| S-15d- 4- 3       | 2,14       | E-15d- 4-3    | 2,07       | F-15d- 4-3    | 2,09       |
| S-15d- -20- 1     | 2,15       | E-15d- -20-1  | 2,09       | F-15d- -20-1  | 2,13       |
| S-15d- -20- 2     | 2,22       | E-15d- -20-2  | 2,05       | F-15d- -20-2  | 1,98       |
| S-15d- -20- 3     | 2,26       | E-15d- -20-3  | 2,06       | F-15d- -20-3  | 2,08       |
| S-15d- -80- 1     | 2,17       | E-15d- -80-1  | 2,14       | F-15d- -80-1  | 2,09       |
| S-15d- -80- 2     | 2,11       | E-15d- -80-2  | 2,10       | F-15d- -80-2  | 1,91       |
| S-15d- -80- 2     | 2,14       | E-15d- -80-2  | 2,06       | F-15d- -80-3  | 2,00       |
| S-15d- -196- 1    | 2,21       | E-15d- -196-1 | 2,05       | F-15d- -196-1 | 2,14       |
| S-15d- -196- 2    | 2,08       | E-15d- -196-2 | 2,04       | F-15d- -196-2 | 1,96       |
| S-15d- -196- 3    | 2,16       | E-15d- -196-3 | 2,07       | F-15d- -196-3 | 2,17       |

**Anexo 5:** Medianas de Cantidad de ADN a los 30 días.

| Suero Fisiológico |                     | Etanol        |                     | Formol        |                     |
|-------------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|---------------------|
| Muestras          | Cantidad<br>(ng/ul) | Muestras      | Cantidad<br>(ng/ul) | Muestras      | Cantidad<br>(ng/ul) |
| S-30d- 4- 1       | 107,30              | E-30d- 4-1    | 179,70              | F-30d- 4-1    | 75,80               |
| S-30d- 4- 2       | 232,60              | E-30d- 4-2    | 61,50               | F-30d- 4-2    | 90,20               |
| S-30d- 4- 3       | 191,60              | E-30d- 4-3    | 132,30              | F-30d- 4-3    | 106,40              |
| S-30d- -20- 1     | 49,30               | E-30d- -20-1  | 40,40               | F-30d- -20-1  | 24,80               |
| S-30d- -20- 2     | 35,00               | E-30d- -20-2  | 87,90               | F-30d- -20-2  | 17,60               |
| S-30d- -20- 3     | 39,60               | E-30d- -20-3  | 36,00               | F-30d- -20-3  | 33,70               |
| S-30d- -80- 1     | 79,20               | E-30d- -80-1  | 35,90               | F-30d- -80-1  | 49,10               |
| S-30d- -80- 2     | 30,50               | E-30d- -80-2  | 48,20               | F-30d- -80-2  | 2,80                |
| S-30d- -80- 2     | 62,70               | E-30d- -80-2  | 55,60               | F-30d- -80-3  | 3,50                |
| S-30d- -196- 1    | 36,30               | E-30d- -196-1 | 157,70              | F-30d- -196-1 | 12,60               |
| S-30d- -196- 2    | 36,60               | E-30d- -196-2 | 83,00               | F-30d- -196-2 | 11,00               |
| S-30d- -196- 3    | 36,30               | E-30d- -196-3 | 55,20               | F-30d- -196-3 | 16,50               |

**Anexo 6:** Medianas de Pureza de ADN a los 30 días.

| Suero Fisiológico |            | Etanol        |            | Formol        |            |
|-------------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|
| Muestras          | Pureza     | Muestras      | Pureza     | Muestras      | Pureza     |
|                   | (A260/280) |               | (A260/280) |               | (A260/280) |
| S-30d- 4- 1       | 2,12       | E-30d- 4-1    | 2,21       | F-30d- 4-1    | 2,16       |
| S-30d- 4- 2       | 2,15       | E-30d- 4- 2   | 2,20       | F-30d- 4- 2   | 2,19       |
| S-30d- 4- 3       | 2,22       | E-30d- 4-3    | 2,21       | F-30d- 4-3    | 2,17       |
| S-30d- -20- 1     | 2,18       | E-30d- -20-1  | 2,05       | F-30d- -20-1  | 2,13       |
| S-30d- -20- 2     | 2,12       | E-30d- -20-2  | 2,20       | F-30d- -20-2  | 2,07       |
| S-30d- -20- 3     | 2,14       | E-30d- -20-3  | 2,14       | F-30d- -20-3  | 2,06       |
| S-30d- -80- 1     | 2,20       | E-30d- -80-1  | 2,13       | F-30d- -80-1  | 2,09       |
| S-30d- -80- 2     | 2,19       | E-30d- -80-2  | 2,15       | F-30d- -80-2  | 2,18       |
| S-30d- -80- 2     | 2,15       | E-30d- -80-2  | 2,18       | F-30d- -80-3  | 2,17       |
| S-30d- -196- 1    | 1,90       | E-30d- -196-1 | 2,15       | F-30d- -196-1 | 1,79       |
| S-30d- -196- 2    | 1,96       | E-30d- -196-2 | 2,23       | F-30d- -196-2 | 1,89       |
| S-30d- -196- 3    | 1,98       | E-30d- -196-3 | 2,21       | F-30d- -196-3 | 2,15       |