



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL



TESIS

**EFFECTO DE UN ANACULTIVO DE *Clostridium perfringens* TIPO A
SOBRE LOS NIVELES DE IgG EN MADRE/CRÍA Y LA MORTALIDAD
NEONATAL EN ALPACAS (*Vicugna pacos*)**

PRESENTADA POR:

SERGIO DANILO PEZO CARREON

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIA ANIMAL

PUNO, PERÚ

2024

Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

EFFECTO DE UN ANACULTIVO DE Clostridium perfringens TIPO A SOBRE LOS NIVELES DE IgG EN MADRE_CRÍA Y L

AUTOR

Sergio Danilo Pezo Carreón

RECUENTO DE PALABRAS

28303 Words

RECUENTO DE CARACTERES

155304 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

108 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

4.5MB

FECHA DE ENTREGA

Jun 25, 2024 3:52 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Jun 25, 2024 3:54 PM GMT-5

● **7% de similitud general**

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

- 6% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 2% Base de datos de trabajos entregados
- 2% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● **Excluir del Reporte de Similitud**

- Material bibliográfico
- Material citado
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 8 palabras)


Mg.Sc. NUBIA LILIA CATACORA FLORES
CMVP 5032
UNA - PUNO



Nubia Lilia Catacora Flores
ING. ESTADÍSTICO E INFORMATICO
CIP. 116625

Resumen



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL

TESIS

**EFFECTO DE UN ANACULTIVO DE *Clostridium perfringens* TIPO A SOBRE
LOS NIVELES DE IgG EN MADRE/CRÍA Y LA MORTALIDAD NEONATAL
EN ALPACAS (*Vicugna pacos*)**



**PRESENTADA POR:
SERGIO DANILO PEZO CARREÓN
PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTOR EN CIENCIA ANIMAL**

APROBADA POR EL JURADO SIGUIENTE:

PRESIDENTE

..... 

Dr. CEFERINO UBERTO OLARTE DAZA

PRIMER MIEMBRO

..... 

Dr. Sc. DOMINGO ALBERTO RUELAS CALLOAPAZA

SEGUNDO MIEMBRO

..... 

Dr. PÉDRO UBALDO COILA AÑASCO

ASESOR DE TESIS

..... 

Dra. NUBIA LILIA CATAORA FLORES

Puno, 6 de mayo de 2024.

ÁREA: Salud Animal

TEMA: Efecto de un anacultivo sobre los niveles de IgG en alpacas

LÍNEA: Camélidos Sudamericanos Domésticos



DEDICATORIA

*A mi esposa Roxana Alencastre
Caballero, a mis hijos Sergio
Enrique, y Gabriela Sofía mi
gratitud eterna, por el apoyo que
me brindan en alcanzar mis
objetivos*

En memoria de mis padres

*Rafael Segundo y Zoé Filomena
en la eternidad.*

*A: Sonnia, Elmer, Saúl, Darío y
Dante y esposas.*

Como ejemplo a mis sobrinos.

+A mis grandes amigos en la eternidad

Enrique Franco Llaury.

Virgilio Alarcón Bayona.

Julio Málaga Apaza.

Pedro Mesco Condori.

Sergio Danilo Pezo Carreón.



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Escuela de Posgrado, Doctorado de Ciencia Animal y Docentes quienes me impartieron sus enseñanzas.

Al personal del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura Marangani, Facultad de Medicina Veterinaria Universidad Nacional Mayor de San Marcos y del C.E. La Raya de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco por las facilidades brindadas para la ejecución del presente trabajo.

A la Dra Nubia Lilia Catacora Flores, por su dedicación como asesora de la presente tesis, a mi jurado de tesis Dr. Uberto Olarte Daza, Dr. Domingo Ruelas Calloapaza y al Dr. Pedro Coila Añasco, por sus aportes que enriquecieron la presente tesis.

Mi gratitud a Olga Zea Carreón y familia Zea Martínez por su apoyo durante mis estudios y a mi prima Sara Murillo Pezo.

A mis amigos que de una u otra manera me apoyaron durante la ejecución de la presente tesis.

Por su valiosa colaboración sincera a los señores: Ing. José Becerra Callo, Dr. Nilton Cárdenas Suarez, Alfredo Cruz Taco, Inocencio Alvares Ticona, Mauro Cantani Aroni y Benito Nuñez Quispe.

Sergio Danilo Pezo Carreón.



ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE ANEXOS	vi
ACRÓNIMOS	vii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1	Marco teórico	5
1.1.1	<i>Clostridium perfringens</i>	5
1.1.2	Calostro	22
1.1.3	Sistema inmune en camélidos	26
1.1.4	Enterotoxemia en alpacas	32
1.2	Antecedentes	37
1.2.1	Internacionales	37
1.2.2	Nacionales	43
1.2.3	Locales	45

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1	Identificación del problema	47
2.2	Enunciados del problema	48
2.2.1	Problema general	48
2.2.2	Problemas específicos	49
2.3	Justificación	49
2.4	Objetivos	51
2.4.1	Objetivo general	51
2.4.2	Objetivos específicos	51
2.5	Hipótesis	51



2.5.1	Hipótesis general	51
2.5.2	Hipótesis específicas	52

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Lugar de estudio	53
3.2	Población	53
3.3	Muestra	53
3.4	Método de investigación	55
3.4.1	Experimento 1.	55
3.4.2	Experimento 2.	55
3.4.3	Experimento 3.	56
3.5	Descripción detallada de métodos por objetivos específicos	56
3.5.1	Experimento 1 y 2: Determinar niveles de IgG en alpacas madres y crías inmunizadas con anacultivo a base de <i>Clostridium perfringens</i> en el último tercio de gestación y periodo perinatal respectivamente.	56
3.5.2	Experimento 3: Determinar el porcentaje de mortalidad en crías de alpaca inmunizadas con anacultivo de cepas <i>Clostridium perfringens</i> en el periodo perinatal.	59

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Resultados	60
4.1.1	Determinación de los niveles de IgG en alpacas madres inmunizadas con anacultivo a base de <i>Clostridium perfringens</i> en el último tercio de gestación.	60
4.1.2	Determinar niveles de IgG en alpaca crías inmunizadas con anacultivo a base de <i>Clostridium perfringens</i> en el periodo perinatal.	65
4.1.3	Determinación de la asociación y porcentaje de mortalidad en crías de alpaca inmunizadas con anacultivo de <i>Clostridium perfringens</i> en el periodo perinatal.	68
4.2	Discusión	71
	CONCLUSIONES	74
	RECOMENDACIONES	75
	BIBLIOGRAFÍA	76
	ANEXOS	88
		iv



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
1. Clasificación de tipos de <i>Clostridium perfringens</i> y sus toxinas	15
2. Comparación de medias pareada del grupo experimental y control de alpacas del 9no y 10mo mes de gestación inmunizadas con anacultivo a base de <i>Clostridium perfringens</i>	60
3. Comparación de medias de independencia entre los grupo experimental y control de alpacas del 9no y 10mo mes de gestación inmunizadas con anacultivo a base de <i>Clostridium perfringens</i>	62
4. Comparación de medias pareada del grupo experimental y control de crías de alpacas de 5 y 20 días de nacidas inmunizadas con anacultivo a base de <i>Clostridium perfringens</i>	65
5. Comparación de medias de independencia entre el grupo experimental y control de crías de alpacas de 5 y 20 días de nacidas inmunizadas con anacultivo a base de <i>Clostridium perfringens</i>	66
6. Número de Crías que sobrevivieron y no sobrevivieron en el grupo experimental y control	68



ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
1. Anexo 1. Matriz de consistencia	
2. Anexo 2. Concentraciones de IgG de madres del grupo tratado con anacultivo de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A.	
3. Anexo 3. Concentraciones de IgG de madres del grupo no tratado con anacultivo de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A.	
4. Anexo 4. Concentraciones de IgG de crías del grupo tratado con anacultivo de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A.	
5. Anexo 5. Concentraciones de IgG de crías del grupo no tratado con anacultivo de base de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A.	
6. Anexo 6. Estadístico de mortalidad de crías Shi2	
7. Anexo 7. Porcentaje de Crías que sobrevivieron y no sobrevivieron con anacultivo y sin anacultivo.	
8. Anexo 8. Curva de calibración de concentraciones conocidas de IgG de 203 mg/dL, 1452 mg/dL y 2851 mg/dL.	
9. Anexo 9. Selección de hembras preñadas de 9 meses de gestación.	
10. Anexo 10. Aislamiento de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A	
11. Anexo 11. Elaboración del anacultivo de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A.	
12. Anexo 12. Toma de muestras de alpacas preñadas.	
13. Anexo 13. Toma de muestras de crías de alpacas.	
14. Anexo 14. Uso de la cadena de frio y vacunación de alpacas preñadas.	
15. Anexo 15. Vacunación de crías.	
16. Anexo 16. Materiales para determinación de la cuantificación de niveles de IgG mediante el Test inmunodifusión radial de Triple Farms Bellingham, WA.	
17. Anexo 17. Crías de alpacas vacunadas (marca azul) y no vacunadas (marca roja)	



ACRÓNIMOS

Ac: Anticuerpo.

Ag: Antígenos.

ARN: Ácido ribonucleico

α : Alfa

β : Beta

β 2: Toxina β 2

CPE: *Clostridium perfringens* enterotoxina

CPN50: Cepa de *Clostridium perfringens*

D. E.: Desvío Estándar.

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

ϵ : Épsilon

FTP: Falla de transferencia pasiva en alpacas

GC: Guanina Citocina

HCAbs: Anticuerpos de dominio único

I: Iota

Ig: Inmunoglobulina.

IgA: Inmunoglobulina A

IgD: Inmunoglobulina D

IgE: Inmunoglobulina E

IgG: Inmunoglobulina G

IgG_H: Cadenas pesadas de IgG

IgM: Inmunoglobulina M



IL: interleucinas

KDa: Kilo Dalton.

mg/dL: microgramos/deciLitro

mg: miligramo.

ml: mililitro.

NLRP3: Inflamasoma

pI: Punto isoelectrico

rTA: toxoides recombinantes α

rTB: toxoides recombinantes β

TSC: Triptosa-sulfito-cicloserina

UI/mL: Unidades Internacionales/ miliLitro

VHHs: Anticuerpos de cadena pesada

VirR: Regulador transcripcional

.

RESUMEN

La mortalidad de crías de alpacas ocasiona pérdidas económicas en la crianza alpaquera; una manera de reducirla es inmunizando madres y crías. Se estudió el efecto de un anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A de crías de alpacas muertas por enterotoxemia inactivándola con formol, sobre los niveles de IgG en madres/crías; al noveno mes de gestación, y a los 5 días después del nacimiento, administrándose 2 mL del anacultivo vía subcutánea a madres/crías de un grupo tratado (n=20), y no tratado (n=20), evaluadas al décimo mes de gestación y 20 días de nacidas en madres/crías respectivamente. Se compararon dos grupos de 150 de crías, tratadas y no tratadas, evaluando el efecto del anacultivo sobre la mortalidad de crías. Se cuantificaron concentraciones de IgG en madres/crías mediante Inmunodifusión Radial mediante t de Student. La mortalidad por enterotoxemia se analizó mediante chi-cuadrado. Los resultados mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre alpacas tratadas y en las no tratadas no hubo diferencia ($p \geq 0.05$) al noveno y décimo mes de gestación. Se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los grupos de madres tratadas y no tratadas durante el décimo mes de gestación. En crías, hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de IgG entre crías tratadas, y no hubo diferencia ($p \geq 0.05$) entre las crías no tratadas a los 5 y 20 días de nacidas. Se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre grupos de crías tratadas y no tratadas a los 20 días de nacidas. Existe asociación significativa en la sobrevivencia de crías vacunadas con anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A.

Palabras clave: Anacultivo, alpaca, cría, *Clostridium perfringens* inmunoglobulina G, inmuno difusión radial.

ABSTRACT

Mortality of alpaca babies causes economic losses in alpaca breeding; one way to reduce it is by immunizing mothers and babies. The effect of an anaculture of *Clostridium perfringens* type A from dead alpaca babies due to enterotoxemia, inactivated with formalin, on IgG levels in dams/offspring was studied; at the ninth month of gestation, and at 5 days after birth, administering 2 mL of the anaculture subcutaneously to dams/offspring of a treated group (n=20), and untreated group (n=20), evaluated at the tenth month of gestation and 20 days after birth in dams/offspring, respectively. Two groups of 150 treated and untreated babies were compared, evaluating the effect of anaculture on the mortality of the babies. IgG concentrations in dams/offspring were quantified by Radial Immunodiffusion using Student's t test. Mortality due to enterotoxemia was analyzed by chi-square. The results showed significant differences ($p \leq 0.05$) between treated alpacas and in untreated alpacas there was no difference ($p \geq 0.05$) at the ninth and tenth month of gestation. Significant differences ($p \leq 0.05$) were observed between the groups of treated and untreated dams during the tenth month of gestation. In babies, there were significant differences ($p \leq 0.05$) of IgG between treated babies, and no difference ($p \geq 0.05$) between untreated babies at 5 and 20 days after birth. Significant differences ($p \leq 0.05$) were observed between treated and untreated groups of babies at 20 days after birth. There is a significant association in the survival of vaccinated babies with *Clostridium perfringens* type A anaculture.

Keywords: Anaculture, alpaca, baby, *Clostridium perfringens* immunoglobulin G, radial immune diffusion.

INTRODUCCIÓN

La enterotoxemia producida por toxinas de *Clostridium perfringens* tipo A se caracteriza por ser un proceso agudo de curso rápido de muerte súbita generalmente ausente de diarrea cuyas tasas de mortalidad pueden alcanzar entre el 50 a 70% durante las primeras cuatro semanas de vida; se le reconoce como un brote o epizootia durante la época de parición (Ramírez, 1991). La enfermedad frena el progreso económico de la producción alpaquera en el ámbito altoandino causando inconvenientes para los trabajos de selección, reemplazos, retraso del crecimiento poblacional e interfiriendo con programas de mejoramiento genético (Fernández-Baca, 2005).

La enterotoxemia, representa la principal causa de pérdidas económicas para los criadores de alpacas (Ameghino y DeMartini, 1991). Se trata de una enfermedad infecciosa aguda causada por *Clostridium perfringens*, que afecta principalmente a las crías entre la segunda y tercera semana de vida (Ramírez, 1991). Su patología se origina por una toxemia intestinal primaria en el yeyuno e íleon, derivando en una toxemia generalizada debido a las toxinas del *Clostridium perfringens* tipo A, que provocan daños irreversibles en el endotelio vascular y el sistema nervioso. Por lo general, estas manifestaciones clínicas progresan rápidamente y culminan con la muerte súbita del animal (Ramírez et al., 1998). Hasta el momento, no se ha desarrollado un tratamiento efectivo para combatir la enterotoxemia en crías de alpacas. Los tratamientos con antibióticos y laxantes muestran resultados de relativo éxito y variables (Pezo-Carreón et al., 1999).

La vacuna base de *Clostridium perfringens* tipo A obtenida de crías de alpacas muertas por enterotoxemia es utilizada contra las toxinas de *Clostridium perfringens* inactivada con formaldehído no destruye los sitios inmunogénicos y conserva la capacidad de producir anticuerpos; en 1924, Ramón demostró que las toxinas podían inactivarse mediante un tratamiento con formaldehído, produciendo un anacultivo no tóxico (Thaysen-Andersen et al., 2007). La acción protectora del anacultivo en la enterotoxemia de crías de alpacas con toxinas de *Clostridium perfringens* tipo A fue descrita desde los estudios iniciales de la enfermedad en el Perú siendo utilizada en programas de control de la enfermedad (Rosadio A. et al., 2012; Pezo-Carreón et al., 2018). Las crías son afectadas durante el periodo crítico desde la primera a la cuarta semana donde la cría debe ser protegida con anticuerpos maternos de madres vacunadas;

si las crías están vacunadas la mortalidad se reduce significativamente; sin embargo, la aparente protección contra enfermedades obtenida al vacunar a las crías puede deberse a la presencia de anticuerpos maternos residuales de madres vacunadas el año anterior o de exposición previa a enterotoxemia o mortalidad en granjas de alpacas (Rosadio A. et al., 2012). Esta periodicidad podría deberse a la existencia de anticuerpos en las madres después de brotes naturales de enfermedades. (Yaya L. y Rosadio A., 2005).

Existe registros del uso de productos biológicos comerciales para prevenir la enterotoxemia en alpacas en el país (Ameghino y DeMartini, 1991), aunque algunas experiencias preliminares sugieren que la aplicación de una vacuna anticlostridial puede reducir las tasas de mortalidad neonatal (Moro, 1987). Por lo tanto, el uso de un anacultivo a base de *Clostridium perfringens* tipo A de casos de crías muertas por enterotoxemia en estudios de campo ha demostrado una buena eficacia en el control de la enfermedad clostridial en crías de alpacas; la evaluación y difusión de estos resultados ayudarán a superar las limitaciones por las altas tasas de mortalidad por enterotoxemia en crías de alpacas que enfrenta el sector alpaquero en el Perú.

Aplicar un programa de vacunación utilizando un anacultivo a base de *Clostridium perfringens* tipo A obtenido de casos de crías muertas por enterotoxemia con coberturas superiores al 90% ayudará a reducir los brotes de enfermedades endémica en crías de alpacas (Pezo-Carreón et al., 2018). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de un anacultivo a base de *Clostridium perfringens* tipo A sobre los niveles de IgG en alpacas madres y crías inmunizadas en el último tercio de gestación y periodo perinatal y sobre la mortalidad por enterotoxemia en crías de alpacas.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Marco teórico

1.1.1 *Clostridium perfringens*

El *Clostridium perfringens* son bacterias grampositivas anaerobias que desarrollan esporas resistentes al calor, es un patógeno que infecta a humanos y animales, su importancia patógena de este organismo es causante de gangrena gaseosa, intoxicación alimentaria en el hombre y diversas formas de enteritis aguda y enterotoxemias mortales en animales; esta bacteria es fermentativa y crece rápidamente en medios que contienen carbohidratos; en estas condiciones produce grandes cantidades de hidrógeno y dióxido de carbono, que ayudan a mantener un ambiente anaeróbico (Rood y Cole, 1991). Las cepas de *Clostridium perfringens* se dividen en 5 tipos A, B, C, D y E, según la síntesis de una o más toxinas principales α , β , ϵ , y ι (Hatheway, 1990).

Por más de 150 especies está conformado el género *Clostridium* clasificados según su producción de toxinas y patogenicidad; representan a género: *Clostridium perfringens*, *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. haemolyticum*, *C. botulinum*, entre otros (Morris et al., 2011). Las toxinas del género *Clostridium* son proteínas biológicamente activas y antigénicas; su actividad puede neutralizarse con antisueros apropiados; el peso molecular oscila entre 22 y 600 kDA (Hatheway, 1990).

La patogenicidad se debe a la producción de 17 toxinas, de las cuales las toxinas alfa (α), beta (β), épsilon (ϵ) y iota (i) son las más letales y se consideran las toxinas más importantes porque se utilizan para la clasificar los microorganismos y la presencia de pequeñas cantidades de toxinas que pueden o no ser patógenas y no se mencionan en la clasificación del microorganismo (Morris y Fernández-Miyakawa, 2009).

A. Taxonomía

El *Clostridium perfringens* taxonómicamente se clasifica según el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Garrity et al., 2004) en:

Dominio: *Bacteria*

Phylum: *Firmicutes*

Clase: *Clostridia*

Orden: *Clostridiales*

Familia: *Clostridiaceae*

Género: *Clostridium*

Especie: *Clostridium perfringens*

B. Hábitat

El *Clostridium perfringens* tipo A esta en el contenido intestinal de mamíferos y humanos, medio ambiente, aguas residuales y suelo. El tipo A suele producir gangrena gaseosa (Mionecrosis) y enfermedades ocasionadas por alimentos en humanos (Ata et al., 2013). Las cepas tipo B, C, D y E no sobreviven en los suelos se ubican en los intestinos de los animales domésticos y, en ocasiones, en humanos, Las cepas de tipo B se han implicado en la disentería de los corderos, en la enterotoxemia de las ovejas y las cabras. Las cepas de tipo C han causado enteritis necrótica grave en humanos debido a la toxina β , son la causa de enterotoxemia en

corderos y ovejas, y se han encontrado en enteritis necrótica en bovinos, corderos y cerdos. (Hatheway, 1990).

C. Morfología, fisiología y crecimiento bacteriano

Clostridium perfringens desarrolla a una temperatura adecuada de 45°C, (20 y 50°C) en agar sangre, las colonias muestran signos de doble hemólisis alrededor de la colonia, áreas claras por toxina theta y áreas opacas por la toxina α y las colonias que desarrollan en agar yema de huevo están rodeadas por grandes áreas redondas y opacas debido a la lecitinasa reacción que es inducida por la toxina α (Hatheway, 1990).

Los organismos son bacilos rectos grampositivos rectangular con extremos romos que se presentan solos o en parejas, de 0.6 a 2.4 x 1.3 a 19.0 μm de largo (Tizard, 2009). Son inmóviles, las características bioquímicas más importantes para su identificación producen proteasa, gelatinasa y fosfolipasa C; no producen lipasa ni catalasa; producen gas, y como productos terminales reducen nitrato, fermentan glucosa, lactosa, maltosa y otros azúcares y licúan gelatina, se obtiene ácido acético, butírico, láctico, H_2 y CO_2 , se observa una "fermentación tormentosa" en la leche, por la producción de gas, fermentación de lactosa y coagulación, y la no digestión de caseína; el organismo suele ser fácil de recuperar de cultivos mixtos (Songer, y Miskimins, 2005; Morris y Fernández-Miyakawa, 2009).

Esta bacteria es anaerobia estricta relativamente aerotolerante, conformada por un grupo de bacterias grampositivas que no crecen en presencia de oxígeno y tienen la capacidad de formar endosporas resistentes al calor (Rood y Cole, 1991). Aunque *Clostridium perfringens* es estrictamente anaeróbico, las células vegetativas y estacionarias pueden sobrevivir en una etapa de crecimiento detenido en presencia de oxígeno y/o bajas concentraciones de radicales superóxido e hidroxilo, que posee una respuesta adaptativa al estrés oxidativo, que puede activarse tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Briolat y Reysset, 2002). Durante el crecimiento en medio líquido, va produciéndose abundante de gas, debido a los azúcares fermentables. En agar sangre, las colonias

crecen rápidamente, son circulares, regulares, lisas, y de color grisáceo, las colonias se extienden con una «doble zona» de hemólisis, una zona grande de α -hemólisis y otra más interna de β -hemólisis (Briolat y Reysset, 2002).

El *Clostridium perfringens* puede aislarse y cultivarse en medio de carne cocida a 37 °C durante 24 a 48 horas y sembrarse en una placa que contiene agar sangre de carnero con sulfato de neomicina, incubarse en condiciones anaeróbicas a 37 °C durante 24 a 48 horas. Las colonias se analizan según la forma, color y tipo de hemólisis. La morfología bacteriana se evalúa microscópicamente en frotis teñidos por coloración de Gram. (Collins et al., 2004; Miranda, y Rojo, 2010).

También se puede identificar la lecitinasa del *Clostridium perfringens* que destruye la lecitina de las membranas celulares en medios con suero o yema de huevo observándose una opalescencia; esta reacción es denominada “reacción de Nagler“, se atribuye a la toxina α que es una lecitinasa que daña las membranas celulares e hidroliza la esfingomielina, de importancia en la gangrena gaseosa, separando la lecitina, principal fosfolípido de las membranas celulares, en fosforilcolina y diacilglicerol; cuando la reacción es lecitinasa positiva: aparece una zona opaca alrededor del crecimiento microbiano, como resultado de la hidrólisis de la lecitina de la yema de huevo (Nagler, 1939).

En lechones a la necropsia se obtuvieron muestras de intestino delgado, estómago, hígado, bazo y riñón para exámenes bacteriológicos para aislamiento de *Clostridium perfringens*, las muestras se cultivaron en condiciones anaeróbicas en medio triptosa-sulfito-cicloserina (TSC) (Oxoid) suplementado con emulsión yema de huevo (Oxoid) y en agar Columbia con 5% (Oxoid) de sangre de oveja; los medios inoculados se incubaron durante la noche a 37°C; los cultivos aislados de *Clostridium perfringens* demostraron mediante ELISA la presencia de α -toxina; los resultados mencionados confirman el fenómeno de opalescencia alrededor de las colonias causado por la actividad lecitinolítica del *Clostridium*

perfringens tipo A, observado en el cultivo de los aislados en agar TSC con emulsión de yema de huevo (Wasiński, 2007).

El modelo principal de las lecitinasas clostridiales es la toxina alfa de *Clostridium perfringens*, que es clave en la prueba de Nagler; desde un punto de vista enzimático, la toxina alfa de *Clostridium perfringens* actúa como una fosfolipasa C. Las lecitinasas producidas por *C. sordeffli*, *C. bifermentans* y *C. baratii* son algo inhibidas por el suero anti-*Clostridium perfringens*, mientras que las producidas por *C. novyi* tipo A y B, y *C. haemolyticum* son neutralizadas por sus propios sueros específicos, pero no por el suero anti-*Clostridium perfringens*. Las lecitinasas de *C. novyi* tipo B y *C. haemolyticum* (toxina beta) pueden ser diferenciadas serológicamente de las de *C. novyi* tipo A (toxina gamma). Aunque *C. sordeffli*, *C. bifermentans* y *C. baratii* dan positivo en la prueba de Nagler, la neutralización es menos evidente, posiblemente debido a la cantidad de lecitinasa producida por el organismo, la actividad específica de la enzima y la afinidad de los anticuerpos hacia la molécula proteica (Hatheway, 1990).

Pérez et al., (2012) de 47 crías de alpacas muertas por enterotoxemia, cultivaron en caldo tioglicolato e incubadas a 45°C por 48 h en ambiente de anaerobiosis, tomaron alícuotas del medio y sembraron en agar sangre e incubadas bajo las mismas condiciones; las colonias de *Clostridium perfringens* fueron identificadas en base a características morfológicas de la colonia, patrón hemolítico, coloración Gram y reacción negativa a la catalasa; los aislados se sembraron en emulsión yema de huevo a 37 °C por 18-24 h en anaerobiosis para observar la reacción de Nagler, los aislados positivos los reactivaron en medio tioglicolato y fueron conservados a -20 °C para análisis moleculares.

D. Características del genoma

Se ha establecido un primer mapa físico del genoma de *Clostridium perfringens* por electroforesis en gel de campo pulsado. Los sitios de reconocimiento de seis endonucleasas de corte raro en solo un cromosoma circular de aproximadamente 3,6 millones de pares de bases,

definiendo 50 intervalos genéticos arbitrarios de entre 10 y 250 pares de kilobases; esto facilitó considerablemente la localización cromosómica de unos 24 genes y loci para lo que permitió la construcción del mapa del genoma de una especie clostridial (Garnier et al., 1991). El mapa físico del cromosoma de 3,6 megabases de *Clostridium perfringens* CPN50 se amplió mediante endonucleasas, clonando y secuenciando fragmentos cromosómicos aleatorios, identificando las funciones de los genes putativos mediante búsquedas en bases de datos y análisis de hibridación; este mapa genético ampliado codifica funciones domésticas, mientras que otros son implicados en la esporulación y patogénesis (Katayama et al., 1995)

Se comparó el mapa genético previamente informado de la cepa CPN50 con la cepa 13 de *Clostridium perfringens* y no hubo un cambio fundamental en sus estructuras genómicas, pero se encontró una gran región eliminada (-400 kb) en el genoma de la cepa 13, la secuenciación de nucleótidos del genoma de la cepa 13 del *Clostridium perfringens* se realizó utilizando una estrategia “shotgun” de secuenciación de genoma completo. Un total de 52.198 plantillas se secuenciaron y ensamblaron en 194 “contigs”. 82 gaps se llenaron posteriormente mediante secuenciación directa por PCR, lo que finalmente produjo un cromosoma circular completo. Durante el proceso de secuenciación, se derivó (contigs 180) de un plásmido de 50 kb, como se predijo en el estudio de mapeo (Shimizu et al., 2002)

La secuencia completa de 3031.430 pares de bases de la cepa 13 de *Clostridium perfringens* comprende 2660 regiones codificantes de proteínas y 10 genes de ARNr, que muestra un contenido global de GC bajo (28.6 %). El genoma contiene enzimas típicas de fermentación anaeróbica que conducen a la producción de gas, pero no contiene enzimas para el ciclo Krebs por lo tanto ni sustrato para la cadena respiratoria. Se encontraron varias enzimas sacarolíticas, pero faltaban muchas enzimas para la biosíntesis de aminoácidos en el genoma. Veinte genes fueron identificados recientemente como factores de virulencia putativos de *Clostridium perfringens*, encontrando un total de cinco genes de

hialuronidasa que también contribuyen a la virulencia y conocer la producción de varias enzimas degradantes y toxinas, lo que resulta en una destrucción masiva de los tejidos del huésped (Shimizu et al., 2002).

El *Clostridium perfringens* secreta muchas enzimas y toxinas extracelulares, que están regulada positivamente por los genes reguladores de dos componentes virR y virS e implicadas en el proceso de enfermedades por clostridiosis. Estas toxinas incluyen la toxina α (o fosfolipasa C), la toxina theta (o perfringolisina O) y la toxina kappa (o colagenasa), que están codificadas por los genes plc, pfoA y colA, respectivamente; determinando que el sistema virR/virS modula sus efectos a través de genes reguladores secundarios que son específicos para cada gen estructural de toxina o que la proteína VirR no tiene una única secuencia de unión consenso; estudios recientes han demostrado que la α toxina es un factor de virulencia esencial en la gangrena gaseosa (Williamson y Titball, 1993; Ba-Thein et al., 1996).

E. Virulencia del *Clostridium perfringens*

Uno de los factores de virulencia es la formación de poros, mecanismo usual para varias toxinas bacterianas. Más de un tercio de las toxinas clostridiales son toxinas formadoras de poros (PFT) pertenecientes a la clase β -PFT. Se secretan como monómeros solubles ricos en cadenas que reconocen un receptor específico en las células diana y se ensamblan en oligómeros. Luego, experimentan una transformación estructural formando un depósito, que se inserta en la bicapa lipídica formando poro funcional. Según su estructura, las PFT clostridiales se dividen en varias familias. Las citolisinas dependientes del colesterol clostridial forman poros grandes que alteran la integridad de la membrana plasmática implicados principalmente en la mionecrosis (Popoff, 2014)

La virulencia del *Clostridium perfringens* también está dada por las exotoxinas y enzimas sintetizadas relacionadas con su potencial patógeno, las cuales son la base de su clasificación. El tipo A tiene sólo la toxina α ; el tipo B las toxinas α , β y ϵ ; el tipo C las toxinas α y β ; el tipo D

las toxinas α y ϵ ; y el tipo E las toxinas α y τ (Songer y Meer, 1996; Petit et al., 1999).

La toxina α es la más importante, es una lecitinasa (fosfolipasa) que lisa glóbulos rojos, blancos, plaquetas y células endoteliales (Murray PR, et al., 2021), provoca hemolisis masiva, aumento del sangrado destrucción de las plaquetas, destrucción de tejidos, hepatotoxicidad y disfunción miocárdica (bradicardia, hipotensión) que resulta en un aumento de la permeabilidad vascular, esta toxina tipo A produce la mayor cantidad de toxinas α . La toxina β causa estasis intestinal, destrucción de la mucosa, formación de lesiones necróticas y desarrollo de enteritis necrotizante. La toxina ϵ , una prototoxina, se activa por la tripsina y aumenta la permeabilidad vascular de las paredes del tracto digestivo (Murray PR, et al., 2021). La toxina τ , la cuarta toxina letal que produce el tipo E, tiene una actividad necrosante y aumenta la permeabilidad vascular (J. Songer, 1996).

La señalización del inflamasoma NLRP3, es un pilar central de la inmunidad innata que desencadena inflamación y muerte celular en respuesta a microbios y señales de peligro; la lecitinasa de *Clostridium perfringens* (también conocida como fosfolipasa C) y la perfringolisina O de *Clostridium perfringens* inducen distintos mecanismos de activación. La lecitinasa ingresa a las estructuras vesiculares LAMP1+ e induce la desestabilización de la membrana lisosomal; además, la lecitinasa estimula la secreción de las interleucinas IL-1b e IL-18 dependientes de la inflamasoma, y provocando muerte celular independientemente de las proteínas formadoras de poros gasdermina D, MLKL y la proteína efectora de muerte celular ninjurin-1 o NINJ1. Se ha demostrado que la lecitinasa desencadena la inflamación a través del inflamasoma NLRP3 in vivo y que el bloqueo farmacológico de NLRP3 usando MCC950 previene parcialmente la letalidad inducida por lecitinasa, estos hallazgos revelan que la lecitinasa activa una vía alternativa para inducir la inflamación durante la infección por *Clostridium perfringens* (Mathur et al., 2023).

Además de las exotoxinas existen otros factores de virulencia presentes en *Clostridium perfringens*, los cuales se han asociado a complicaciones entéricas, entre los que se encuentra la enterotoxina (CPE), producida principalmente por el *Clostridium perfringens* tipo A. (Hatheway, 1990; Petit et al., 1999). Petit et al., (1999) menciona que la endotoxina CPE es elaborada sólo en la fase de esporulación, provocando en la mucosa intestinal pérdida de fluidos y electrolitos (Smedley et al., 2004), funcionando como un súper antígeno estimulando la actividad de los linfocitos T (J. Songer, 1996). la toxina β_2 es otro factor de virulencia, con similar actividad biológica a la toxina β , no teniendo la misma secuencia de aminoácidos de la toxina (Smedley et al., 2004).

Se examinó la diversidad genética de aislamientos de *Clostridium perfringens* tipo A determinando la existencia de genes de la toxina β_2 (cpb2) y de la enterotoxina (cpe) revelando una amplia diversidad genética entre los aislamientos de *Clostridium perfringens* tipo A; la mayoría de los aislamientos de cerdo, caballo y oveja portaban el gen cpb2 y todos los aislamientos que se originaron en brotes de intoxicación alimentaria portaban el gen cpe y tres de ellos también portaban cpb2 identificándose dos poblaciones evolutivas diferentes mediante el análisis de secuencias de los genes cpb2 parcialmente secuenciados de diferentes especies animales como de brotes de intoxicación alimentaria (Johansson et al., 2006)

F. Principales Toxinas

Nagler, (1939) cultivó *C. welchii* en suero humano y observó que desarrollaba una opalescencia y esporádicamente una capa de grasa de rosada encima de la superficie del medio líquido, la opalescencia ocurría en todos los tipos de toxinas exógenas de *C. welchii*, y no en otros cultivos bacterianos, demostrando que esta reacción se correlaciona con la letalidad de la toxina tipo A. Macfarlane y Knight, (1941) comprobaron que cuando cultivaban *Clostridium welchii* en una emulsión de yema de huevo con solución salina se producía una opalescencia de color crema debido a la fusión con los glóbulos de grasa.

Nagler, 1939; Macfarlane y Knight, (1941) encontraron que esta respuesta es causada solo por la toxina *alfa* (α), principal factor de letalidad de filtrados tipo A, mientras que las toxinas como β (β), *delta* (δ), *épsilon* (ϵ) y *tetha* (θ) carecían de efecto, y que hemólisis conjuntamente con la yema de huevo eran inducidas por la toxina α (α) y activada por iones Ca^{++} y enfatizaron que este “paralelismo estricto” de la hemólisis por toxina α y la formación de lípidos libres producido por la yema de huevo, plantearon que ambas reacciones probablemente eran manifestaciones de una sola reacción enzimática, describiendo a la toxina α como una toxina con actividad enzimática.

Se reconocen cinco tipos de toxinas A, B, C, D y E de *Clostridium perfringens* sobre la base de las cuales se producen toxinas letales α , β , ϵ , ι , asociadas a una especie animal con una infección entérica específica (Ohtani y Shimizu, 2016); las toxinas el *Clostridium perfringens*, se obtienen mediante la preparación de filtrados de cultivos tóxicos y sus correspondientes sueros antitóxicos y observando la protección diferencial de ratones por parte de los sueros. El antisuero tipo A neutraliza solo los cultivos tipo A, el tipo B neutraliza los cuatro tipos, el tipo C neutralizaba todos menos el tipo D y el tipo D neutraliza los cultivos tipo A y D reconociendo que sus filtrados inmunizantes contenían múltiples antígenos. Estos antígenos fueron posteriormente designados como α , presentes en los cuatro tipos; β , presente en los tipos B y C; y *épsilon*, presente en los tipos B y D. La antitoxina de tipo E neutraliza los filtrados tóxicos de tipo A, así como los de la cepa homóloga, pero no los de tipo B, C o D (Hatheway, 1990; Uzal et al., 2010).

Tabla 1

Clasificación de tipos de Clostridium perfringens y sus toxinas

TIPO	α	β	ϵ	ι	Toxinas producidas	
					CPE	$\beta 2$
<i>C. perfringens</i> tipo A	+	-	-	-	+/-	+/-
<i>C. perfringens</i> tipo B	+	+	+	-	+/-	+/-
<i>C. perfringens</i> tipo C	+	+	-	-	+/-	+/-
<i>C. perfringens</i> tipo D	+	-	+	-	+/-	+/-
<i>C. perfringens</i> tipo E	+	-	-	+	+/-	+/-

Nota. Uzal et al. (2010).

F.1 Toxina alfa (α)

Es producida por *Clostridium perfringens* tipo A, obtenidas de contenido intestinal normal o de las heces. La α -toxina es una enzima, conocida químicamente como fosfolipasa-C (lecitinasas-C), se compone de un dominio N-terminal (1–250 aminoácidos (aa), dominio N), que es el sitio catalítico, y un dominio C-terminal (251–370 aa, dominio C), que es el sitio de unión a la membrana. que hidroliza lecitina en fosforilcolina y un diglicerido, responsable del daño tisular en la mionecrosis (gangrena gaseosa) causada por este organismo (Oda et al., 2015).

La inmunización de cobayos con α -toxina los protege contra la gangrena gaseosa cuando se exponen a *Clostridium perfringens* y su toxina, la toxina hidroliza la fosfatidilcolina y en menor medida, la esfingomielina, pero no otros fosfolípidos. Se ha demostrado que la toxina α afecta la función del miocardio, causando hipotensión y bradicardia, lo que resulta en shock, la toxina también aumenta la permeabilidad vascular una característica común y a menudo fatal de la gangrena gaseosa por ejemplo en las células la mayoría de sus membranas consisten en complejos de lipoproteínas que contienen lecitina, responsable de la reacción de lecitinasas en medio de yema de huevo y de la zona turbia hemolizada en agar sangre, estas actividades hemolítica y lecitinasas de la toxina α se pueden utilizar como índice del crecimiento bacteriano, la toxina α conduce a su destrucción el efecto biológico resultante es hemólisis, necrosis o muerte, dependiendo de tejidos accesibles a la toxina

produciendo enterotoxemia en ovejas y terneros, a veces denominada "muerte súbita" (Nagler, 1939).

Clostridium perfringens tipo A, ocasiona enteritis necrotizante en ovinos, bovinos, porcinos y equinos, produce las toxinas α y β es una especie clostridial invasora se transmite a través de heridas o ingestión de esporas, puede invadir y multiplicarse en los tejidos, produce por lo menos 12 proteínas antigénicas, 4 son toxinas, de las cuales la α es la más potente que se define como dermonecrótica, letal y hemolítica, es altamente antigénica no es termoestable y tiene anticuerpos antitoxina α específico, la única toxina capaz de neutralizar sus efectos; esta α toxina actúa sobre las membranas celulares, mitocondrias y lipoproteínas que contienen lecitinas (Morris et al., 2011).

La toxina α es una metaloproteína porque contiene zinc y está compuesta de una sola cadena polipeptídica simple de 43 kDa de 370 aa, el zinc desempeña un papel preponderante en el equilibrio y reacciones enzimáticas (Drigo et al., 2010); su punto isoeléctrico es 5.4 y tiene actividad lecitinasa porque desdobra la lecitina en fosforilcolina, diacilglicerol y una hemolisina tiol activada (θ – toxina o perfringolisina O), la toxina puede dañar las membranas celular de los glóbulos rojos, leucocitos y las células musculares, causando hemólisis o necrosis celular (Hatheway, 1990).

Las toxinas α es el principal factor de virulencia que causa gangrena gaseosa en humanos y en animales la enteritis necrotizante (necrosis del tejido intestinal) de bovinos, equinos y pollos (Hatheway, 1990). Todos los tipos de *Clostridium perfringens* tienen un gen *plc* que codifica esta toxina; sin embargo, no todas las cepas lo producen y las cantidades producidas varían ampliamente; esta toxina tiene actividad enzimática, tanto fosfolipasa como esfingomielina, además es hemolítica y dermonecrótica (Morris y Fernández-Miyakawa, 2009)

La hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana celular provoca la acumulación de diacilglicerol, sustancias que pueden estimular vías celulares asociadas a los efectos citotóxicos observados, como la vía del

ácido araquidónico. Esta acumulación tiene la capacidad de funcionar como un activador de la proteína quinasa C, una enzima que simultáneamente activa las fosfolipasas C y D. Además, la activación de esta vía conlleva a la producción de tromboxano A₂, un influyente mediador en la respuesta inflamatoria (Morris y Fernández-Miyakawa, 2009).

F.2 Toxina β

El *Clostridium perfringens* tipo B produce toxinas α , β y ϵ psilon se asocia con enteritis necrotizante y enterotoxemia principalmente en individuos recién nacidos de ovinos y otras especies animales (J. Songer, 1996). Los *Clostridium perfringens* tipo B producen toxina β necrotizantes y letales causando daño intestinal severo; la toxina B se ha purificado hasta la homogeneidad y se ha demostrado que corresponde a una proteína termo sensible de 28 kDa que es muy sensible a la tripsina (Rood y Cole, 1991). Las concentraciones inusualmente altas de proteína en el tracto intestinal facilitan el crecimiento excesivo de *Clostridium perfringens* tipo B (animal) o C (humano), lo que lleva a niveles letales de toxina β , formando canales selectivos de cationes en las membranas lipídicas descubriéndose que la β toxina recombinante de *Clostridium perfringens* tipo C aumenta la conductancia de las membranas lipídicas bicapa al inducir la actividad del canal (Shatursky et al., 2000).

La disentería del cordero generalmente se desarrolla durante los primeros días de vida, aunque los corderos más viejos pueden verse afectados a medida que avanza el brote; después de que la infección se adquiere de la madre o del medio ambiente, los organismos en el intestino aumentan en número, especialmente durante la lactancia intensa de la madre, da como resultado la enterotoxemia con enteritis hemorrágica y extensas ulceraciones del intestino delgado; el signo primario es la muerte súbita, sin previo aviso en casos muy agudos, en incidentes agudos, la interrupción de la alimentación y el dolor abdominal intenso se acompañan de diarrea con sangre, con decúbito, coma y muerte menos de 24 h después

del inicio, la incidencia suele llegar al 30%, con tasas de letalidad cercanas al 100%. (J. Songer, 1996; Lebrun et al., 2010)

La enfermedad crónica en corderos mayores se manifiesta como dolor abdominal crónico sin diarrea; el tipo B también puede estar asociado con enteritis hemorrágica en cabras, terneros y potros; se han realizado pocos estudios experimentales sobre infecciones por tipo B; no se sabe si predomina un efecto individual de la toxina α , β o ϵ o si hay efectos aditivos o sinérgicos. (J. Songer, 1996); la toxina β contribuye a los daños intestinales al dirigirse a las células endoteliales y potencialmente a los trombocitos, lo que provoca daño vascular y hemorragia. Desde una perspectiva macroscópica, la región del intestino afectado muestra un tono de color azul púrpura profundo y, a simple vista, da la impresión de ser un infarto relacionado con una torsión mesentérica. (Posthaus et al., 2020)

Frecuentemente, el tratamiento resulta poco efectivo debido a la severidad de la enfermedad., pero si está disponible, está indicado el suero hiperinmune específico y la administración oral de antibióticos puede ser útil. La enfermedad se controla mejor vacunando la borrega preñada en el último tercio con 2 vacunas con 1 mes de diferencia, y luego anualmente. Cuando ocurren brotes en recién nacidos de borregas sin vacuna, se administra el antisuero inmediatamente después del nacimiento (Ata et al., 2013)

F.3 Toxina *épsilon* (ϵ)

Es una proteína de 33 kDa pertenece a la familia de toxinas tipo aerolisina es causada por el *Clostridium perfringens* tipos B y D, responsables de las signos patologías de la enterotoxemia, predominantemente neurológica de las ovejas, cabras y ocasionalmente en bovinos, se presenta en corderos que tienen menos de 2 semanas de nacidos (Stiles et al., 2013) o en animales que son destetados en corrales de engorde y se les suministran dietas ricas en carbohidratos, o en menor medida, en pastizales verdes y frondosos; conforme se incrementa la ingesta de almidón, se crea un entorno propicio para el crecimiento

excesivo de *Clostridium perfringens*, produciendo toxina *épsilon* que es tanto letal como necrotizante, aunque aún no se ha identificado su actividad biológica precisa, causando daño vascular, particularmente en los capilares del cerebro observándose con frecuencia, hay hipoglucemia o glucosuria y signos como opistótonos, dar vueltas y empujar la cabeza contra objetos fijos que son signos neurológicos comunes que es de gran interés veterinario porque causa una enterotoxemia rápidamente fatal entre los ungulados, lo que comúnmente se conoce como riñón pulposo o enfermedad por sobrealimentación (Rood y Cole, 1991; Ata et al., 2013)

La toxina *E* se produce en forma de precursor y se activa después de la eliminación proteolítica de un péptido de residuo de 14 aminoácidos del terminal NH₂ de la protoxina, la proteólisis puede resultar de la acción de las proteasas de *Clostridium perfringens*, como la toxina X, o el efecto de la tripsina en el intestino. Entre los síntomas provocados por la toxina C se encuentran el aumento de la permeabilidad intestinal, el edema pulmonar y el exceso de líquido pericárdico. Su efecto más llamativo es sobre los riñones, que se hinchan e hiperémicos o, en las ovejas, se vuelven pulposos unas pocas horas antes de la muerte. Dado que se puede conferir inmunidad mediante la vacunación con una preparación de anacultivo, el gen de la toxina *Épsilon*, *etx*, representó un objetivo importante para los biotecnólogos. Este gen se ha clonado y secuenciado recientemente para producir una vacuna veterinaria de segunda generación, y los estudios de mapeo preliminares indican la ubicación de un plásmido (Rood y Cole, 1991; Stiles et al., 2013)

F.4 Toxina Iota (I)

Esta toxina tiene acción necrótica en la piel, en ratones es letal provocando alteraciones en la permeabilidad (Rood y Cole, 1991). Consta de dos componentes inmunológica y biológicamente distintos: un componente enzimático (Ia) y un componente de unión (Ib), siendo necesaria para la acción citotóxica (Hatheway, 1990). La toxina *I* está ubicada en un plasmidio codificada por dos genes que se combinan y organizan en un solo operón, el componente Ia, codificado por el gen *iap*,

con un peso molecular de 47,5 kDa y un pI de 5.2 ADP-ribosiltransferasa específica de actina activa (Hatheway, 1990; Songer y Meer, 1996). y el gen *ibp* que codifica el componente Ib, de un peso molecular de 100 kDa y un punto isoelectrico (pI) de 4,2, reconociendo receptores por un proceso de endocitosis, mientras que el componente Ia ingresa al citoplasma y la superficie celular, siendo esencial para la internalización de ambos componentes (Hatheway, 1990; Petit et al., 1999).

Los componentes Ia e Ib son sintetizados en la fase de crecimiento exponencial liberándose en prototoxinas. Su liberación ocurre mediante la escisión de un péptido N-terminal de 20 kDa en el caso de la fracción Ib (80 kDa), y un residuo N-terminal de 9 a 11 aminoácidos en la fracción Ia. Posteriormente, ambos componentes se activan proteolíticamente. El componente Ia realiza su acción intracelular catalizando la unión de ADP-ribosa a los sitios de actina, previniendo así la nucleación y polimerización de los monómeros de actina ribosilados con ADP. Esto resulta en la despolimerización de los filamentos de actina 12 y la acumulación de actina en forma polimérica (J. G. Songer y Meer, 1996).

F.5 *Clostridium perfringens*: Enterotoxina (CPE)

Esta endotoxina es sintetizada en la etapa de esporulación, provocando en los enterocitos una masiva secreción de agua e iones, lo que provoca la liberación y disminución de las microvellosidades intestinales y careciendo de actividad necrótica (Rood y Cole, 1991). Es producido por el 5% de la población de *Clostridium perfringens* (Smedley et al., 2004), principalmente por cepas de tipo A, algunas del tipo B, C, D y E (Hatheway, 1990; Petit et al., 1999). El CPE es un péptido de 309 aminoácidos con un peso molecular de 35 kDa codificado por el gen *cpe* y se puede encontrar en regiones variables de los cromosomas o en plásmidos largos (Smedley et al., 2004). La tripsina y la quimotripsina proporcionan rompen los enlaces de 10 a 44 aminoácidos N-terminales, dando como resultado un incremento de la actividad citotóxica del CPE (Hatheway, 1990; Songer y Meer, 1996).

Los receptores unidos al CPE forman un pequeño complejo de 90 kDa que se inserta en la membrana celular (Rood y Cole, 1991; Smedley et al., 2004). Este complejo se asocia inmediatamente con una proteína de membrana de 70 kDa formando un complejo más grande hidrofóbico (160 kDa); este complejo tiene una naturaleza similar a un poro que facilita que moléculas pequeñas ingresen libremente a través de la membrana y conduce a cambios en su permeabilidad. En última instancia, esto conduce a la ruptura osmótica coloidal y apoptosis celular (Rood y Cole, 1991; Petit et al., 1999; Smedley et al., 2004).

F.6 Toxina B 2 (β_2).

La toxina (B 2) y su gen *cpb2* se caracterizó a partir de una cepa de *Clostridium perfringens* asociadas a enfermedades animales como enteritis necrótica de lechones y la enterocolitis en caballos, este gen *cpb2* está implicado en la expresión de enfermedades intestinales de animales (Jost et al., 2005). El gen en mención está ubicado en un plásmido de 59 a 100 kb cuya expresión está controlado por un sistema regulador transcripcional VirR/ VirS regulación positiva, siendo su punto extremo en la fase logarítmica tardía, la presencia del gen *cpb2* ha sido reportada en varias especies de *Clostridium perfringens*, pero su expresión no fue confirmada en todas las especies (Schotte et al., 2004; Jost et al., 2005).

El gen *Cpb2* codifica un péptido de 31 kDa que se transcribe y procesa en una toxina bioactiva de 28 kDa y pI 5.01 es letal en ratones (dosis de 3 μ g) (Schotte et al., 2004) y citotóxica para ciertas líneas celulares (Smedley et al., 2004) y también provoca necrosis hemorrágica de la mucosa intestinal en la prueba de ligadura intestinal. Esta toxina es muy susceptible a la proteólisis, por lo que el tratamiento con tripsina escinde la toxina en dos péptidos (13 y 15 kDa), lo que da como resultado una pérdida completa de citotoxicidad; la actividad específica de la toxina β_2 no se comprende completamente, pero puede involucrar la formación de poros u otros mecanismos que provoquen la ruptura de la membrana celular (Petit et al., 1999; Smedley et al., 2004; Schotte et al., 2004). A pesar de su nombre, la toxina β_2 no tiene una homología aparente (15 %

de similitud de aminoácidos) con la toxina β muestran solo una baja reactividad cruzada inmune entre ellos (Petit et al., 1999; Schotte et al., 2004).

1.1.2 Calostro

El calostro es la primera secreción láctea generada por la glándula mamaria comenzando a sintetizarse días antes y luego descendiendo su concentración después del parto, contiene secreciones acumuladas durante las últimas semanas de gestación, así como proteínas transferidas activamente desde la circulación sanguínea bajo la influencia de los estrógenos y la progesterona (Tizard, 2009), en alpacas es el único alimento de mayor valor biológico y necesario para la cría en los primeros días de vida (Bravo et al., 1997); el manejo del calostro es importante para determinar la salud y supervivencia de las crías (Fernández, et al., 1994; Godden, 2008). La alimentación inicial con calostro estimula el desarrollo de vellosidades, mucosas y submucosas en todas las secciones del intestino delgado en los primeros días de vida y mejora la salud y el crecimiento (Van Soest et al., 2022). La principal función del calostro es proteger al recién nacido de patógenos externos en los primeros días de vida, para reducir el riesgo de morbilidad y mortalidad. Además, estimula por medio de componentes la motilidad intestinal, acelera el desarrollo del sistema gastrointestinal, favoreciendo la eliminación del meconio y el establecimiento de los movimientos intestinales normales (Godden, 2008).

El calostro se forma durante la gestación por el pasaje selectivo de inmunoglobulinas (Igs) de la circulación general a la glándula mamaria, Aunque la capacidad de síntesis de Igs calostrales en la glándula mamaria no es significativa se logra una concentración máxima dos semanas antes del parto en los equinos y de 3 a 9 días en el ganado bovino (Tizard, 2009). Las concentraciones de IgG en llamas y alpacas periparturientas se mantienen sin cambios, los valores de IgG en el suero de animales preñados permanecen constantes, lo que sugiere que la transferencia de IgG en llamas y alpacas no fue el resultado del paso del torrente sanguíneo a la glándula mamaria justo antes del parto, esto es exclusivo de las llamas y alpacas en comparación con otras especies de ganado (Bravo et al., 1997).

A. Composición del calostro

Se compone de diversos elementos que normalmente se encuentran en la leche, tales como citosinas, leucocitos maternos, lactosa, grasa, proteínas, minerales y vitaminas. Además, el calostro contiene elevadas concentraciones de factores de crecimiento epidérmico y de crecimiento similar a la insulina (Schogor et al., 2020). En términos de inmunoglobulinas, predominan la IgG con un 83%, la IgM con un 6% y la IgA con un 5%. También se encuentran leucocitos como neutrófilos y macrófagos, representando un 6% del total (Tizard, 2009).

Las concentraciones de Igs en el calostro caen repentinamente después del nacimiento, alcanzando el 50 % a las 9 a 12 horas y el 85 % a las siguientes 48 horas. Descenso ligado a la importancia de la absorción de las Igs por parte del neonato y al aumento de la actividad funcional de la glándula mamaria, que, al elevar su nivel de secreción, produce una dilución de las mismas. (Fernández, et al., 1994).

El calostro contiene un alto contenido de inmunoglobulina y, por lo tanto, es esencial para brindar inmunidad pasiva al recién nacido. El calostro también contiene compuestos bioactivos y nutrientes en concentraciones elevadas en comparación con la leche de transición que también tiene concentraciones elevadas de IgG y otros compuestos bioactivos como IGF-1, hormona del crecimiento e insulina; además, estas concentraciones disminuyen gradualmente a medida que las secreciones mamarias pasan del calostro a la leche normal; la leche de transición se define como los ordeños de 2 a 6 después del parto (Godden, 2008).

En alpacas se midió las concentraciones de grasas, proteínas, lactosa y minerales en el calostro y la leche. Las concentraciones de grasa y lactosa aumentaron desde el día 1 (0.5%, 4.0%) al día 4 (5.3%, 5.0%), las proteínas disminuyeron del 20.4% el día 1 al 8.3% el día 4. En la leche estos tres indicadores no cambian durante la lactancia. Encontrando que la composición del calostro de las alpacas cambia dentro del período de calostro cuatro días después del parto, la composición de la leche cambia según el estado de lactancia de las alpacas y la composición del calostro y

la leche de alpaca difiere en ciertos indicadores de la leche de rumiantes y los componentes del calostro comparando con alpacas mantenidas en diferentes altitudes no difirieron entre los hábitats la composición de la concentración de grasa, proteína y lactosa en el calostro cambia sustancialmente durante el período calostrual, la disminución de la concentración de proteínas y el aumento de la concentración de grasas se reflejan en otras especies animales, la disminución sustancial en la concentración de proteínas del calostro puede atribuirse a la disminución en la concentración de inmunoglobulinas en las alpacas y que ocurre en la mayoría de los otros mamíferos (Möbller et al., 2021)

Chad et al., (2014) midió en promedio 3.68 ± 1.32 % de grasa, 4.53 ± 0.78 % de proteína y 6.00 ± 0.48 % de lactosa en la leche de alpacas durante 25 semanas de lactancia y en un estudio que abarcó cinco meses de lactancia realizado en dos regiones de Chile, Parraguez et al., (2003) encontró en seis muestras combinadas de leche de alpaca en la Patagonia (nivel del mar) concentraciones de $2.6 \pm 0.5\%$ de grasa, de $6.5 \pm 0.3\%$ de proteína y de $5.2 \pm 0.5\%$ % lactosa y en ocho muestras agrupadas del Alto Altiplano (4400 m sobre el nivel del mar) concentraciones de 3.8 ± 0.6 % de grasa, de 6.9 ± 0.3 % de proteína y de 4.4 ± 0.5 % de lactosa, Los resultados para la composición de la leche de llama de un estudio de Riek y Gerken, (2006) de grasa $4.70 \pm 0.81\%$, proteína $4.23 \pm 0.23\%$, lactosa $5.93 \pm 0.27\%$ y otro estudio de Schoos et al., (2008) cuyos resultados de grasa $4.55 \pm 0.66\%$, proteína 4.33 ± 0.17 %, lactosa $6.34 \pm 0.34\%$. Para todos los resultados mostrados posiblemente la dieta podría haber tenido una influencia sustancial (Möbller et al., 2021)

El contenido mineral del calostro y la leche de alpaca se observó que los minerales obviamente se almacenan en la ubre antes del parto, las concentraciones de macro y oligoelementos de Ca, P y Mg disminuyeron durante el período calostrual, teniendo la mayor concentración el día del parto (día 1). La misma condición estuvo presente en varios elementos traza (Fe, Cu, Zn, Sr, Ba, Co, Ni, S) que mostraron las concentraciones más altas inmediatamente después del parto, durante la lactancia posterior, el calcio de la leche fue el único macroelemento cuyas concentraciones

disminuyeron durante los cuatro meses de lactancia, las concentraciones de numerosos macro y oligoelementos difieren significativamente, teniendo en cuenta que las concentraciones de oligoelementos que se encuentran en el calostro y la leche están influenciadas por la disponibilidad de esos minerales en el alimento (Möbller et al., 2021)

Ormachea et al., (2021) determino las características fisicoquímicas de la leche en alpacas y llamas, considerando dos zonas agroecológicas entre los 40 y 45 días de lactación bajo un sistema de crianza extensivo, evaluó la composición de sólidos totales (16.03%), energía bruta (MJ/100 361.43 g), ceniza (1.10%), grasa (3.42%), sólidos no grasos (12.06%), densidad (1.042 g/cm³), proteína (4.59%), lactosa (6.90%), sales (0.98%), pH 7.05, punto de congelación (0.88°C) y recuento de células somáticas (93.9 células/mL x 1000); concluyendo que la composición fisicoquímica de la leche es similar entre llamas y alpacas y que la zona agroecológica influye la composición de la leche en alpacas Huacaya.

Valores medios de las concentraciones de los principales componentes de la leche durante el período de lactancia fueron 4.70% de grasa, 4.23% de proteína, 5.93% de lactosa, 15.61% de materia seca y 22.62 mg/dL de urea N en la leche. Todos los componentes se vieron afectados por la etapa de lactancia., hubo un aumento en la proporción de grasa y proteína a medida que la concentración de proteína disminuyó y la concentración de grasa aumentó; las concentraciones de grasas, proteínas y lactosa cambiaron durante la transición del calostro a la leche; entre los componentes principales, la grasa tuvo la mayor variación; la concentración bruta media de energía de la leche fue de 3.88 kJ/g y mostró un curso similar al de la proteína. La grasa contribuyó con el 48.0%, la proteína el 26.3% y la lactosa el 25.7% de la energía bruta de la leche. Los valores de N urea en leche fueron mayores que los encontrados en rumiantes y aumentaron con la etapa de lactancia, mientras que el pH disminuyó. Los componentes de la leche analizados no se vieron afectados por el número de lactancia del animal, excepto la urea N de la leche. Los recuentos de células somáticas indicaron la ausencia de mastitis y

revelaron que el recuento promedio de células somáticas de las llamas no infectadas es menor que el de los animales utilizados habitualmente para la producción de leche (Riek y Gerken, 2006)

Se evaluó el efecto de la época del año, edad de la madre y el mes de lactancia sobre la composición química del calostro y leche de la llama (*Lama glama*), se determinó el contenido de IgG, grasa, sólidos no grasos (SNG), proteína, lactosa, densidad, punto de congelación y minerales en el calostro fueron: 37.43 mg/mL; 2.78%; 31.42%; 12.07%; 17.68%; 1.13 g/cm³ ; -1.05°C y 0.40% respectivamente; los contenidos de grasa, SNG, proteína, lactosa, densidad, punto de congelación y minerales en la leche fueron: 3.43%; 11.61%; 4.0%; 6.46%; 1.037 g/cm³ ; -0.48°C y 0.36% respectivamente; concluyendo que la época del año no influye sobre la composición química de la leche; asimismo, la edad de la madre no influye sobre ninguno de los componentes químicos del calostro, tampoco influye sobre la mayoría de los componentes de la leche excepto sobre los minerales; en tanto que, el mes de lactancia influye sobre la mayoría de los componentes de la leche, excepto sobre la grasa (Mamani Cato, 2022)

El calostro de diversas especies presenta gran cantidad de proteínas, vitaminas liposolubles E, A, K y carotenos; así como altos niveles minerales, sodio, zinc, hierro, azufre, potasio, selenio y manganeso; su contenido de ácidos grasos se relaciona con la dieta materna; el calostro es importante para asegurar la inmunidad en el neonato, y uno de los componentes más importantes son las inmunoglobulinas, donde en alpacas destaca la IgG. Se ha demostrado en diversos estudios sus altas concentraciones durante los primeros 4 días post parto, la cual disminuyó significativamente desde el día 1 ($26.319 \pm 8.754.73$ mg/dL) hasta el día 4 (3848.8 ± 3475.91 mg/dL) (Möbller et al., 2021).

1.1.3 Sistema inmune en camélidos

Hamers-Casterman et al. (1993) demostraron por primera vez que el suero de los camélidos contenía un único tipo de anticuerpo carente de cadenas livianas. La limitada información disponible sobre el sistema inmunológico de los

camélidos complica la tarea de describir las características singulares que los distinguen de otras especies. No obstante, ciertos estudios han indicado la presencia de dos linajes diferentes de linfocitos B en camélidos. Un linaje se encargaría de la síntesis de anticuerpos clásicos con cuatro cadenas, mientras que el otro linaje expresaría anticuerpos que carecen de las cadenas ligeras.

Las inmunoglobulinas son moléculas proteínicas que desempeñan actividad de anticuerpos y son producidas por células B y células plasmáticas sensibilizadas por los patrones moleculares específicos de antígenos externos y mediante estas interacciones neutralizan y eliminan patógenos específicos del hospedero (Tizard, 2009). En los mamíferos, las Igs se clasifican en tipos o isotipos: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD y, además, se subdividen en subclases. Muchos estudios en inmunología animal han sido llevados a cabo con IgG, IgM o IgA (Wernery, 2001). Medina et al., (2004) evidenció que los niveles de IgM e IgA en la leche de camélidos son considerablemente inferiores en comparación con la IgG.

Los recién nacidos llegan al mundo con un sistema inmunológico notablemente inmaduro, lo que los deja incapaces de responder de manera efectiva ante agentes patógenos. Las crías de alpacas nacen agammaglobulinémicas, es decir sin defensas inmunológicas, esto es consecuencia de la estructura física de la placenta, de tipo microcotiledonaria y epiteliocorial, que impide la transferencia de inmunoglobulinas (Igs) de la madre al feto, pero después de la ingesta de calostro se observan aumentos lineales de concentración de IgG de manera similar a lo que ocurre en otras especies domésticas. (Bravo et al., 1997; Flodr et al., 2012).

A. Inmunoglobulina G en camélidos

La IgG, componente del 85% de las proteínas del suero transferidas pasivamente a las crías, es la principal inmunoglobulina absorbida por el neonato, también se transfiere, aunque en menores cantidades, la IgM (Garmendia y McGuire, 1987); se desconoce, sin embargo, los isotipos de IgG preferentemente absorbidos, ya que las inmunoglobulinas de los camélidos son únicas y difieren dramáticamente en relación a otras especies de animales. En los camélidos, se conoce que

más del 75% de las proteínas séricas son moléculas de IgG carentes de cadena ligera y referidas como IgG₂ e IgG₃, y característicamente mucho más pequeñas (90 kDa) que los anticuerpos convencionales (150 kDa) (Medina et al., 2004), con capacidades de mejor penetración tisular y una mejor biodistribución. Estos anticuerpos, denominados microglobulinas, serían mucho más eficientes, por ejemplo, para neutralizar enzimas, que los anticuerpos convencionales; (Wernery, 2001)

De las tres subclases de IgG en camélidos denominados: IgG₁, IgG₂ e IgG₃, la IgG₁ corresponde a los anticuerpos convencionales y la IgG₂ e IgG₃ son los que carecen de las cadenas livianas (Wernery, 2001); éstas dos últimas son conocidas como los anticuerpos de cadena pesada (HCAs) (Medina et al., 2004; (Daley et al., 2005). La pérdida de las cadenas livianas resulta de una alteración de la escisión que impide su transcripción al ARN mensajero y no de una supresión en el gen correspondiente (Daley et al., 2005).

Los anticuerpos IgG₁ son considerados como los anticuerpos convencionales y se encuentran en un 25% de la IgG sérica. Por otro lado, tanto la IgG₂ como la IgG₃ presentan dímeros de cadenas pesadas cortas, que se caracterizan por tener un fragmento cristalizante (Fc) normal sin un dominio CH₁, y constituyen el 75% restante de la IgG sérica. Los anticuerpos de dominio único (HCAs) junto con sus anticuerpos de cadena pesadas (VHHs) tienen muchas ventajas comparadas con los anticuerpos convencionales, debido a su pequeño tamaño lo que mejora su biodistribución y permite una mejor penetración tisular (Wernery, 2001). Los HCAs tienen la capacidad de unirse a los antígenos objetivos con propiedades de unión que parecen equipararse a las de las IgG convencionales. A pesar de carecer de los puntos adicionales de contacto con el antígeno que normalmente son proporcionados por las cadenas ligeras, estos anticuerpos demuestran una afinidad comparable. Además, sus VHHs les confieren otras propiedades especiales como mayor especificidad a epítopes inusuales, mejorando su habilidad de unión con el sitio activo (Maass et al., 2007).

La estructura básica de las inmunoglobulinas consta de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L), unidas generalmente por puentes disulfuro. Además, se ha establecido que todas las inmunoglobulinas presentan un cierto grado de glicosilación; De acuerdo a los hallazgos efectuados hasta ahora existe en la sangre de algunos camélidos un tipo adicional de IgG, la IgG de cadenas pesadas (IgG_H) (Hamers-Casterman et al., 1993; Medina et al., 2004).

La estructura de la IgG₁, IgG₂ e IgG₃ de los camélidos fue objeto de comparación. Tanto la IgG₂ como la IgG₃ en estos animales exhiben configuraciones particulares que incluyen un dominio variable único (VHH), una región bisagra y dos dominios constantes (CH₂ y CH₃). Los dos dominios constantes son altamente homólogos a los dominios de la fracción cristalizable de los anticuerpos convencionales (Daley et al., 2005). Las IgG₁ de los camélidos presentan una región bisagra de longitud reducida, con un peso total de 170 KDa. Las cadenas ligeras tienen un peso que oscila entre 28 y 32 KDa, en tanto que las cadenas pesadas tienen un peso comprendido entre 50 y 55 KDa. Mientras que las IgG₂ con sólo dos cadenas poseen una región bisagra grande, tiene un peso de 100 KDa y sus cadenas pesadas pesan 46 kDa; y finalmente, las IgG₃ que también poseen 2 cadenas posee una región bisagra más corta, también pesa alrededor de 100 kDa y sus cadenas pesadas pesan 43 kDa (Wernery, 2001; Medina et al., 2004).

B. Transferencia de inmunidad madre - cría en alpacas.

Las crías de alpaca nacen sin IgG, este fenómeno se debe al tipo de placenta de la alpaca; la alpaca presenta un tipo de placenta difusa epiteliocorial, por esto no hay transferencia pasiva de IgG de la madre preñada al feto en el útero, Más bien la transferencia de IgG es pasiva a través del calostro (Bravo et al., 1997). Las concentraciones de IgG se incrementan linealmente después de la toma del calostro durante las 24 horas post-nacimiento, alcanzando un valor promedio de 30.1 ± 8.1 mg/mL; tanto la IgG como la IgM son absorbidas; sin embargo la IgG alcanza aproximadamente al 90% de la proteína total absorbida y está

presente en el suero a las 24 horas post-nacimiento (Möbller et al., 2022). Así mismo las alpacas preñadas pueden producir en las glándulas mamarias y almacenar IgG proveniente del suero sanguíneo de manera gradual en un periodo cercano al parto. Los niveles séricos de IgG de alpacas periparturientas se mantienen constantes antes durante y después de la parición, lo que sugiere que la transferencia de IgG en alpacas no resulta del pasaje del flujo de sangre hacia las glándulas mamarias justo antes del momento de la parición, lo que, si ocurre en otras especies como vacunos, ovinos equinos (Bravo et al., 1997; Weaver et al., 2000).

C. Absorción y concentraciones de IgG en suero de crías de alpacas.

Se demostró que en alpacas el periodo de absorción de IgG calostrado depende exclusivamente de los tiempos de lactancia realizados por la cría en las primeras 24 horas de vida (Garmendia y McGuire, 1987) Un estudio de 250 llamas recién nacidos a las 20 a 24 horas de edad presentó un título de IgG con una media de 1650 mg/dL. Con un intervalo de 0 a 3400 mg/dL, las transfusiones de plasma administradas intraperitonealmente a los dos días de edad mostraron una absorción de plasma que varió entre el 18% y el 61%.

Los resultados de un estudio realizado con 40 crías durante los primeros 5 días de vida, enfocándose en las concentraciones de IgG en el suero sanguíneo, indican que las crías nacen sin gammaglobulinas. A las cinco horas de nacidas y tras la ingestión de calostro, la concentración de IgG es de 2257.95 mg/dL, aumentando hasta 3001 mg/dL ($DS \pm 8.09 = 1$) en el primer día. Para el segundo día de vida, la concentración alcanza los 3377.78 mg/dL. Luego se mantiene en 2494.82 mg/dL hasta el quinto día de vida, en este estudio el 15 % de las crías sufrieron alteraciones en la transferencia pasiva de IgG, donde las concentraciones alcanzan valores bajos (375 mg/dL) a las cinco horas después del nacimiento e ingestión de calostro (Bravo et al., 1997).

Se ha determinado que la IgG representa el 40 a 60% del total de proteínas en el suero sanguíneo de las crías en la vida perinatal y que las

crías de alpacas nacen agammaglobulinémicas, incrementándose en sus máximas concentración el primer día después de la toma de calostro con valores de 3 065.78 para machos y 2 996.80 mg/dL para hembras, y con un promedio de 2 996.80 mg/dL en los seis días de vida (Quispe et al., 1999).

Las concentraciones de IgG en las crías mostraron variaciones significativas entre los días ($P \leq 0,05$), registrándose valores de 0 mg/dL, 2342.9 mg/dL, 2329.2 mg/dL, 3201.2 mg/dL, 2738.1 mg/dL y 2638.8 mg/dL a las 12 h, 1, 2, 3 y 4 días después del nacimiento. Con una concentración de IgG 2347.1 mg/dL en crías. (Bravo, et al, 1997). Se presentan niveles de inmunoglobulina G en crías de alpacas a los seis días de edad, con un valor de $2996 \pm 0,41$ mg/dL. Así mismo se reportan concentraciones de IgG de 0.00 y 625.34 ± 0.345 mg/dL para machos; 0.00 y 810.67 ± 0.60 mg/dL para hembras antes y después de la ingestión del calostro respectivamente (Quispe et al., 1999).

En hembras peri parturientas las concentraciones de IgG en suero es de: 3462 ± 111 mg/dL (antes de la parición), 3001 ± 112 mg/dL (durante de la parición) 2988 ± 155 mg/dL (después de la parición) sin diferencia significativa entre los grupos ($P \geq 0,05$) con un promedio de 3126.1 mg/dL. Indicando que sus concentraciones fueron mantenidas inalteradas; sin embargo, los cambios realmente ocurrieron después de la parición este fenómeno es importante pues sugiere que la transferencia de IgG en alpacas no resulta del pasaje del flujo de sangre hacia las glándulas mamarias justo antes del momento de la parición, lo que es único en alpacas y llamas y que las crías nacen agammaglobulinémicas con concentraciones IgG que aumentan rápidamente después de lactación (Bravo, et al , 1997).

D. Falla de transferencia pasiva en alpacas (FTP).

Ha sido, demostrado que la falla en transferencia pasiva de inmunoglobulinas es un determinante importante en mortalidad causada por enfermedades infecciosas en crías de alpaca en las tres primeras semanas de vida (Ramírez y Ellis, 1988). En crías recién nacidas hasta los

3 días de edad, concentraciones de IgG en el suero de 9 mg/mL se interpretan como una deficiencia en la transferencia pasiva de inmunoglobulinas, ya que se asocia con una incidencia más elevada de mortalidad en animales neonatos que presentan estos niveles de concentración de IgG sérica. Asimismo, concentraciones de 10-15 mg/mL se consideran como una falla parcial. y valores superiores a 15 mg/mL fueron considerados como normales (Garmendía et al., 1987). En otros estudios Weaver et al., (2000) considero que la incidencia de FTP entre 9 y 20% del total de la población, Bravo et al (1997) consideraron que un 15% del total de nacidos con casos de FTP y Maximiliano et al., (2018) indica que un 16.6% tienen FTP parcial en animales neonatos y que la concentración de IgG en la etapa neonatal no representa un factor de riesgo significativo para la presentación de enterotoxemia en Alpacas Neonatas.

(Cárdenas et al., 2018) estudio que en alpacas de una zona agroecológica de puna seca de la región Puno, encontró un 8% de crías de madres primerizas (4/50) y un 4% de crías de madres multíparas (2/50) con falla parcial de la transferencia de pasiva (FPTP) con una concentración de IgG séricas de 354 mg/dL y con falla total de la transferencia pasiva (FTTP) se encontró el 6% en crías de madres primerizas (3/50) con un promedio en la concentración de IgG sérica de 107 mg/dL.

1.1.4 Enterotoxemia en alpacas

A. Etiología

La enterotoxemia o diarrea bacilar, es causada por las toxinas del *Clostridium perfringens* tipo A; en un menor grado se le atribuye al *Clostridium perfringens* tipo C. El *Clostridium perfringens* es un bacilo anaeróbico esporulado, a menudo encapsulado que produce una potente toxina la cual causa alteraciones anatomo-fisiológicas en el yeyuno e íleon, y subsecuentemente en tejidos de órganos vitales. Debido a su absorción a través de la mucosa intestinal y diseminación por el torrente sanguíneo da lugar a un cuadro septicémico, caracterizado por la presencia

de bacilos CPA y toxinas (Moro y Guerrero, 1987; Ramírez, 1991; Pérez et al., 2012)

B. Epidemiología

La enterotoxemia en crías de alpacas se presenta a manera de brotes epizooticos en la época de lluvias en los meses de parición, y está relacionada a las deficiencias en el manejo e higiene del hato (Moro y Guerrero, 1987; Ramírez et al., (1998). Ocasionando elevadas tasas de mortalidad en hatos alpaqueros, reportándose tasas anuales de mortalidad neonatal por la enfermedad de 10 a 29% en crianza organizada, en crianza comunal de mediano productor 13 a 35% y en pequeño productor 14 a 30%, las tasas de mortalidad por enterotoxemia puede alcanzar el 50% durante la cuatro primeras semanas de vida que coincide con el descenso de los niveles de gammaglobulina de 1.4 mg/mL al nacimiento a 0.98, 0.76 y 0.79 mg/mL a los 8, 15 y 22 días, respectivamente; por las características de presentación masiva en la población susceptible se le reconoce como un brote o epizootia en potreros o canchas de áreas con antecedentes de crianza de ganado durante la época de parición (Ramírez et al., 1998).

C. Patogenia

La enterotoxemia se transmite en forma horizontal, a través de esporas o células vegetativas del *C. perfringens* tipo A presentes en suelo, forraje, agua y ubres contaminadas, que entran en contacto con una cría susceptible (Ramírez, 1991). Una primera posibilidad estaría dada por la ingestión de esporas las cuales germinan a fase vegetativa en el intestino, para luego multiplicarse activamente y sintetizar α toxina y enterotoxina esta última en el estadio de esporulación del clostridio. La segunda posibilidad sería la ingestión de células vegetativas (bacilos) que luego de multiplicarse activamente en el intestino sintetizan las toxinas señaladas. Finalmente, la tercera opción sería la ingestión, tanto de esporas como células vegetativas, con el consiguiente mecanismo de desarrollo en la cría de alpaca (Ramírez, 1991).

Ensayos en intestino ligado en llamas inoculadas con cepas enterotoxigénicas esporuladas provocaron la acumulación de fluidos y la formación de gas, aparición de algunos signos clínicos (postración, ligera lagrimeo y congestión de mucosas) (Ameghino y DeMartini, 1991), consiguiendo ser evidenciada serológicamente la CPE en el contenido intestinal. (Ramírez y Ellis, 1988). Por estudios moleculares demuestran que la escasa presencia del gen *cpe*, no es el factor de virulencia esencial para la enfermedad (Pérez et al., 2012).

D. Signos clínicos

La manifestación evidente es la ocurrencia de la muerte súbita en crías con buen estado corporal dentro de las primeras semanas de vida; es posible que el curso de la enfermedad dependa de la cantidad de toxina producida en el intestino y absorbida al torrente sanguíneo (Ramírez y Ellis, 1988); las crías afectadas se alejan de las madres, muestran depresión, anorexia y permanecen postradas con las orejas dirigidas hacia atrás, los ojos cerrados y los miembros estirados (Ameghino y DeMartini, 1991). Las crías presentan los miembros rígidos, la cabeza apoyada en el suelo, el abdomen distendido y emiten quejidos, posiblemente como respuesta al dolor abdominal. En la fase avanzada del cuadro toxémico, se observan alteraciones nerviosas como convulsiones y opistótonos. Finalmente, el animal entra en coma y muere (Ramírez, 1991).

E. Lesiones anatomopatológicas

A la necropsia la cría muestra una buena condición corporal y con el abdomen hinchado porque en el intestino existe gas. El tejido subcutáneo puede estar congestionado y presentar hemorragias petequiales; los nódulos linfáticos torácicos de tamaño incrementado y hemorrágicos, el timo se presenta congestionado y con hemorragias petequiales en su superficie (Ramírez, 1991). En cavidad torácica y en saco pericárdico frecuentemente existe presencia de abundante exudado seroso claro y ligeramente viscoso; al explorar la cavidad abdominal, es perceptible un olor desagradable y característico a la enfermedad; los intestinos están distendidos con fluido acuoso, cuyo color varía de acuerdo

al tipo de ingesta, pudiendo ser blanquecino, amarillento, verdoso y plomizo, el intestino delgado, particularmente yeyuno e íleon, se encuentra congestionado y hemorrágico (Moro y Guerrero, 1987; Ameghino y DeMartini, 1991).

En el intestino grueso se presentan hemorragias focales con zonas de impacción conteniendo heces duras, las placas de Peyer se encuentran inflamadas, siendo más notorias en el intestino grueso; los ganglios linfáticos mesentéricos, se incrementan de tamaño, congestionados y/o hemorrágicos; en el estómago glandular, la mucosa puede estar congestionada o hemorrágica (Ramírez, 1991).

El bazo, a veces, aumentado de tamaño y el hígado aparentemente normal, pero algunas veces congestionado (Moro y Guerrero, 1987). En los riñones es posible observar congestión de la corteza renal y, a veces, hemorragias petequiales en su superficie; la vejiga generalmente se encuentra distendida debido a la acumulación de orina como consecuencia de su parálisis (Ameghino y DeMartini, 1991). El cerebro muestra una congestión severa y se observa acumulación evidente de líquido cefalorraquídeo entre las membranas meníngeas. Palacios. et al., (2005) caracterizó las lesiones intestinales de casos clínicos consistentes con la enfermedad, detallando las siguientes alteraciones anatomopatológicas: enteritis catarral (100%) en el duodeno; enteritis hemorrágica (46.7%), panenteritis hemorrágica (26.7%) y enteritis necrótica (16.6%) en el yeyuno; enteritis necrótica (56.6%), enteritis hemorrágica (20%) y enteritis fibrinosa (13.3%) en el íleon; tiflitis catarral (40%), tiflitis necrótica (26.7%) y tiflitis fibrinosa (13.3%) en el ciego; y colitis catarral (63.3%), colitis necrótica (30%), colitis hemorrágica (10%) y colitis fibrinosa (16.7%) en el colon.

F. Diagnóstico.

En el campo deben considerarse las características del brote, signos clínicos y lesiones observadas a la necropsia, en laboratorio efectuar el reconocimiento de esporas y/o bacilos en frotices directos del contenido intestinal (íleon y yeyuno) teñidos con coloraciones específicas (Ramírez

y Ellis, 1988); el aislamiento de *Clostridium perfringens* y su caracterización toxigénica (genotipificación) y la identificación de otros agentes infecciosos, como *E. coli* y *E. macusaniensis*, que pudieran estar agravando la presentación de la enfermedad, (Rosadio A. et al., 2012; Luna et al., 2012).

G. Tratamiento y control.

Las medidas generales de control deben incluir la provisión de anticuerpos maternos a los neonatos a través del calostro, aplicación de yodo al ombligo de la cría; las condiciones de higiene, sobrepoblación y rotación de las áreas de pastoreo, parición y dormideros deben de ser controladas y la administración de antibióticos de uso oral a todas las crías del rebaño afectado durante 3 días consecutivos también ha sido recomendada (Moro y Guerrero, 1987); Ameghino y DeMartini, 1991). La administración de antibióticos (Ampicilina+sulfato de colistina) administrados vía parenteral hasta la onceava semana de edad demostraron tener efecto significativo en la prevención de la enfermedad (Pezo-Carreón et al., 1999).

H. Prevención

La prevención está dada básicamente por medidas inmunoprolifáticas a través del uso de vacunas tipo anacultivos de *Clostridium perfringens*, asociados a adecuadas medidas de manejo (higiene de corrales) para hacerlas más efectivas (Moro y Guerrero, 1987). Yaya L. y Rosadio A., (2005), en un estudio de tres años sobre prevención contra la enterotoxemia de las alpacas, usando vacunas (anacultivos) conteniendo *Clostridium perfringens* tipo A, B, C y D aplicados tanto a madres como a crías, mostraron una significativa reducción de la mortalidad neonatal por enterotoxemia de 19.5 a 1%, demostrando su utilidad en el campo.

Pezo-Carreón et al., (2018) Confirmaron que aplicando un anacultivo elaborado a partir de cepas de *Clostridium perfringens* tipo A, obtenidas de crías de alpacas fallecidas por enterotoxemia, probablemente

generó protección en los grupos de crías de alpacas. Al parecer, este anacultivo logró neutralizar la toxina *a* producida por el *Clostridium perfringens* tipo A en las crías de alpacas afectadas por enterotoxemia en condiciones de campo. Estos resultados sugieren que es posible obtener un anacultivo utilizando cepas aisladas del entorno natural, con el fin de inducir la producción de defensas (IgG) como una alternativa para reducir la incidencia de enterotoxemia en crías de alpacas.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Internacionales

Las vacunas anticlostridiales son ampliamente usadas en crianza de ovinos; y ellas han sido usualmente administradas como vacunas combinadas conteniendo la bacteria y sus toxinas formalizadas (vacunas muertas inactivadas) (Thaysen-Andersen et al., 2007). Vacuna es aquel microorganismo completo (vivo o muerto) que es capaz de inducir una respuesta inmune protectora y duradera, frente al mismo microorganismo, sin producir efectos secundarios; el principal objetivo de la vacuna es proveer una inmunidad efectiva que se traduce en mantener niveles adecuados de anticuerpos específicos y linfocitos memorias para una posterior activación rápida ante un nuevo contacto antigénico; las vacunas que generan anticuerpos neutralizantes son las medidas profilácticas más comunes que se utilizan actualmente. Estas vacunas consisten en anacultivos que se obtienen de cultivos de *Clostridium perfringens* (Tizard, 2009).

Clostridium perfringens tipo B produce toxinas alfa, beta y épsilon altamente necrosante y letal que es responsable del daño intestinal severo es sensible a las enzimas proteolíticas y la enfermedad se asocia con la inhibición de la proteólisis en el intestino y se ha asociado con enterotoxemia en ovejas y cabras, enteritis grave, disentería, toxemia y alta mortalidad en corderos, terneros, cerdos y potros jóvenes; estas enfermedades se controlan mejor vacunando a la madre preñada durante el último tercio del embarazo: inicialmente, 2 vacunaciones con un mes de diferencia y posteriormente anualmente. Cuando se producen brotes en animales recién nacidos de madres no vacunadas, se debe administrar antisuero inmediatamente después del nacimiento (Ata et al., 2013).

Las vacunas recombinantes ofrecen varias ventajas sobre los anacultivos convencionales, especialmente en términos del proceso de producción. (Ferreira et al., 2016). Sin embargo, para los animales de granja, no tienen estas opciones; por lo tanto, se deben emplear medidas profilácticas para combatir las infecciones por *Clostridium perfringens* (Pezo-Carreón et al., 2018). La vacunación frente a *Clostridium perfringens* tipo A y *Clostridium perfringens* tipo B representa actualmente la mejor medida profiláctica. mediante anacultivos que se obtienen cultivando *Clostridium perfringens* e inactivando las toxinas con formaldehído (Thaysen-Andersen et al., 2007).

Un problema que se encuentra, especialmente cuando se emplean vacunas, es la especificidad de la cepa; normalmente hay varios tipos antigénicos de cada microorganismo, y una vacunación eficaz requiere la inmunización con las cepas bacterianas apropiadas (Tizard, 2009); esto a veces no es posible si se emplea una vacuna comercial, por lo que un método posible para superar esta dificultad es utilizar vacunas autógenas o autovacunas; estas son vacunas que contienen los microorganismos obtenidos a partir de los animales infectados de la granja donde la enfermedad está ocurriendo o bien del propio animal. Estas vacunas pueden ser muy eficaces si se preparan cuidadosamente, ya que la vacuna contendrá todos los antígenos necesarios para la protección en ese lugar concreto; como una alternativa al uso de vacunas autógenas, algunos fabricantes producen vacunas polivalentes que contienen una mezcla de tipos antigénicos. Por ejemplo, las vacunas de contra leptospirosis normalmente incluyen hasta cinco serovares diferentes y en clostridiosis tiene 5 tipos diferentes (J. Songer, 1996)

Dado que el curso de muchas enfermedades entéricas asociadas con *Clostridium perfringens* son de curso rápido y con frecuencia fatal, la inmunoprofilaxis es una medida de control de suma importancia. Las vacunas comerciales se disponen de bacterinas, anacultivos y bacterinas-anacultivos que consisten en cultivos líquidos inactivados, lo que provoca respuestas de anticuerpos tanto a los antígenos de superficie bacterianos como a los productos tóxicos a menudo son multivalentes y generalmente consisten en células inactivadas, toxinas o ambas; aunque se han informado diferencias en la inmunogenicidad por vacuna y por especie huésped; existiendo un debate sin resolver sobre la primacía de la inmunidad antitóxica o antibacteriana; los

fabricantes recomiendan inyecciones de refuerzo semestrales, lo que sugiere que la inmunidad puede durar de 6 a 12 meses (Veschi et al., 2012).

La gangrena bovina producida por toxinas de *Clostridium perfringens* es una enfermedad no contagiosa, esporádica y fatal caracterizada por muerte súbita. Las estrategias para el controlar y prevenir esta enfermedad se basan en la vacunación sistemática de los rebaños con anacultivos, la perspectiva de vacunas de anacultivos recombinantes contra enfermedades causadas por toxinas de *Clostridium perfringens* es prometedora, los anacultivos recombinantes no tóxicos derivados de las toxinas α , β y ϵ de *Clostridium perfringens*, a saber, rCPA, rCPB y rEtxHP, respectivamente, se expresaron en *Escherichia coli*; se detectaron altos niveles de anticuerpos IgG específicos y anticuerpos neutralizantes contra las toxinas en sueros de terneros vacunados con un solo anacultivo recombinante o con un cóctel mixto de los tres anacultivos recombinantes, lo que indica el potencial de estos anacultivos recombinantes para proporcionar a los terneros inmunidad protectora contra la enterotoxemia causada por *Clostridium perfringens*. (Jiang et al., 2014).

La enteritis necrohemorrágica bovina es ocasionada por *Clostridium perfringens* tipo A. Debido al rápido progreso y desenlace fatal de la enfermedad, se estudió, las toxinas de *Clostridium perfringens*, inactivadas con formaldehído mediante un modelo de asa intestinal, identificando toxina α y perfringolisina O como las proteínas inmunogénicas en los preparados vacunales por ELISA; todos los anticuerpos neutralizaron la acción de la toxina α y perfringolisina O in vitro; sin embargo, los anticuerpos producidos contra las toxinas nativas inhibieron más la citotoxicidad inducida por *Clostridium perfringens* y solo estos anticuerpos protegieron contra la exposición a *Clostridium perfringens* en el modelo de asa intestinal, se concluyó que aunque la inmunización de terneros con toxinas nativas e inactivadas con formaldehído dio como resultado títulos altos de anticuerpos contra la toxina α para prevenir la enteritis necrohemorrágica bovina (Miyashiro et al., 2007; Goossens et al., 2016).

El *Clostridium perfringens* produce exotoxinas potentes que causan una rápida y potencialmente enfermedad mortal responsable de innumerables bajas humanas y pérdidas anuales para el sector agricultor. Debido a su capacidad de

esporular, no se pueden erradicar del medio ambiente. Como tal, la inmunización con vacunas de anacultivo o bacterina-anacultivo es el único método de protección contra la infección. Las toxinas recuperadas de los cultivos de *Clostridium* se inactivan para formar anacultivos, que luego se formulan en vacunas multivalentes de las especies de *Clostridium* patógenas más comunes, incluyendo *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* y *Clostridium hemolítico*. (J. Songer, 1996)

Las bacterinas, son bacterias inactivadas mediante procesos químicos, y los anacultivos, que son toxinas bacterianas inactivadas, son ejemplos de vacunas inactivadas. En términos generales, las vacunas inactivadas se consideran seguras, ya que pueden aplicarse a hembras preñadas y a animales inmunosuprimidos ya que no tienen riesgo de provocar enfermedad o afectar al feto (Larsen et al., 2018), No obstante, la inmunidad conferida por las vacunas inactivadas tiende a ser de duración más limitada en comparación con las vacunas vivas atenuadas. Sin embargo, es posible aumentar la respuesta inmune a las vacunas inactivadas al combinar el antígeno con adyuvantes, como el hidróxido de aluminio. La vacunación se considera una medida específica para el control de enfermedades, y se utilizan vacunas inactivadas que contienen bacterias (bacterinas) y toxinas (anacultivos). Se recomienda aplicar estas vacunas a animales jóvenes y a las madres durante el último tercio de la gestación para que puedan transferir anticuerpos específicos a través del calostro. Por ende, como estrategia de prevención y control, se pueden utilizar anacultivos purificados e inactivados para generar inmunidad en animales susceptibles a microorganismos del género *Clostridium*. (De la Rosa et al., 1997).

Salvarani et al., (2013) consideró que el uso de proteínas recombinantes representan una alternativa prometedora se evaluó la respuesta de anticuerpos neutralizantes de cerdas inmunizadas y sus crías a una vacuna bivalente que contenía los toxoides recombinantes α (rTA) y β (rTB) de *Clostridium perfringens*; los resultados mostraron que las proteínas rTA y rTB producidas y probadas indujeron una respuesta inmunitaria y que podrían considerarse como candidatos para el desarrollo de una vacuna comercial contra la diarrea inducida por *Clostridium perfringens* de tipo A y C en cerdos.

Se evaluó la respuesta serológica de cinco vacunas comerciales polivalentes que contenían anacultivo *épsilon* de *Clostridium perfringens* tipo D. quienes recibieron dos vacunas con cuatro semanas de diferencia. La primera inyección se administró cuando las cabras tenían 45 (\pm 3) días y la segunda a los 75 evaluándolas los días cero, 30, 60, 90, 120 y 150 después del inicio del experimento utilizando la técnica de ELISA indirecto para cuantificar los anticuerpos antitoxina *épsilon* para *Clostridium perfringens* tipo D. En general, los títulos medios de anticuerpos séricos de las cabras el día 60 aumentaron como respuesta a las dos vacunas recibidas los días cero y 30. El mayor número de animales considerados protegidos también se detectó el día 60, en respuesta a las dos vacunas (Veschi et al., 2012).

Se vacunaron ovinos con anacultivo tipo D de *Clostridium perfringens* 3 semanas antes del parto, se obtuvieron suero de 20 ovejas vacunadas y no vacunadas antes del tratamiento en las semanas 2, 1 y 0 antes del inicio del parto, los niveles de anticuerpos en sueros de ovejas no vacunadas se conservaron en 2 UI/mL, pero alcanzaron un máximo en ovejas vacunadas de 15 UI/mL en la semana 1 antes del parto. Los corderos de cada uno de los primeros 13 y los primeros 14 conjuntos de trillizos de ovejas vacunadas y no vacunadas, respectivamente, recibieron uno de los tres tratamientos de vacunación: sin vacuna (control), vacunación en el día 1 y 21 de edad, o vacunación en el día 21 y 42 de edad; la vacunación preparto de las ovejas aumentó significativamente las concentraciones de anticuerpos en los corderos (19 UI/mL) en comparación con los corderos criados por ovejas no vacunadas (2 UI/mL). La vacunación de las ovejas resultó en corderos con concentraciones de anticuerpos más altas hasta la semana 10 posparto estos resultados indican que la vacunación de ovejas antes del parto imparte protección pasiva en corderos (De la Rosa et al., 1997).

Se vacunaron ovinos contra la enterotoxemia un anacultivo a partir de toxinas de *Clostridium perfringens* y *C. septicum* de los tipos B–D, las cepas se cultivaron en medio nutriente líquido para producir la toxina e inactivarla mediante formaldehído, produciendo el anacultivo no tóxico; 90 ovejas vacunadas contra la enterotoxemia y 50 ovejas de la misma edad no vacunadas de rebaños con manejo similar. Luego del procesamiento y cultivo de las muestras, se identificaron las colonias aplicando pruebas morfológicas, de tinción de Gram y

bioquímicas. Utilizando estas pruebas, se aisló *Clostridium perfringens* 27 de 50 ovejas no vacunadas (54.0 %) y de 2 de 90 ovejas vacunadas (2.2 %); todos los aislados de clostridios se analizaron mediante PCR multiplex, el genotipado de 2 cepas aisladas de las ovejas vacunadas indicó que estas cepas eran del tipo D, mientras que las cepas aisladas de las ovejas no vacunadas eran de los tipos A, B, C y D; 14.8% (4 de 27), 22.2% (6 de 27), 40.7% (11 de 27) y 22.2% (6 de 27), respectivamente, concluyendo que la vacunación tuvo un efecto significativo en la reducción de la mortalidad por enterotoxemia (Ahsani et al., 2011).

Prehn et al., (1999) describieron la presentación de cuadros de enterotoxemia de crías de llamas y alpacas ocurridos entre 1990 y 1999 en el sur de Chile que fueron causados por *Clostridium perfringens*, se diagnosticó la enfermedad mediante la observación sintomatológica, necropsias y descripción de hallazgos anatomopatológicas, aislamiento bacteriano, evaluación del poder antigénico, tipificación de los aislados por pruebas bioquímicas, electroforesis y PCR para la elaboración de autovacunas, dando como resultado un predominio de *Clostridium perfringens* tipo B en los eventos iniciales y posteriormente tipo A, de este resultado se elaboró una autovacuna de los tipos A y B de la bacteria para la prevención de enterotoxemia con un plan de vacunación de cada 4 meses en plantales de alto riesgo y cada 6 meses en zonas libres de brotes de enterotoxemia, siendo la prevención de la enterotoxemia exitosa en más de 6000 ejemplares.

Se aplicó una vacuna comercial (Mancha Gangrena Enterotoxemia, Instituto Rosebusch Sociedad Anónima, Argentina) inactivada de *Clostridium perfringens* ultrafiltrada adsorbida en una sal de aluminio, inyectada por vía subcutánea los días 0, 21 y 42 como controles sin vacuna, se comparó un ELISA indirecto para medir los títulos de la toxina *épsilon* tipo D de *Clostridium perfringens* determinando los títulos en sueros tomados antes de la vacunación los días 16, 28, 49, 59 y 93 días después; mostrando que los animales vacunados una vez no desarrollaron títulos elevados, una semana después de una segunda vacunación, los títulos medios de anticuerpos aumentaron significativamente ($P \leq 0,05$) y una tercera vacunación dio como resultado una disminución en los títulos medios de anticuerpos; concluyendo que las llamas desarrollaron anticuerpos contra la toxina *épsilon* tipo D de *Clostridium perfringens* después de dos vacunaciones de vacunas inactivada con un intervalo de 21 días, no presentaron

efectos secundarios, desarrollan anticuerpos contra la *épsilon* toxina de *Clostridium perfringens* y la respuesta inmunitaria que observaron es de perduración corta, sugiriendo que la vacuna debería administrarse con frecuencia o estratégicamente (Bentancor et al., 2009).

1.2.2 Nacionales

En el Perú la principal enfermedad infecciosa que afecta a las crías de alpacas (*Vicugna pacos*) es la enterotoxemia, Moro y Guerrero, (1987) la describió por primera vez, mencionando al *Clostridium perfringens*, principalmente del tipo A, y en algunos casos al tipo C, como el agente causal. El cuadro clínico corresponde a una toxemia, generalmente de curso fatal, causando una severa enteritis hemorrágica o necrótica (Ameghino y DeMartini, 1991); Palacios. et al., 2005).

La prevención de la enterotoxemia en el Perú, se basa en el uso de adecuadas medidas de higiene y manejo y, sobre todo, en asegurarse que el neonato ingiera el calostro dentro de las primeras 12 horas de vida (Moro y Guerrero, 1987); sin embargo, estos programas preventivos raramente involucran el uso de vacunas (Ameghino y DeMartini, 1991, Pezo et al., 2018). A pesar que inicialmente se ensayó una vacuna anticlostridial convencional para la prevención de la enfermedad en alpacas (Moro y Guerrero, 1987). Ramírez y Ellis, (1988) mencionaron que en lo que se refiere a la inmunoprofilaxis de la enterotoxemia, la enterotoxina posee un uso potencial en el desarrollo de vacunas, particularmente anacultivos, que, administrados al final del último tercio de gestación de la alpaca, activen la producción de anticuerpos específicos que protegen a los recién nacidos contra los casos fatales de enterotoxina; pero estudios implican preferentemente a las exotoxinas clásicas como inmunoprofilácticos (Haghroosta et al., 2014).

Una anacultivo multivalente convencional, disminuyó las tasas de mortalidad neonatal total y la mortalidad específica por enterotoxemia en crías de alpacas. Aunque estas tasas de mortalidad no son óptimas para explotaciones comerciales en países industrializados, la vacuna logró reducir la mortalidad total a un 9.3% en 2003 y la pérdida debida a enterotoxemia al 0.3% en 2004. Estos resultados indican que alcanzar tasas de mortalidad inferiores al 10% y específicas

para enterotoxemia por debajo del 1% podría ser un objetivo razonablemente alcanzable. Las frecuencias de mortalidad obtenidas en ese estudio fueron históricamente menores para la unidad de producción y para la región geográfica colindante, según los reportes internos de la empresa. (Rosadio A. et al., 2012)

Los resultados del aislamiento y análisis molecular de las cepas de *Clostridium perfringens* corroboran que la patogenicidad clostridial involucra principalmente a la acción de exotoxinas mayores (α y β_2), descartando indirectamente el rol principal atribuido a la endotoxina (enterotoxina) en la patogenia de la enterotoxemia. (Yaya L. y Rosadio A., 2005).

Estudios moleculares indican que la mayoría de *Clostridium perfringens* aislados de casos fatales de la enfermedad poseen mayoritariamente genes codificantes de exotoxinas (α , β y β_2) y escasamente el gen de la enterotoxina; los estudios de genotipificación sugieren la posibilidad de desarrollar y ensayar una vacuna multivalente inactivada a base de cepas clostridiales conteniendo productos bacterianos y exotoxinas (anacultivo) para el control de la enterotoxemia (Pérez et al., 2012).

Yaya L. y Rosadio A., (2005), emplearon una suspensión de *Clostridium perfringens* y sus toxinas (anacultivo) formalizadas y adsorbidas en hidróxido de aluminio. Las cepas que componían la vacuna eran en un 80% de origen ovino (*Clostridium perfringens* tipos A, B, C y D) y en un 20% una cepa tipo A aislada directamente de alpacas. La dosis de la vacuna administrada a madres y crías fue de 2 mL por vía subcutánea. Esto resultó en una disminución significativa de la mortalidad total, pasando del 33.4% al 9.4%, y la mortalidad neonatal debida a enterotoxemia se redujo del 19.5% (sin vacuna en el año 2000) al 7.2%, 9.1%, 1.0%, 0.3%, 2.1% y 3.9% para los años 2001 a 2006.

Para evaluar la efectividad de la vacuna se analizaron los reportes de causas de mortalidades, emitidos por los sanitarios o veterinarios de campo, donde semanalmente se anotan las ocurrencias de muerte, en esta rutina, los diagnósticos se sustentan en las principales alteraciones macroscópicas, que son registradas en los formatos que conforman los informes sanitarios administrativos; los datos mensuales se compilan en informes anuales agrupándose las causas de muertes como infecciosas, orgánicas, muertos al nacer, etc., y específicas, citando a

enterotoxemia, diarreas o colibacilosis, neumonías, etc, para determinar el efecto protector de la vacuna se analizó la tasa de mortalidad anual total y la específica atribuida a enterotoxemia, tomándose la mortalidad del año previo a la vacunación (2000) como referencia para las mortalidades ocurridas durante los seis años de vacunación (2001-2006) (Rosadio A. et al., 2012).

1.2.3 Locales

Pezo-Carreón et al., (2018) realizaron un proceso de inducción de secreción de IgG utilizando toxina de *Clostridium perfringens* Tipo A con el objetivo de disminuir la mortalidad por enterotoxemia en crías de alpacas; obtuvieron la toxina a partir de muestras de intestino de crías de alpacas que dieron positivo a *Clostridium perfringens* tipo A. La administración consistió en suministrar 2 mL de anacultivo a madres preñadas durante el noveno y décimo mes de gestación, y a crías se les administró 2 mL del anacultivo a los 10 días de nacidas. Se confirmó que la aplicación del anacultivo, preparado con cepas de *Clostridium perfringens* tipo A, proporcionó una mayor protección a las crías de alpacas sugiriéndose la vacunación masiva de hembras preñadas y crías en el grupo de alpacas; también se evidenció que el anacultivo es efectivo en inducir protección contra la enterotoxemia en crías de alpacas. Se inmunizaron 984 alpacas en el último tercio de gestación del Centro Experimental La Raya, mediante la vacunación intramuscular con Enterovax F1 vacuna, producida en la Universidad de Gottingen Alemania, con muestras enviadas de crías con sintomatología de diagnóstico a la necropsia por muerte con enterotoxemia, en el transcurso de la parición de crías de alpacas del año 1992. En el mes de noviembre de 1993 a enero 1994, se conformaron tres grupos de animales: Grupo A (441 alpacas) con una dosis de vacuna. Grupo B (545 alpacas) con dos dosis de vacuna con intervalo de 21 días y el Grupo C (100 alpacas) no vacunadas (testigo). Los resultados obtenidos de mortalidad con enterotoxemia por diagnóstico a la necropsia fueron: Grupo C, 12 crías muertas que representan el 12% del grupo. Grupo A, crías muertas, 0.91% correspondientes a crías de alpacas vacunadas después del periodo recomendado (60 días antes del parto). Grupo B, 0 crías muertas, 100% de efectividad (Garnica y Málaga, 2018)



Resultados provechosos con la vacunación con anacultivos en el control de la enterotoxemia en crías de alpacas se ha observado en animales de comunidades campesinas y en algunas empresas privadas después de 4-5 años de introducida la vacuna (DESCO [Centro de Estudios y Promoción del Desarrollo], comunicación personal). El verdadero efecto positivo de dicha vacuna en el control de la enfermedad se asocia con la presencia de un elevado porcentaje de animales vacunados, que, en condiciones prácticas de manejo, se logra después de 2-3 años de iniciado el programa de vacunación.



CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Identificación del problema

En la crianza de la alpaca uno de los problemas que inciden negativamente es la presencia de enfermedades y muertes por causa de organismos parasíticos, bacterianos y víricos, ya que afectan la salud del animal originando grandes pérdidas económicas para los alpaqueros, las enfermedades son un factor negativo para los fines productivos e interfieren en los programas de selección y mejoramiento genético; en el caso de camélidos, la alta mortalidad de crías imposibilita una alta presión de selección por campaña (Pezo-Carreón, 2010).

La pérdida de crías de alpacas debido a la mortalidad representa una de las principales causas de pérdidas en la producción de esta especie. Esta situación genera limitaciones significativas tanto a nivel técnico como económico, afectando tanto los programas de selección como los procesos de reemplazo y ocasionando un retardo en el crecimiento de la población de alpacas. Las elevadas tasas de mortalidad y morbilidad en las crías de las alpacas por el complejo diarreico producen entre el 20 y 70% de mortalidad y 75% de morbilidad entre la primera a cuarta semana de edad son uno de los factores limitantes para el desarrollo económico de las actividades pecuarias en el ámbito andino (Moro y Guerrero, 1987; Ameghino y DeMartini, 1991; Ramírez, 1991).

La forma en que los productores comunales crían alpacas se distingue por la precariedad de las condiciones de prevención de enfermedades, así como por la presencia de situaciones severas de hacinamiento y subalimentación, esto trae como resultado un

alto índice de presentación de la enterotoxemia causada por el *Clostridium perfringens* tipo A principal causa de muerte de las crías dentro del primer mes de vida (Ramírez et al., 1998).

Uno de los problemas en crías de alpacas es que los recién nacidos son inmunocompetentes, su sistema inmune no funciona de la misma manera que en el animal adulto y por lo tanto depende de la transferencia pasiva de anticuerpos, en las crías -a las 0 h posparto- la concentración de IgG no es dosable, alcanzando valores máximos entre las 18 y 24 h no encontrando en este periodo diferencias con la concentración de la IgG sérica materna observándose un descenso de los niveles de IgG en los siguientes días, los valores de IgG calostrales son independientes de la concentración sérica tanto en madres como en crías, no existiendo asociación entre los mismos (Aquad et al., 2020). La placenta, epiteliocorial, impide la transferencia de inmunoglobulina G (IgG) de la madre al feto, por lo tanto, la protección inmunológica de la cría durante las primeras semanas depende de la ingestión adecuada de calostro, así como de la eficiente permeabilidad intestinal durante las primeras horas de vida (Bravo et al., 1997); los recién nacidos que no adquieren inmunidad pasiva adecuada tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedades tales como enterotoxemia, septicemia, artritis, onfalitis y neumonía, las cuales a menudo llevan a la muerte del animal. La transferencia pasiva exitosa se logra cuando los recién nacidos tienen niveles séricos de IgG adecuados (Wernery, 2001).

Por lo tanto, para mantener los niveles adecuados de IgG en madres y sobre todo en crías y reducir la mortalidad es administrando un anacultivo con cepas de *Clostridium perfringens* tipo A provenientes de casos de crías alpacas muertas por enterotoxemia que permita prevenir la presentación de esta enfermedad mediante la implementación de un programa de prevención.

2.2 Enunciados del problema

2.2.1 Problema general

- ¿Cuál es el efecto de la inmunización con un anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A sobre la producción de IgG en alpacas madres durante el último tercio de gestación y en crías durante la etapa perinatal y su repercusión en la mortalidad por enterotoxemia en las crías de alpacas?

2.2.2 Problemas específicos

- Problema 1
¿Cuál es el efecto de un anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A sobre los niveles de IgG en madres en el último tercio de gestación de alpacas?
- Problema 2
¿Cómo afecta un anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A los niveles de IgG en crías de alpaca durante el periodo neonatal?
- Problema 3
¿Cuál es el impacto de un anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A en la mortalidad por enterotoxemia en crías de alpaca durante el periodo neonatal?

2.3 Justificación

Los camélidos sudamericanos (CSA) han ocupado un papel central en el desarrollo de las sociedades andinas, tanto para los antiguos cazadores-recolectores como para los pastores y agricultores más recientes, hoy en día, los CSA domésticos siguen siendo un elemento central en las comunidades rurales a lo largo de los Andes; la crianza de alpacas es considerada el principal recurso económico para los habitantes de las zonas andinas a través del comercio de carne y fibra, dependiendo de ella más de 150.000 familias en su mayoría de comunidades rurales en los departamentos considerados en extrema pobreza de muy escasos recursos y carentes de servicios y vías de comunicación adecuados. (Pezo-Carreón, 2010). En la mayoría de los casos, las prácticas de manejo de alpacas y llamas siguen métodos tradicionales y carecen de innovaciones tecnológicas. Se enfrentan a diversos problemas, siendo la alta mortalidad de crías uno de los más destacados. A esto se suman tasas bajas de natalidad debido a la mortalidad embrionaria y a un manejo sanitario y reproductivo deficiente. Otros desafíos incluyen el empobrecimiento de las praderas de pastos naturales causado por el sobrepastoreo y la baja calidad de la fibra debido a la falta de programas de selección. Todo ello resulta en baja producción y pobre rentabilidad para el productor (Fernández Baca, 2005).

Se reconoce que, en las alpacas, las enfermedades representan un factor que limita el aumento de la producción y productividad, ya que disminuyen tanto la calidad como la cantidad de fibra y carne, y aumentan los costos de la producción. Además, tiene el efecto

de menguar la capacidad o muchas veces de la pérdida del valioso potencial genético de los animales. Por eso que el alpaquero debe tener mucho cuidado para conservar la buena salud de sus alpacas para obtener mayor rentabilidad (Pezo-Carreón, 2010).. Las elevadas tasas de mortalidad por causas infecciosas, principalmente en las crías de las alpacas, son uno de los factores limitantes para el desarrollo económico de las actividades pecuarias en el mundo andino (Ameghino y DeMartini, 1991). En consecuencia, resulta imperativo llevar a cabo investigaciones acerca de los mecanismos de defensa inmunológica frente a enfermedades infecciosas, especialmente en neonatos, con el objetivo de desarrollar medidas preventivas que abarquen tanto la inmunización como prácticas sanitarias en el manejo, con el fin de controlar la mortalidad por enterotoxemia en las crías de alpacas.

La enterotoxemia constituye una enfermedad infecciosa aguda que afecta principalmente a las crías de alpaca durante el primer mes de vida. Es considerada la enfermedad más destructiva, siendo ocasionada por las enterotoxinas producidas por una bacteria anaeróbica, el *Clostridium perfringens* tipo A (anteriormente denominada *C. welchii*), las cuales provocan de manera rápida daño severo a nivel intestinal y a órganos vitales, culminando con la muerte súbita del animal. La mortalidad de crías supera largamente el 50 por ciento en algunos años (Fernández Baca, 2005). Históricamente, *Clostridium perfringens* tipos A y C ha sido considerados como los agentes desencadenantes del proceso infeccioso (Ramírez, 1991). Pérez et al., (2012), Descubrieron que el 97.9% de los 46/47 aislados de casos mortales de la enfermedad eran de *Clostridium perfringens* tipo A, mientras que la variante restante correspondía al tipo C. Disminuir estos porcentajes de mortalidad y morbilidad ayudaría a los productores alpaqueros a incrementar su producción y productividad, recuperando el valioso potencial genético de los animales. Sobre todo, para conservar la buena salud de sus alpacas para obtener mayor rentabilidad.

La prevención de la enterotoxemia en el Perú, se basa en el uso de adecuadas medidas de higiene y manejo y, sobre todo, en asegurarse que el neonato ingiera el calostro dentro de las primeras 12 horas de vida (Moro y Guerrero, 1987); sin embargo, estos programas preventivos raramente involucran el uso de vacunas (Ameghino y DeMartini, 1991). Una manera de poder prevenir la enterotoxemia es la inmunización con vacunas de anacultivo o bacterina-anacultivo como método de protección contra esta enfermedad. Las toxinas recuperadas de los cultivos de *Clostridium perfringens* tipo A obtenidas de crías de alpacas muertas por enterotoxemia inactivadas para formar

anacultivos, que se apliquen de acuerdo a un programa sanitario tanto a madres y crías para mantener una inmunidad permanente en los rebaños alpaqueros y controlar eficientemente la enterotoxemia en alpacas neonatas.

2.4 Objetivos

2.4.1 Objetivo general

- *Evaluar el efecto de un anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A sobre los niveles de IgG en madres/crías y la mortalidad por enterotoxemia en crías de alpacas.*

2.4.2 Objetivos específicos

- **Objetivo 1**
Determinar el efecto de un anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A sobre los niveles de IgG en madres en el último tercio de gestación de alpacas.
- **Objetivo 2**
Determinar el efecto de un anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A sobre los niveles de IgG en crías de alpacas en el periodo neonatal.
- **Objetivo 3**
Determinar el efecto de un anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A sobre la mortalidad por enterotoxemia en crías de alpaca en el periodo neonatal.

2.5 Hipótesis

2.5.1 Hipótesis general

- *El uso de un anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A incrementa los niveles de IgG en alpacas madres/crías y reduce la mortalidad por enterotoxemia.*

2.5.2 Hipótesis específicas

- Hipótesis 1
El efecto de un anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A incrementa los niveles de IgG en madres en el último tercio de gestación de alpacas.
- Hipótesis 2
El efecto de un anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A incrementa los niveles de IgG en crías de alpacas en el periodo neonatal.
- Hipótesis 3
El efecto de un anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A reduce la mortalidad por enterotoxemia en crías de alpaca en el periodo neonatal.



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

El estudio se realizó en el Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos (CICAS) La Raya, perteneciente a la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco y en el laboratorio de Microbiología y Parasitología del IVITA Marangani, de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Estas instalaciones se encuentran ubicadas a $14^{\circ} 47' 43,45''$ de latitud sur y $71^{\circ} 04' 55,21''$ de longitud oeste, en una altitud que oscila entre 4,100 y 5,000 metros.

3.2 Población

El Centro de Investigación La Raya dispone de aproximadamente de 6,500 hectáreas de extensión de terreno. En este lugar, se lleva a cabo la cría extensiva de alpacas y llamas en praderas de estratos altos y bajos, con bofedales y manantiales. La población total de animales en el centro consta de 3550 alpacas Huacaya y Suri, de las cuales 2150 alpacas son hembras en edad reproductiva. Además, cuenta con 280 llamas K'ara y Ch'acu. Esta población de alpacas y llamas proporciona una base adecuada para la selección de sujetos de estudio en el marco de la investigación.

3.3 Muestra

Se utilizaron 380 alpacas del rebaño del CICAS La Raya – UNSAAC distribuidas de la siguiente manera:

Madres gestantes: Se obtuvo de un rebaño de alpacas preñadas Huacaya, se escogió al azar 40 animales múltiparas, con aproximadamente nueve meses de gestación clínicamente sanas para evaluar sus concentraciones de IgG al 9no y 10mo mes de gestación.

Crías: De las 40 madres seleccionadas en sus 40 crías a los 5 y 20 días de edad se evaluaron sus concentraciones de IgG, y en 300 crías de alpacas se evaluó el porcentaje de mortalidad inmunizadas con anacultivo de cepas de *Clostridium perfringens* en el periodo perinatal

Obtención del anacultivo de cepas de *Clostridium perfringens* tipo A

Las muestras utilizadas para aislar *Clostridium perfringens* consistieron en secciones de aproximadamente 10 cm de longitud del intestino delgado afectado, las cuales fueron ligadas en ambos extremos, conservadas en tetraborato de sodio (Bórax), y transportadas al laboratorio para su procesamiento. Estas muestras provinieron de animales que fueron diagnosticados muertos por enterotoxemia, basado en los signos clínicos presentados.

Para el aislamiento bacteriano, se tomaron pequeños segmentos (4 cm²) de muestra con su contenido y se cultivaron en medio de caldo tioglicolato (Merck), incubándolos en condiciones anaeróbicas (utilizando el sistema Gaspack, Anaerocult A® de Merck) a 45°C durante 48 horas. Posteriormente, se sembraron e incubaron en medio agar sangre (medio de agar tripticasa de soya suplementado con 5% de sangre ovina desfibrinada estéril) y se incubaron en condiciones anaeróbicas a 45°C durante 48 horas (Pérez et al., 2012). Estas colonias se sembraron en agar yema de huevo para realizar la reacción de lecitinasa, prueba específica que sirvió para identificar toxina A del *C. perfringens* incubadas a 37 °C durante 18-24 h en anaerobiosis (Nagler, 1939) y se reactivaron en caldo Tioglicolato a 37°C por 24 horas, posteriormente el cultivo fue inactivado con formalina a una concentración de 1% por 24 horas y se obtuvo una suspensión de toxina a base de cepas de *Clostridium perfringens* tipo A (Yaya L. y Rosadio A., 2005, Rosadio et al., 2012).

Para la identificación de *Clostridium. perfringens* se aplicaron los siguientes criterios:

- a) Crecimiento en condiciones anaeróbicas;
- b) Observación de la morfología de las colonias.
- c) Detección de la característica doble hemólisis (hemólisis completa e incompleta) en agar sangre.
- d) Análisis microscópico de la forma bacteriana y su reacción a la tinción de Gram.
- e) Capacidad de reducción de sulfito, visible por la formación de colonias oscuras en medio de agar triptosa sulfato cicloserina (TSC) incubadas anaeróticamente a 37°C durante 18 a 24 horas.
- f) Actividad lecitinasas, indicada por la aparición de zonas opacas alrededor de las colonias (Reacción de Nagler) en agar yema de huevo (agar tripticasa de soya suplementado con 10% de yema de huevo estéril) incubado anaeróticamente a 37°C durante 18 a 24 horas.
- g) Resultado negativo en la prueba de catalasa.

3.4 Método de investigación

3.4.1 Experimento 1.

Se llevó a cabo mediante un estudio experimental de 40 alpacas preñadas con gestación de 9 y 10 meses, divididas aleatoriamente en 2 grupos de 20 alpacas cada uno. A un grupo se le administró un anacultivo desarrollado a partir de cepas de *Clostridium perfringens* tipo A. Se midieron los niveles de IgG en madres que recibieron y no recibieron el anacultivo utilizando el método de inmunodifusión radial descrito por Fahey y Mckelvey, (1965) y Mancini et al., (1965), y se evaluaron utilizando la prueba estadística paramétrica "t" de Student.

3.4.2 Experimento 2.

El método utilizado fue experimental, en 20 crías nacidas de las madres vacunadas se les administro 2 mL de anacultivo a base de cepas de *Clostridium perfringens* tipo A y se determinó los niveles de IgG a los 5 y 20 días de nacidas a las crías de madres vacunadas y no vacunadas mediante el método de

inmunodifusión radial desarrollado por Fahey y Mckelvey, (1965) y Mancini et al., (1965) y evaluadas por la prueba paramétrica de “t” de Student.

3.4.3 Experimento 3.

Se utilizó un anacultivo de cepas de *Clostridium perfringens* tipo A obtenidos de crías muertas por enterotoxemia a 150 madres al 9no y 10mo mes de gestación y se vacunaron a sus respectivas crías a los 5 días de edad y se compararon con un grupo de 150 alpacas madres y crías no vacunados determinando el porcentaje de mortalidad por enterotoxemia en ambos grupos, el cual fue evaluado mediante Ji cuadrado

3.5 Descripción detallada de métodos por objetivos específicos

Considerar en la presentación de la metodología: a) Descripción de variables analizadas en los objetivos específicos, b) Descripción detallada del uso de materiales, equipos, instrumentos, insumos, entre otros y c) Aplicación de prueba estadística inferencial.

3.5.1 Experimento 1 y 2: Determinar niveles de IgG en alpacas madres y crías inmunizadas con anacultivo a base de *Clostridium perfringens* en el último tercio de gestación y periodo perinatal respectivamente.

A. Administración del anacultivo a base de cepas de *Clostridium perfringens* tipo A en madres preñadas y crías.

Se identificaron 40 alpacas preñadas las que fueron divididas en 2 grupos de 20 alpacas en forma aleatoria un primer grupo A (Experimental) de madres vacunadas y otro no vacunadas grupo B (Control); al grupo experimental se le administró 2 mL de anacultivo de cepas de *Clostridium perfringens* tipo A por vía subcutánea y al grupo control no se le administro ningún anacultivo; a las crías nacidas de las madres del grupo experimental se les administro 2 mL del anacultivo de cepas de *Clostridium perfringens* tipo A y a las crías del grupo control no se les administro ningún anacultivo; las alpacas madres y crías del grupo experimental y control estuvieron bajo las mismas condiciones de manejo de la majada de parición del rebaño del CICAS La Raya UNSAAC.

B. Obtención de suero sanguíneo obtenido de madres y crías

Se obtuvo de las madres preñadas y crías sangre por punción de la vena yugular al noveno y décimo mes de gestación y a los 5 y 20 días de nacidas respectivamente, utilizando tubos de recolección de sangre Vacutainer con separador de plasma, agujas hipodérmicas Nro. 21 G x 1", y registrando el número de arete de la madre junto a la fecha de obtención de la muestra.

Las muestras se transportaron al laboratorio de Microbiología y parasitología del IVITA Marangani de la FMV de la UNMSM en cooler con refrigerantes manteniendo las muestras entre 2 – 4 °C para su procesamiento.

Las muestras de sangre de madres y crías fueron centrifugadas por 5000 rpm durante 5 minutos obteniendo suero depositándolos en viales identificados. Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

C. Determinación de las concentraciones de IgG en sueros de alpacas madres y crías

Las muestras de madres y crías fueron descongeladas 2 horas antes, a temperatura ambiente, realizando los análisis de las concentraciones de IgG (mg/dL) mediante “Test inmunodifusión radial para cuantificación de IgG de camélidos en suero o plasma de Triple Farms Bellingham, WA”, el cual contiene antígeno de IgG de camélido descrito por Fahey y Mckelvey, (1965) y Mancini et al., (1965). El principio subyacente en la técnica de inmunodifusión radial se fundamenta en la dispersión radial de un antígeno (Inmunoglobulina G) desde un pozo circular en un gel homogéneo que contiene un antisuero específico para IgG. Esto da lugar a la formación de un anillo de precipitado compuesto por antígeno y anticuerpo, el cual sigue expandiéndose hasta alcanzar un estado de equilibrio conocido como punto de cese, que se manifiesta aproximadamente a las 24 horas. Los diámetros resultantes son directamente proporcionales a las concentraciones del antígeno. La cuantificación se efectúa mediante la medición del diámetro del anillo, el

cual se correlaciona con una curva de calibración basada en una regresión lineal simple.

Las placas utilizadas en la técnica de inmunodifusión radial fueron retiradas del refrigerador 30 minutos antes de aplicar los tres sueros de referencia estándar y las muestras de suero de las madres en los pocillos. Se procedió a eliminar el exceso de humedad abriendo el disco para permitir que se seque la superficie y los pocillos por evaporación.

Con una pipeta calibrada, se depositaron 5 μ l de cada uno de los sueros de referencia en los pocillos de la placa, seguido por la deposición de 5 μ l de los sueros de las madres y crías. Se registró la hora y la fecha de este proceso, y una vez completado el llenado, se cubrió el disco.

Los discos, junto con su cubierta de plástico, se colocaron en una superficie plana y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 horas para permitir la reacción antígeno-anticuerpo. La lectura se llevó a cabo midiendo los diámetros de los anillos de precipitación (en milímetros) formados por la interacción antígeno-anticuerpo, utilizando una regla Bernier.

D. Análisis estadístico

Las diferencias de medias estadísticas de los datos se analizaron empleando la “t” de Student de independencia para determinar las concentraciones entre los grupos A experimental (madres vacunadas) y B control (madres no vacunadas) y entre las crías vacunadas de madres del grupo A experimental y las crías no vacunadas de madres no vacunadas del grupo B control.

Los datos obtenidos de muestras de madres del 9no y 10mo mes y crías a los 5 días y 20 días de edad se analizaron empleando “t” de Student para muestras pareadas determinando sus concentraciones tanto en las madres y crías vacunadas y no vacunadas para determinar la existencia de diferencias estadísticas, utilizando un análisis de significancia al 95% de certeza. Se utilizó paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI.



3.5.2 Experimento 3: Determinar el porcentaje de mortalidad en crías de alpaca inmunizadas con anacultivo de cepas *Clostridium perfringens* en el periodo perinatal.

A. Selección de animales para prueba de anacultivo en madres – crías

Se seleccionaron al azar 150 madres al 9no y 10mo mes de preñez y a las crías a los 5 días de edad y se le aplicó un anacultivo a base de cepas de *Clostridium perfringens* y se comparó la mortalidad con un grupo de 150 alpacas madres y crías no vacunadas determinando el porcentaje de mortalidad por enterotoxemia en ambos grupos, el cual fue evaluado mediante Ji cuadrado. Se utilizó paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Determinación de los niveles de IgG en alpacas madres inmunizadas con anacultivo a base de *Clostridium perfringens* en el último tercio de gestación.

Tabla 2

Comparación de medias pareada del grupo experimental y control de alpacas del 9no y 10mo mes de gestación inmunizadas con anacultivo a base de Clostridium perfringens

t Student pareado	n	9no mes mg/dL IgG	10mo mes mg/dL IgG	Diferencia Medias mg/dL IgG	DE mg/dL IgG	
Alpacas gestantes	Experimental	20	3229.14 _a	3845.92 _b	616.79	635.47
	Control	20	3338.6 _a	3347.44 _a	8.79	111.87

Nota. _{a, b} Subíndices diferentes dentro las filas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

En la tabla 2, se observa un aumento significativo ($p \leq 0.05$, $p = 0.0000352$) de 616.78 mg/dL en los niveles de IgG en el grupo experimental en comparación al grupo control, siendo los valores de niveles de IgG en el noveno mes de gestación de 3229.14 mg/dL y en el décimo mes de 3845.92 mg/dL de IgG. En el grupo control, compuesto por madres de alpacas gestantes que no fueron vacunadas con el anacultivo a base de *Clostridium perfringens* tipo A, y

que fueron evaluadas en el noveno y décimo mes de gestación con medias de 3338.6 y 3347.44 mg/dL de IgG respectivamente, no se encontró una diferencia significativa ($p \geq 0.05$, $p = 0.729136$). Esto se debe a que el incremento observado fue de apenas 8.7905 mg/dL de IgG (tabla 2).

El mecanismo funcional de las vacunas anacultivos es producir anticuerpos contra las toxinas mediante la inhibición de la actividad de las toxinas. Resultados similares al presente estudio se encontraron en ovejas donde los anticuerpos pueden transferirse de la oveja al cordero siempre que la oveja se encuentre al final de la gestación. De la Rosa et al., (1997) observaron que las concentraciones de anticuerpos en el suero de ovejas no vacunadas se mantuvieron en 2 UI/mL, pero alcanzaron un máximo en ovejas vacunadas de 15 UI/mL en la semana 1 antes del parto; como se puede observar en la tabla 2, las alpacas del grupo control no vacunadas al 9no mes de gestación no incrementaron sus niveles de anticuerpos al 10mo mes de gestación como si ocurrió en las alpacas gestantes del grupo experimental.

Oliveira et al., (2021), evaluó la respuesta humoral en bovinos y caprinos después de un anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo D épsilon cada 30 días durante un año después de la vacunación. Las cabras se revacunaron el día 360, los picos de anticuerpos oscilaron entre 6.90 y 11.47 UI/mL en bovinos y de 1.11 a 4.40 UI/mL en cabras. En bovinos los títulos de anticuerpos se mantuvieron por encima de 0.2 UI/mL hasta el final del experimento. En las cabras, provocó anticuerpos duraderos y todos los animales mantuvieron los títulos protectores durante 210 días después de la vacunación produciéndose respuestas humorales fuertes y duraderas en ambas especies; en el presente estudio se obtuvo resultados similares de una respuesta humoral fuerte y duradera durante los tres meses que dura la parición periodo en que se presenta la enterotoxemia con más frecuencia, esta respuesta en alpacas madre-cría tras la vacunación con anacultivos de cepas de *Clostridium perfringens* tipo A inactivado, se debería al incremento de anticuerpos de IgG contra toxina de *Clostridium perfringens*.

Se determinaron concentraciones de inmunoglobulina G (IgG) en llamas, alpacas periparturientas; los sueros de llamas periparturientas (media 3098.2 mg dL⁻¹) no fueron diferentes ($P \geq 0,05$) de las de alpacas (3126.1 mg dL⁻¹) las

concentraciones de IgG en el suero de animales preñadas se mantuvieron sin cambios (Bravo et al., 1997) Nuestros datos en los grupo control son casi similares pero en el grupo experimental es superior posiblemente debido al efecto del anacultivo. Auad et al., (2020) en llamas determinó la concentración de IgG en suero de las madres antes del parto, los resultados mostraron una concentración media de IgG en suero de llamas de 4311.47 mg/dL, en el presente estudio las concentraciones de IgG (Tabla 2) en madres alpacas gestantes en los grupos experimental y control no superan a las concentraciones de llamas posiblemente porque estos animales se encontraban semiestabulados y con suplementación alimentaria y en nuestro estudio estaban bajo condiciones de manejo extensivo en pasturas naturales.

Tabla 3

Comparación de medias de independencia entre los grupo experimental y control de alpacas del 9no y 10mo mes de gestación inmunizadas con anacultivo a base de Clostridium perfringens

t Student Independencia	Mes	N	Control mg/dL IgG	Experimenta l mg/dL IgG	Diferencia medias mg/dL IgG	DE mg/dL IgG
Alpacas gestantes	9no	20	3338.65 _a	3229.14 _a	109.52	631.38
	10mo	20	3347.44 _a	3845.92 _b	498.48	586.65

Nota. _{a, b} Subíndices diferentes dentro las filas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Los niveles de inmunoglobulina en el grupo experimental y control al 9no mes de gestación fueron de 3229.14 y 3338.65 mg/dL, respectivamente no se encontró diferencia significativa ($p \geq 0.05$, $p = 0.5865$) lo que significaría que ambos grupos tendrían al inicio del experimento similares concentraciones de niveles de IgG, con una diferencia entre los grupos de 109.52 IgG mg/dL. Con respecto a la **comparación** de medias entre los grupos experimental y control al 10mo mes de gestación, se observó una disminución significativa en los niveles de IgG de 498.48mg/dL en el grupo control, demostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$, $p = 0.0106$) entre las mediciones

realizadas en el 10mo mes con una media de 3845.92 y 3347.44 mg/dL de IgG para el grupo experimental y control respectivamente (tabla 3). Lo que implicaría que hubo un efecto del incremento de la producción de IgG por la administración del anacultivo a base de cepas de *Clostridium perfringens*.

Los niveles de inmunoglobulina G en el suero de alpacas vacunadas, al 10mo mes de gestación son mayores a los reportados por Bravo et al, (1997) antes, durante y después del parto tanto en alpacas y llamas los cuales permanecen constantes, lo que sugiere que la transferencia de IgG en llamas y alpacas no fue el resultado del paso del torrente sanguíneo a la glándula mamaria justo antes del parto, ya que se ha demostrado que existe una gran acumulación y producción de IgG en la glándula mamaria de la llama y alpaca preñadas estas concentraciones de IgG disminuyeron rápidamente en la secreción mamaria y no se detectaron valores después del día 5 después del parto siendo este patrón exclusivo en llamas y alpacas. En nuestro estudio estos niveles se incrementarían en el suero sanguíneo por la aplicación del anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A obtenido de alpacas muertas por enterotoxemia.

Una actividad importante es asegurar que se produzca la succión del calostro tan pronto como nace la cría para garantizar su nutrición y la provisión de anticuerpos. Crear la inmunidad en la cría tiene un rol muy importante, ya que está dirigida a generar anticuerpos específicos contra la enterotoxemia del *Clostridium perfringens* tipo A, transferidos de la madre a la cría a través del calostro; por consiguiente, debe vacunarse a las madres con el anacultivo; asegurando un sistema de manejo del rebaño de parición con una orientación precisa de mantenerlas higiénicas, con actividades tales como: ubicación de los rebaños de parición en zonas de ladera o altas, pastorear en horas programadas y solamente lo suficientemente necesario, inmovilización de los rebaños de parición y, evitar que las crías tomen aguas estancadas especialmente en los veranillos (Pezo-Carreón et al., 2014).

El amamantamiento del recién nacido inmediatamente después del parto ayuda a prevenir los problemas del complejo diarreico, protegiendo al tracto gastrointestinal de la cría de alpaca contra numerosos agentes causales de diarrea

(Ameghino y DeMartini, 1991). Los anticuerpos presentes en el calostro recubrirán la mucosa intestinal previniendo la adherencia y penetración de los agentes patógenos. Los anticuerpos del calostro materno son absorbidos en el intestino y alcanzan la circulación sanguínea del recién nacido, los cuales servirán de protección contra enfermedades durante las primeras semanas de vida (Bravo et al., 1997)

Coincidimos con los autores mencionados y entendiendo que la enterotoxemia de las crías de alpacas es la única forma de diarrea neonatal que puede prevenirse mediante un programa adecuado de vacunación y un manejo adecuado, que debe iniciarse vacunando a madres de alpacas gestantes al noveno mes de gestación y una segunda dosis al décimo mes de gestación y posteriormente revacunarlas anualmente. Enfermedades producidas por *Clostridium perfringens* provocan pérdidas considerables en el rebaño, ya que el tratamiento con antibióticos no se tiene buenos resultados debido a la rápida evolución de las enfermedades. Además, la erradicación de la clostridiosis es prácticamente imposible. Las características ecológicas del agente y su forma esporulada de resistencia, junto con otros factores que conducen a enfermedades, son imposibles de controlar y eliminar totalmente (Lobato et al., 2007).

El anacultivo generado en este estudio se postula como candidato para desarrollar una vacuna contra la enterotoxemia inducida por la toxina α de *Clostridium perfringens* tipo A. La metodología empleada permite obtener una toxina con el uso directo de cepas de *Clostridium perfringens* tipo A de crías de alpacas muertas por enterotoxemia, mediante la inactivación de la toxina, que se produce en la célula bacteriana en forma de un anacultivo Este anacultivo demostró ser eficaz para estimular buenos niveles serológicos de IgG que presenta reactividad en crías de alpacas contra enterotoxemia. En el presente estudio se demostró una variación sustancial en los niveles de IgG entre madres vacunadas comparadas con las alpacas madres no vacunadas y entre grupos de alpacas vacunadas y no vacunadas bajo un mismo sistema de manejo.

4.1.2 Determinar niveles de IgG en alpaca crías inmunizadas con anacultivo a base de *Clostridium perfringens* en el periodo perinatal.

La medias de crías vacunadas con anacultivo a base de *Clostridium perfringens* a los 5 y 20 días es de 1260.24 y 1867.13 mg/dL de IgG respectivamente y la comparación de medias de ambos grupos es de 606.90 con un valor de $p \leq 0.05$, existiendo un incremento significativo de IgG a los 20 días en el grupo experimental posiblemente debido a la aplicación del anacultivo a los 5 días de nacida; también se muestra la diferencia de medias entre crías no vacunadas con anacultivo a base de *Clostridium perfringens* a los 5 y 20 días de nacidas existiendo diferencia significativa $P \leq 0.05$ entre los días evaluados, rechazando la hipótesis nula (tabla 4).

Tabla 4

*Comparación de medias pareada del grupo experimental y control de crías de alpacas de 5 y 20 días de nacidas inmunizadas con anacultivo a base de *Clostridium perfringens**

t Student pareado	n	Día 5 mg/dL IgG	Día 20 mg/dL IgG	Diferencia Media mg/dL IgG	DE mg/dL IgG
Experimental	20	1260.24 _a	1867.13 _b	606.9	248.72
Crías Control	20	1248.429 _a	811.44 _b	436.99	511.27

Nota. _{a, b} Subíndices diferentes dentro las filas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Las toxinas de *Clostridium perfringens* tipo A son responsables de la enterotoxemia en crías de alpacas, que está presente en la flora normal del intestino que suele presentarse en cantidades bajas produciendo cantidades mínimas de toxina y, en condiciones normales, se eliminan mediante movimientos intestinales normales o se inactivan mediante anticuerpos circulantes; los cambios repentinos en la dieta o la alimentación abundante permiten que las bacterias se multipliquen rápidamente, ocurriendo toxemia cuando el movimiento de los alimentos en el intestino es lento o los organismos se multiplican y la producción de toxinas es más rápida que la tasa de eliminación o neutralización de toxinas (Gokce et al., 2007).

Bravo et al., (1997) determinaron concentraciones de IgG en crías hasta los 60 días de edad. Las concentraciones medias de IgG en sueros de crías fueron diferentes por días ($P \leq 0,05$) con 0 mg dL-i, 2342.9 mg dL-', 2329.2 mg dL-i, 3201.2 mg dL-', 2738.1 mg dL-' y 2638.8 mg. dL-' en el momento del nacimiento, 12 h, 1, 2, 3 y 4 días después del nacimiento. No hubo diferencias ($P \geq 0,05$) en las concentraciones medias de IgG entre especies, crías de llama (2370.6) y alpaca (2347.1), y no hubo diferencias ($P \geq 0.05$) en los valores medios generales entre crías machos (2342.3) y hembras (2352.2). Las crías de llama y alpaca nacieron con gammaglobulinemia y las concentraciones de IgG aumentaron rápidamente después de la lactancia y después disminuyeron. Estos resultados son mayores a nuestros resultados debido a que existe una disminución de las concentraciones de IgG desde las 24 horas donde está el mayor pico de concentración de IgG y va disminuyendo conforme pasan los días.

Tabla 5

Comparación de medias de independencia entre el grupo experimental y control de crías de alpacas de 5 y 20 días de nacidas inmunizadas con anacultivo a base de Clostridium perfringens

t Student Independencia	Día	n	Control mg/dL IgG	Experimental mg/dL IgG	Diferencia Media mg/dL IgG	DE mg/dL IgG
Crías	5	20	1248.43 _a	1260.24 _a	11.81	545.8
	20	20	811.44 _a	1867.13 _b	1055.69	427.28

Nota. _{a, b} Subíndices diferentes dentro las filas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Las medias de crías de alpacas del grupo experimental y control a los 5 días de nacidas es de 1260.24 y 1248.43 mg/dL de IgG respectivamente y una comparación de medias de 11.81 mg/dL de IgG, el valor $P \geq 0.05$, 0.9458 lo que indica que no existe diferencia significativa entre los grupos experimental y control, por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula; asimismo se observa las medias que proceden de crías del grupo experimental vacunadas con anacultivo a base de *Clostridium perfringens* a los 20 días de nacidas y crías del grupo control no vacunadas sin anacultivo a los 20 días de nacidas, cuyas medias son 1867.13 y 811.44 mg/dL de IgG respectivamente, con una comparación de media de 1055.69

mg/dL existiendo una diferencia significativa $P \leq 0.05$ entre los días de nacidas, rechazando la hipótesis nula al 95.0% de confianza (tabla 5).

Los promedios hallados entre el grupo de crías vacunadas a los 5 y 20 días de nacidas con anacultivo a base de *Clostridium perfringens* y los promedios del grupo de animales no vacunados, encontrándose que entre el grupo vacunado a los 5 días de nacidas con anacultivo un incremento de 606.90 de concentración de IgG mg/dL a los 20 días post vacunación; mientras que en el grupo no vacunado con anacultivo a base de *Clostridium perfringens* a los 5 existe una disminución de la concentraciones de IgG mg/dL de 436.99 a los 20 días de nacidas; comparando los promedios entre los días de nacidos de los grupos de crías vacunadas y no vacunadas de 5 días de nacidas la diferencia es de 11.81 de IgG mg/dL; mientras que existe un incremento de 498.48 mg/dL de IgG en el promedio de concentraciones de IgG encontradas entre las crías vacunadas con anacultivo a base de *Clostridium perfringens* frente a los 20 días de nacidas con las crías del grupo no vacunadas a los 20 días.

La respuesta humoral se refiere a las inmunoglobulinas (Ig), una fracción de las proteínas presentes en la sangre, que son de naturaleza proteica y se producen en el sistema inmunológico de un animal como resultado de la estimulación por un antígeno específico. En otras palabras, las Ig serán altamente específicas para la toxina α de *Clostridium perfringens* tipo A. No obstante, esta respuesta activa del sistema inmunológico solo se observa en animales adultos que tienen un sistema inmunológico desarrollado. En animales jóvenes y recién nacidos, este sistema está en pleno desarrollo y adquirirá funcionalidad de manera gradual, por lo que la respuesta inmunológica activa no es tan evidente en estos casos.

Es por ello que la defensa contra un agente, en neonatos, está dada por los anticuerpos que pueden ser transferidos por su madre a través del calostro (Ramírez, 1991).

El sistema inmunológico de las crías de alpaca puede no estar completamente desarrollado al nacer, por lo que es esencial la contribución de anticuerpos maternos para garantizar la supervivencia en las primeras horas de vida (Englund, 2007). Según los resultados de este estudio, la transferencia de

inmunidad a través de la madre permite implementar estrategias de inmunización mediante la vacunación de la alpaca durante el periodo de gestación. Esto tiene como objetivo proteger al recién nacido alpaca en las primeras etapas de su vida, una condición que también se observa en otras especies.

4.1.3 Determinación de la asociación y porcentaje de mortalidad en crías de alpaca inmunizadas con anacultivo de *Clostridium perfringens* en el periodo perinatal.

En las crías vacunadas con y sin anacultivo a base de *Clostridium perfringens* el Chi cuadrado calculado es de 30.77, mayor al valor crítico de 3.84. Debido a que el valor crítico es menor al valor calculado, rechazamos la hipótesis nula y afirmar que existe una asociación estadísticamente significativa entre la sobrevivencia de las crías de alpacas y la aplicación del anacultivo de *Clostridium perfringens* (tabla 6)

Tabla 6

Número de Crías que sobrevivieron y no sobrevivieron en el grupo experimental y control

Vacuna	SOBREVIVIO		
	SI	NO	TOTAL
Grupo experimental	146	4	150
Grupo control	113	37	150
Total	259	41	300

La mortalidad en las crías vacunadas con anacultivo (CT) a base de *Clostridium perfringens* es de 4/150 siendo la mortalidad de 6% y en las crías no vacunadas sin anacultivo (ST) de 37/150 obteniéndose una mortalidad de 24.66%. Evaluando los resultados obtenidos en 150 crías de alpacas con el anacultivo a base de *Clostridium perfringens*, aplicado a 150 crías de alpacas y comparándolas con 150 crías de alpacas no vacunadas bajo un mismo sistema de manejo durante la época de parición se obtuvo una mortalidad de 2.6% y 24.66% de mortalidad

para crías de alpacas vacunadas y no vacunadas respectivamente. Yaya L. y Rosadio A., (2005), ensayaron tres programas de vacunación anticlostridial empleando un anacultivo, durante los años 2001, 2002, y 2002; se administró en el primer año a todas las madres gestantes dos dosis de la vacuna y a todas las crías una dosis; a todas las crías en el segundo año se vacunó con una dosis, y en el tercer año a todas las madres gestantes se vacunó con una dosis; tomando como grupo control la campaña de parición del año 2000, si bien es cierto la vacuna fue efectiva sin importar el tipo de programa aplicado; no utilizaron un grupo control durante las tres temporadas de parición y las cepas de *Clostridium perfringens*, fueron de origen ovino (cepas A, B, C y D) y solo una cepa tipo A aislada de alpaca; a diferencia del presente trabajo que si tuvo un grupo control dentro del mismo grupo y utilizo una vacuna hecha cepa de *Clostridium perfringens* tipo A proveniente de crías de alpacas muertas por enterotoxemia.

Los índices de mortalidad son significativos tanto en empresas asociativas (26 a 70%) como en pequeños propietarios (18-50%) en el departamento de Puno. Es pertinente clasificar la mortalidad en camélidos en sus tres principales etapas: crías, tuis y adultos. Las crías comprenden el periodo desde el nacimiento hasta el destete (6 a 8 meses de edad), incluyendo la mortalidad neonatal (hasta los 30 días de edad); son las crías más susceptibles a enfermedades, y su mortalidad puede estar comprendida entre 9.3 a 56.6% (Ramírez, 1991); en el presente estudio se tomó en cuenta solo la mortalidad de crías por enterotoxemia durante la campaña de parición y el porcentaje de mortalidad en las crías vacunadas con anacultivo a base de cepas de *Clostridium perfringens* son menores a los reportados.

En el Centro Experimental La Raya, inmunizaron con Enterovax F1vacuna, a tres grupos de alpacas; con una dosis de vacuna, con dos dosis de vacuna con intervalo de 21 días y un Grupo no vacunadas; los resultados fueron: 0.91%, 0% y 12% de morbilidad, respectivamente (Garnica y Málaga, 2018). Prehn et al., (1999)elaboró una autovacuna de los tipos A y B de la bacteria para la prevención de enterotoxemia en alpacas con un plan de vacunación de cada 4 meses en plantales de alto riesgo y cada 6 meses en zonas libres de brotes de enterotoxemia, siendo la prevención de la enterotoxemia exitosa en más de 6000 ejemplares. Ambos trabajos muestran buenos resultados de efectividad respecto a la mortalidad en nuestro estudio además del porcentaje de mortalidad mostramos

los niveles de anticuerpos que ha generado la vacunación con anacultivo a base de *Clostridium perfringens* de casos de enterotoxemia, así como lo muestra Bentancor et al., (2009) al aplicar una vacuna comercial inactivada de *Clostridium perfringens* ultrafiltrada adsorbida en una sal de aluminio, vía subcutánea concluyendo que las llamas desarrollaron anticuerpos contra la toxina *épsilon* tipo D de *Clostridium perfringens* después de dos vacunaciones de vacunas inactivada con un intervalo de 21 días, no presentaron efectos secundarios, desarrollan anticuerpos contra la toxina *épsilon* de *Clostridium perfringens* y la respuesta inmunitaria observaron que fue de duración corta, indicando que la vacuna debería administrarse con frecuencia o estratégicamente.

Las medidas generales de prevención deben incluir la provisión de anticuerpos maternos a los neonatos a través del calostro. Las condiciones de higiene sobrepoblación y rotación de las áreas de parición deben ser controladas (Pezo-Carreón et al., 2014). La actividad protectora de la inmunidad contra la toxina α juega un papel contra la enfermedad. Esta inmunidad está constituida por anticuerpos específicos contra enterotoxemia de *Clostridium perfringens* tipo A, transferidas de la madre a la cría a través del calostro (Bravo et al., 1997; Pezo-Carreón et al., 2018). Se observa en la práctica que no se presenta por varios años la enfermedad, haciendo su aparición en forma cíclica, esta observación estaría manifestando deficiencia de la inmunoprotección, lo que permitiría ver en los anacultivos el valor inmuno-profiláctico para esta enfermedad. En la actualidad no se encuentran disponibles vacunas comerciales con estas características (Ramírez y Ellis, 1988).

Los efectos de la vacunación con anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A en la reducción de mortalidad del 24.66% al 2.62%, tiene un efecto significativo de la vacuna contra la enterotoxemia afirmando que estadísticamente ($P \leq 0.05$) existe una asociación entre la sobrevivencia de las crías de alpacas vacunadas con anacultivo a base de *Clostridium perfringens*. Por lo tanto, el hecho de que hay menos mortalidad en las crías vacunadas en comparación con las crías no vacunadas podría atribuirse al incremento de la respuesta inmune ocasionada por el anacultivo de *Clostridium perfringens* y la capacidad del animal para responder a la vacuna administrada. Larsen et al., (2019) mencionan que algunas vacunas pueden proteger hasta el 98% de los animales vacunados, mientras que

otras producen tasas de protección más bajas, una vacuna puede inducir una respuesta inmunoprotectora más débil si el animal tiene un sistema inmunológico débil.

Vacunas contra la enterotoxemia requieren la administración de dos dosis, se ha recomendado utilizar una dosis de refuerzo de enterotoxemia entre 4 y 6 semanas después de la primera vacunación (De la Rosa et al., 1997; Uzal y Kelly, 1998); Miyashiro et al., 2007) además concluyeron que la primera vacunación contra la enterotoxemia seguida de una dosis de refuerzo después de 40 días provoca niveles de anticuerpos satisfactorios. Veschi et al. (2012) aplicó una dosis de refuerzo 1 mes después de la primera vacunación y los resultados mostraron que la profilaxis de la enterotoxemia en ovejas se podía lograr mediante este programa de vacunación. Comparando con los estudios arriba mencionados, la vacuna contra la enterotoxemia utilizada en el presente estudio tuvo un incremento sustancial protectoro en las alpacas gestantes y en las crías por el incremento de anticuerpos, lo que indica que esta vacuna tiene una inmunidad protectora adecuada en las crías por el anacultivo de cepas de *Clostridium perfringens* tipo A del grupo vacunado.

En otro estudio encontraron que la eficacia de la vacuna de pierna negra estudiada en ganado vacunado y no vacunado (grupo de control) demostró que no se encontraron casos de enfermedad en el ganado vacunado, mientras que algunos animales no vacunados murieron o enfermaron, observándose una diferencia significativa entre animales vacunados y no vacunados (Haghroosta, et al., 2014; Jiang et al., 2014). Estos resultados son similares a los presentados en este estudio donde animales del grupo control murieron en mayor proporción que en el grupo experimental observando este mismo comportamiento de mortalidad en ambos estudios.

4.2 Discusión

Se determinaron concentraciones de inmunoglobulina G (IgG) en llamas, alpacas periparturientas; los sueros de llamas periparturientas (media 3098.2 mg dL⁻¹) no fueron diferentes ($P \geq 0,05$) de las de alpacas (3126.1 mg dL⁻¹) las concentraciones de IgG en el suero de animales preñadas se mantuvieron sin cambios (Bravo et al., 1997) Nuestros datos en los grupos control son casi similares, pero en el grupo experimental es superior

posiblemente debido al efecto del anacultivo. Auad et al., (2020) en llamas determinó la concentración de IgG en suero de las madres antes del parto, los resultados mostraron una concentración media de IgG en suero de llamas de 4311.47 mg/dL, en el presente estudio las concentraciones de IgG (Tabla 2) en madres alpacas gestantes en los grupos experimental y control no superan a las concentraciones de llamas posiblemente porque estos animales se encontraban semiestabulados y con suplementación alimentaria y en nuestro estudio estaban bajo condiciones de manejo extensivo en pasturas naturales.

Bravo et al. (1997) determinaron que las concentraciones de IgG en crías de llama y alpaca se correlacionaron inversamente con el de sus madres; las crías nacen sin IgG debido a la placenta epiteliochorial; por lo tanto, la transferencia activa de IgG de la madre gestante al feto en el útero es nula; siendo pasiva la transferencia de IgG mediante el calostro crucial para la cría de llama o alpaca recién nacida; las niveles de IgG incrementan rápidamente después de amamantar el calostro; los valores elevados de IgG fueron evidentes a las 12 h después del nacimiento. Se determinó un aumento adicional en las crías de 24 h; las concentraciones de IgG comenzaron a disminuir de manera constante durante los siguientes 6 a 7 días después del nacimiento. Las concentraciones de IgG detectadas a los 5 días en crías vacunadas con y sin anacultivo en este estudio fueron comparables a las reportadas anteriormente en alpacas por (Garmendia y McGuire, 1987; Bravo et al., 1997). En otro estudio las concentraciones de IgG sérica de las crías de llamas comenzaron a descender desde las 24 horas hasta los 120 días lo que puede ser explicado por el catabolismo normal de las inmunoglobulinas maternas y es definido como la hipogammaglobulinemia fisiológica de los recién nacidos (Auad et al., 2020).

Estudios de vacunación contra la enterotoxemia tuvo un efecto significativo ($P \leq 0,01$) en la reducción de los aislamientos de *Clostridium perfringens*. La incidencia de la enfermedad en los grupos vacunados y no vacunados fue del 3.3 % y del 64.0 % ($P \leq 0,01$), respectivamente, lo que indica que esta vacuna tiene una inmunidad protectora adecuada (Ahsani et al., 2011); en nuestro estudio se empleó un similar protocolo en la preparación del anacultivo y aplicación y los resultados son similares en la reducción de la mortalidad por enterotoxemia en crías de alpacas originada por la vacunación que dio una fuerte respuesta de inmunoglobulina G sérica a la toxina de *Clostridium perfringens* tipo A en las alpacas gestantes y se transfirieron anticuerpos específicos (IgG) a sus crías inmunizadas con anacultivo a base de cepas de *Clostridium perfringens* tipo A obtenidas



de crías muertas por enterotoxemia. A partir de estos resultados, la inmunoprofilaxis es una propuesta en crías de alpacas para reducir la mortalidad por enterotoxemia.

En este estudio se probó que existe una variación sustancial en los niveles de IgG entre crías vacunadas comparadas con las crías no vacunadas y entre grupos de crías vacunadas y no vacunadas con anacultivo de cepas de *Clostridium perfringens* tipo A obtenido de crías muertas por enterotoxemia bajo un mismo sistema de manejo; en general, se produjo un incremento de IgG en madres y crías vacunadas. La vacunación contra *Clostridium perfringens* tipo A productora de toxina mediante este anacultivo demostró que es un preventivo eficaz contra la enterotoxemia en crías de alpacas y propone una nueva estrategia para mejorar la inmunización porque ha demostrado su eficacia contra enterotoxemia en crías de alpacas. Este es el primer estudio realizado en Perú que evalúa la respuesta inmune de alpacas madres-crías después de un esquema de vacunación contra clostridiosis.



CONCLUSIONES

- PRIMERO:** La aplicación de un cultivo derivado de la cepa de *Clostridium perfringens* tipo A, por el efecto estimulante del sistema inmunológico de las alpacas durante el noveno mes de gestación, genero el incremento de los niveles de inmunoglobulina G (IgG) en suero sanguíneo.
- SEGUNDO:** La administración de un anacultivo preparado a partir de una cepa de *Clostridium perfringens* tipo A, debido a su efecto estimulador del sistema inmunitario de las crías de alpacas, indujo el incremento de niveles de inmunoglobulina G (IgG) sérica.
- TERCERO:** Existe una asociación significativa entre la supervivencia de las crías de alpacas vacunadas con el anacultivo de cepas de *Clostridium perfringens*, reduciendo la mortalidad por enterotoxemia en las crías de alpacas.

RECOMENDACIONES

- PRIMERO:** Utilizar el esquema de vacunación de la presente investigación en la evaluación del anacultivo a base *Clostridium perfringens* tipo A, en rebaños alpaqueros en condiciones propias de la crianza de alpacas.
- SEGUNDO:** Producción de otros anacultivos de *Clostridium perfringens* tipo A, con el objetivo de preparar anacultivos propios de diferentes en hatos de pequeños, medianos y grandes productores, bajo condiciones propias de la crianza de alpacas.
- TERCERO:** Realizar estudios sobre los parámetros inmunológicos con respecto a los procesos fisiológicos de desarrollo, inmadurez funcional del sistema inmunológico y reacciones inmunológicas que ocurren en el cuerpo durante el desarrollo normal.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahsani, M. R., Bafti, M. S., Esmailizadeh, A. K., y Mohammadabadi, M. R. (2011). Genotyping of isolates of *Clostridium perfringens* from vaccinated and unvaccinated sheep. *Small Ruminant Research*, 95(1), 65-69. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.09.001>
- Ameghino Cabrejos, E. (1991). *Mortalidad en crías de alpacas*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Centro de Investigación Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura.
- Ata, N., Khairy, E. A., Dorgham, S., y Zaki, M. S. (2013). *Clostridium perfringens* disease. *Life Science Journal*, 10, 1599-1602.
- Auad, J., Cerutti, J., Cooper, L. G., Aguilar, M. S., y Lozano, A. (2020). Dinámica de la transferencia de inmunoglobulina G en el binomio madre-cría de llamas (*Lama glama*). *Revista Veterinaria*, 31(1), 78. <https://doi.org/10.30972/vet.3114638>
- Ba-Thein, W., Lyristis, M., Ohtani, K., Nisbet, I. T., Hayashi, H., Rood, J. I., y Shimizu, T. (1996). The virR/virS locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. *Journal of Bacteriology*, 178(9), 2514-2520. <https://doi.org/10.1128/jb.178.9.2514-2520.1996>
- Bentancor, A. B., Halperin, P., Flores, M., y Iribarren, F. (2009). Antibody response to the ϵ toxin of *Clostridium perfringens* following vaccination of *Lama glama* crías. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 3(08), 624-627. <https://doi.org/10.3855/jidc.555>
- Bravo, P. W., Garnica, J., y Fowler, M. E. (1997). Immunoglobulin G concentrations in periparturient llamas, alpacas and their crías. *Small Ruminant Research*, 26(1-2), 145-149. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(96\)00965-0](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(96)00965-0)
- Briolat, V., y Reysset, G. (2002). Identification of the *Clostridium perfringens* Genes Involved in the Adaptive Response to Oxidative Stress. *Journal of Bacteriology*, 184(9), 2333-2343. <https://doi.org/10.1128/JB.184.9.2333-2343.2002>

- Cárdenas, O., Sapana, R., Riquelme, J., Espezua, O., y Cordero, A. (2018). Fallas en la transferencia pasiva de inmunoglobulinas “G” en alpacas de la zona agroecológica de puna seca de la región Puno. *Memoria XLI Lima Reunión Científica Anual APPA: Asociación Peruana de Producción Animal Perú*, 137.
- Chad, E. K., DePeters, E. J., Puschner, B., Taylor, S. J., y Robison, J. (2014). Preliminary investigation of the composition of alpaca (*Vicugna pacos*) milk in California. *Small Ruminant Research*, 117(2), 165-168.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.12.032>
- Collins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M., y III, J. O. F. (2004). *Microbiological Methods*.
- Daley, L. P., Gagliardo, L. F., Duffy, M. S., Smith, M. C., y Appleton, J. A. (2005). Application of Monoclonal Antibodies in Functional and Comparative Investigations of Heavy-Chain Immunoglobulins in New World Camelids. *Clinical and Vaccine Immunology*, 12(3), 380-386.
<https://doi.org/10.1128/CDLI.12.3.380-386.2005>
- De la Rosa, C., Hogue, D. E., y Thonney, M. L. (1997). Vaccination schedules to raise antibody concentrations against ϵ -toxin of *Clostridium perfringens* in ewes and their triplet lambs. *Journal of Animal Science*, 75(9), 2328-2334.
<https://doi.org/10.2527/1997.7592328x>
- Englund, J. A. (2007). The Influence of Maternal Immunization on Infant Immune Responses. *Journal of Comparative Pathology*, 137, S16-S19.
<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.04.006>
- Fahey, J. L., y Mckelvey, E. M. (1965). Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 94, 84-90.
- Fernández, S., Padola, N., y Estein, S. (1994). El calostro, fuente de transferencia de la inmunidad materna. *Ciencia Veterinaria, Córdoba*, 22, 5.
- Fernández-Baca, S. (2005). *Situación actual de los camélidos sudamericanos en el Perú*. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).

- Ferreira, M., Moreira, G., Cunha, C., Mendonça, M., Salvarani, F., Moreira, Â., y Conceição, F. (2016). Recombinant Alpha, B, and ϵ Toxins of *Clostridium perfringens*: Production Strategies and Applications as Veterinary Vaccines. *Toxins*, 8(11), 340. <https://doi.org/10.3390/toxins8110340>
- Flodr, H., Wheeler, J. C., Krüger D., P., Olazábal L., J., y Rosadio A., R. (2012). Pruebas de campo para evaluar calidad calostrual en la alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(3), 307-316. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i3.913>
- Garmendia, A. E., y McGuire, T. C. (1987). Mechanism and isotypes involved in passive immunoglobulin transfer to the newborn alpaca (*Lama pacos*). *American Journal of Veterinary Research*, 48(10), 1465-1471.
- Garmendia, A. E., Palmer, G. H., DeMartini, J. C., y McGuire, T. C. (1987). Failure of passive immunoglobulin transfer: A major determinant of mortality in newborn alpacas (*Lama pacos*). *American Journal of Veterinary Research*, 48(10), 1472-1476.
- Garnica, J., y Málaga, J. (2018). Inmunización de alpacas contra enterotoxemia—La Raya Puno. *XII Arequipa: Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias del Perú*.
- Garnier, T., Canard, B., y Cole, S. T. (1991). Cloning, mapping, and molecular characterization of the rRNA operons of *Clostridium perfringens*. *Journal of Bacteriology*, 173(17), 5431-5438. <https://doi.org/10.1128/jb.173.17.5431-5438.1991>
- Garrity, G. M., Bell, J. A., y Lilburn, T. G. (s. f.). *Taxonomic Outline Of The Prokaryotes Bergey's Manual® Of Systematic Bacteriology, Second Edition*.
- Godden, S. (2008). Colostrum Management for Dairy Calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(1), 19-39. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.10.005>
- GÖKCE, H., GENÇ, O., SÖZMEN, M., y GÖKÇE, G. (2007). Determination of *Clostridium perfringens* Toxin-Types in Sheep with Suspected Enterotoxemia in

- Kars Province, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary y Animal Sciences*, 31(5), 355-360. [https://doi.org/-](https://doi.org/)
- Goossens, E., Verherstraeten, S., Valgaeren, B. R., Pardon, B., Timbermont, L., Schauvliege, S., Rodrigo-Mocholí, D., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Deprez, P. R., y Van Immerseel, F. (2016). Toxin-neutralizing antibodies protect against *Clostridium perfringens*-induced necrosis in an intestinal loop model for bovine necrohemorrhagic enteritis. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 101. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0730-8>
- Haghiroosta, A., Shoostari, M., Langroudi, R., y Esmaily, F. (2014). Study on Efficiency of Blackleg Vaccine in Cattle in Khuzestan. Province, Iran. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 5(2), 1741.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendahman, N., y Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 363(6428), 446-448. <https://doi.org/10.1038/363446a0>
- Hatheway, C. L. (1990). Toxigenic clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*, 3(1), 66-98.
- Jiang, Z., De, Y., Chang, J., Wang, F., y Yu, L. (2014). Induction of potential protective immunity against enterotoxemia in calves by single or multiple recombinant *Clostridium perfringens* toxoids. *Microbiology and Immunology*, 58(11), 621-627. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12198>
- Johansson, A., Aspan, A., Bagge, E., Båverud, V., Engström, B. E., y Johansson, K.-E. (2006). Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. *BMC Microbiology*, 6(1), 47. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-47>
- Jost, B. H., Billington, S. J., Trinh, H. T., Bueschel, D. M., y Songer, J. G. (2005). Atypical *cpb2* Genes, Encoding B2-Toxin in *Clostridium perfringens* Isolates of Nonporcine Origin. *Infection and Immunity*, 73(1), 652-656. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.652-656.2005>

- Katayama, S., Dupuy, B., Garnier, T., y Cole, S. T. (1995). Rapid expansion of the physical and genetic map of the chromosome of *Clostridium perfringens* CPN50. *Journal of Bacteriology*, 177(19), 5680-5685. <https://doi.org/10.1128/jb.177.19.5680-5685.1995>
- Larsen, A. E., Miceli, G., y Mórtoła, E. C. (2018). *Vacunas en rumiantes domésticos*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/78435>
- Lebrun, M., Mainil, J. G., y Linden, A. (2010). Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: Description, diagnosis and prophylaxis. *The Veterinary Record*, 167(1), 13-22. <https://doi.org/10.1136/vr.167.1.12>
- Lobato, F., Assis, R., y Salvarani, F. (2007). Clostridiosis dos pequenos ruminantes. *Revta Port. Cienc. Vet.*, 102, 23-34.
- Luna E., L., Maturrano H., L., Rivera G., H., Zanabria H., V., y Rosadio A., R. (2012). Genotipificación, evaluación toxigénica in vitro y sensibilidad a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* aisladas de casos diarreicos y fatales en alpacas neonatas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(3), 280-288.
- Maass, D. R., Sepulveda, J., Pernthaner, A., y Shoemaker, C. B. (2007). Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *Journal of Immunological Methods*, 324(1-2), 13-25. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2007.04.008>
- Macfarlane, M. G., y Knight, B. C. J. G. (1941). The biochemistry of bacterial toxins. *Biochemical Journal*, 35(8-9), 884-902.
- Mamani Cato, R. H. (2022). *Efecto de la época del año, edad de la madre y el mes de lactancia sobre la composición química del calostro y leche de la llama (Lama glama)*.
- Mancini, G., Carbonara, A. O., y Heremans, J. F. (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2(3), 235-254. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(65\)90004-2](https://doi.org/10.1016/0019-2791(65)90004-2)

- Mathur, A., Kay, C., Xue, Y., Pandey, A., Lee, J., Jing, W., Enosi Tuipulotu, D., Lo Pilato, J., Feng, S., Ngo, C., Zhao, A., Shen, C., Rug, M., Miosge, L. A., Atmosukarto, I. I., Price, J. D., Ali, S. A., Gardiner, E. E., Robertson, A. A., ... Man, S. M. (2023). *Clostridium perfringens* virulence factors are nonredundant activators of the NLRP3 inflammasome. *EMBO Reports*, 24(6), e54600. <https://doi.org/10.15252/embr.202254600>
- Maximiliano G, J., Maturrano H, L., Castillo D, H., Guzmán M, K., Pérez J, D., Luna E, L., Puray C, N., y Rosadio A, R. (2018). Concentraciones de inmunoglobulina G sérica en alpacas neonatas muertas por enterotoxemia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(2), 635-642. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14479>
- Medina, M. A., Fernández, F., Saad, S., Rebuffi, G., y Yapur, J. (2004). Inmunoglobulinas G de cadenas pesadas en la leche de los camélidos sudamericanos. *Mastozoología neotropical*, 11(1), 19-26.
- Miranda, C., y Rojo, M. (2010). *Clostridium perfringens*: Infecciones de piel y tejidos blandos. *Control Calidad SEIMC*, 10.
- Miyashiro, S., Nassar, A. F. C., Del Fava, C., Cabral, A. D., y Silva, M. (2007). *Clostridium perfringens* types A and D associated with enterotoxemia in an 18-month-old goat. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 13(4), 885-893. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992007000400017>
- Moro, M., y Guerrero, J. (1987). Enfermedades infecciosas y parasitarias de las alpacas. *Revista de Camélidos Sudamericanos UNMSM IVTA CICCSC CONCYTEC Lima Perú*.
- Morris, W. E., y Fernández-Miyakawa, M. E. (2009). Toxinas de *Clostridium perfringens*. *Rev. argent. microbiol*, 251-260.
- Morris, W. E., Venzano, A. J., Elizondo, A., Vilte, D. A., Mercado, E. C., y Fernandez-Miyakawa, M. E. (2011). Necrotic enteritis in young calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 23(2), 254-259. <https://doi.org/10.1177/104063871102300209>

- Möbller, M., Aichner, J., Müller, A., Albert, T., y Wittek, T. (2021). Concentrations of Fat, Protein, Lactose, Macro and Trace Minerals in Alpaca Colostrum and Milk at Different Lactation Stages. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 11(7), 1955. <https://doi.org/10.3390/ani11071955>
- Möbller, M., Rychli, K., Reichmann, V. M., Albert, T., y Wittek, T. (2022). Immunoglobulin G Concentrations in Alpaca Colostrum during the First Four Days after Parturition. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 12(2), 167. <https://doi.org/10.3390/ani12020167>
- Murray PR, Rosenthal KS, y Pfauer MA. (2021). *Microbiología médica* (9na ed.). Elsevier Health Sciences.
- Nagler, F. P. O. (1939). Observations on a Reaction between the Lethal Toxin of Cl. Welchii (Type A) and Human Serum. *British Journal of Experimental Pathology*, 20(6), 473-485.
- Oda, M., Terao, Y., Sakurai, J., y Nagahama, M. (2015). Membrane-Binding Mechanism of *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin. *Toxins*, 7(12), 5268-5275. <https://doi.org/10.3390/toxins7124880>
- Ohtani, K., y Shimizu, T. (2016). Regulation of Toxin Production in *Clostridium perfringens*. *Toxins*, 8(7), 207. <https://doi.org/10.3390/toxins8070207>
- Oliveira, R. D. C., De Oliveira Júnior, C. A., Alves, G. G., Assis, R. A., Silva, R. O. S., De Sousa Xavier, M. A., y Lobato, F. C. F. (2021). Cattle and goats' humoral response to vaccination with *Clostridium perfringens* type D purified ϵ toxoids. *Anaerobe*, 72, 102465. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102465>
- Ormachea V, E., Olarte D., U., Zanabria H, V., Melo A., M., Masias G., Y., Ormachea V, E., Olarte D., U., Zanabria H, V., Melo A., M., y Masias G., Y. (2021). Composición de la leche de alpaca Huacaya (Vicugna pacos) y de llama (Lama glama). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(1). <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i1.17800>
- Palacios E., C., Perales C., R., Chavera C., A., y López U., T. (2005). Caracterización anátomo-histopatológica de enteropatías causantes de mortalidad en crías de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 16(1), 34-40.

- Parraguez, V. H., Latorre, M. T. E., Ferrando, G., y Raggi, L. A. (2003). Milk composition in alpaca (lama pacos): Comparative study in two regions of Chile. *Archivos de Zootecnia*, 52(200), 431-439.
- Pérez, D., Maturrano, L., y Rosadio, R. (2012). Molecular genotyping and subtyping of *Clostridium perfringens* isolated from fatal enterotoxemia in alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(3), 272-279. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i3.909>
- Petit, L., Gibert, M., y Popoff, M. R. (1999). *Clostridium perfringens*: Toxinotype and genotype. *Trends in Microbiology*, 7(3), 104-110. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01430-9](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01430-9)
- Pezo-Carreón, D. (2010). *Geografía de la producción de alpacas por pequeños productores en Perú. En: Sanidad de alpacas en la etapa neonatal: Manual para estudiantes y profesionales de veterinaria*. Editorial Complutense. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=744133>
- Pezo-Carreón, D., Alarcón-Bayona, V., Franco-Febres, F., y Pacheco-Curie, J. (2018). Inducción Secretoria de IgG, con toxina de *Clostridium perfringens* Tipo A para la reducción de mortalidad por enterotoxemia en crías de Alpacas. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 5(2), 56-64.
- Pezo-Carreón, D., Franco, E., Franco, F., y Alarcón, V. (2014). *Sanidad en Camélidos. En: Manual técnico del alpaquero* (2da ed.). Soluciones Prácticas.
- Pezo-Carreón, D., Franco, E., García, W., y Leyva, V. (1999). Evaluación de una solución de antibióticos Ampicilina+Sulfato de Colistina y el consumo de calostro en la prevención neonatal de crías de alpacas. *II Congreso Mundial Sobre Camélidos Sudamericanos. Cusco Perú*, 139.
- Popoff, M. R. (2014). Clostridial pore-forming toxins: Powerful virulence factors. *Anaerobe*, 30, 220-238. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.05.014>
- Posthaus, H., Kittl, S., Tarek, B., y Bruggisser, J. (2020). *Clostridium perfringens* type C necrotic enteritis in pigs: Diagnosis, pathogenesis, and prevention. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American*

- Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 32(2), 203-212.
<https://doi.org/10.1177/1040638719900180>
- Prehn, N., Saez, S., y Arraigada, M. (1999). Estudios microbiológicos y clínicos de enterotoxemia por *Clostridium perfringens* en camélidos chilenos. *II Congreso Mundial Sobre Camélidos Sudamericanos. Cusco Perú*, 140.
- Quispe, M., Pacheco, R., Garnica, J., y Bravo, W. (1999). Proteínas totales e inmunoglobulinas G en la vida perinatal de la alpaca. *II Congreso Mundial Sobre Camélidos Sudamericanos. Cusco Perú*, 140.
- Ramírez, A. (1991). *En: Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos*. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe.
- Ramírez, A., y Ellis, R. (1988). *Nuevos conceptos sobre la enterotoxemia y Colibacilosis en alpacas*. *En: Revista de Camélidos Sudamericanos*. (Vol. 6). Centro de Información Científica de Camélidos Sudamericanos.
https://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/rcs/n06_1988/contenido.htm
- Ramírez, A., Franco, E., Pezo, D., y García, W. (1998). *Diagnóstico y control de enfermedades en camélidos sudamericanos: Vol. Pub. Tec. N° 34* (Programa RN/065 Ecología y desarrollo Sostenible del Sector de los Camélidos Andinos/Sub IVITA, Fondo Contravalor Perú Suiza). UNMSM, Centro de Investigación Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura. 1 - 17p.
- Riek, A., y Gerken, M. (2006). Changes in Llama (*Lama glama*) milk composition during lactation. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3484-3493.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72387-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72387-6)
- Rood, J. I., y Cole, S. T. (1991). Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiological Reviews*, 55(4), 621-648.
- Rosadio A., R., Maturrano H., L., Pérez J., D., Castillo D., H., Véliz A., Á., Luna E., L., Yaya L., K., y Londoño B., P. (2012). AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA PATOGÉNESIS Y PREVENCIÓN DE LA ENTEROTOXEMIA DE LAS ALPACAS. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(3), 251-260.
<https://doi.org/10.15381/rivep.v23i3.907>

- Rosadio A., R., Yaya L., K., Véliz A., Á., y Quispe, T. (2012). EFECTO PROTECTOR DE UNA VACUNA POLIVALENTE ANTICLOSTRIDIAL SOBRE LA MORTALIDAD NEONATAL EN ALPACAS. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(3), 299-306. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i3.912>
- Salvarani, F. M., Conceição, F. R., Cunha, C. E. P., Moreira, G. M. S. G., Pires, P. S., Silva, R. O. S., Alves, G. G., y Lobato, F. C. F. (2013). Vaccination with recombinant *Clostridium perfringens* toxoids α and β promotes elevated antepartum and passive humoral immunity in swine. *Vaccine*, 31(38), 4152-4155. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.06.094>
- Schogor, A., Glombowsky, P., Both, F., Danieli, B., Rigon, F., Reis, J. H., y Silva, A. S. D. (2020). Calidad del calostro bovino y su relación con la genética, el manejo, la fisiología y su congelación. *Revista MVZ Córdoba*, 25(1), 8.
- Schoos, V., Medina, M., Saad, S., y Nieuwenhove, C. (2008). Chemical and microbiological characteristics of Llama's (*Lama glama*) milk from Argentina. *Milchwissenschaft*, 63, 398-401.
- Schotte, U., Truyen, U., y Neubauer, H. (2004). Significance of β 2-toxigenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors—A review. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 51(10), 423-426. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00802.x>
- Shatursky, O., Bayles, R., Rogers, M., Jost, B. H., Songer, J. G., y Tweten, R. K. (2000). *Clostridium perfringens* β -toxin forms potential-dependent, cation-selective channels in lipid bilayers. *Infection and Immunity*, 68(10), 5546-5551. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.10.5546-5551.2000>
- Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuhara, S., y Hayashi, H. (2002). Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), 996-1001. <https://doi.org/10.1073/pnas.022493799>
- Smedley, J. G., Fisher, D. J., Sayeed, S., Chakrabarti, G., y McClane, B. A. (2004). The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. En S. G. Amara, E. Bamberg, M. P.

- Blaustein, H. Brunicke, R. Jahn, W. J. Lederer, A. Miyahima, H. Murer, S. Offermanns, N. Pfanner, G. Schultz, y M. Schweiger, *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Vol. 152, pp. 183-204). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s10254-004-0036-2>
- Songer, G., y Miskimins, D. (2005). Clostridial abomasitis in calves: Case report and review of the literature. *Anaerobe*, 11(5), 290-294. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2004.12.004>
- Songer, J. (1996). Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), 216-234.
- Songer, J. G., y Meer, R. R. (1996). Genotyping of *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals. *Anaerobe*, 2(4), 197-203. <https://doi.org/10.1006/anae.1996.0027>
- Stiles, B., Barth, G., Barth, H., y Popoff, M. (2013). *Clostridium perfringens* ϵ Toxin: A Malevolent Molecule for Animals and Man? *Toxins*, 5(11), 2138-2160. <https://doi.org/10.3390/toxins5112138>
- Thaysen-Andersen, M., Jørgensen, S. B., Wilhelmsen, E. S., Petersen, J. W., y Højrup, P. (2007). Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated tetanus toxin. *Vaccine*, 25(12), 2213-2227. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.12.033>
- Tizard, I. R. (2009). *Introducción a la inmunología veterinaria* (8va ed.). Elsevier Health Sciences.
- Uzal, F. A., y Kelly, W. R. (1998). Protection of goats against experimental enterotoxaemia by vaccination with *Clostridium perfringens* type D ϵ toxoid. *Veterinary Record*, 142(26), 722-725. <https://doi.org/10.1136/vr.142.26.722>
- Uzal, F. A., Vidal, J. E., McClane, B. A., y Gurjar, A. A. (2010). *Clostridium perfringens* Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases. *The Open Toxinology Journal*, 2, 24-42.



- Van Soest, B., Weber Nielsen, M., Moeser, A. J., Abuelo, A., y VandeHaar, M. J. (2022). Transition milk stimulates intestinal development of neonatal Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, *105*(8), 7011-7022. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21723>
- Veschi, J. L. A., Dutra, I. S., Alves, M. A. B., Perri, S. H. V., Zafalon, L. F., y Fernandez-Miyakawa, M. (2012). Serological evaluation of polyvalent commercial vaccines against enterotoxemia in goats. *ARS Veterinaria, Jaboticabal, SP*, *28*(4), 222-226.
- Wasiński, B. (2007). Contribution of *Clostridium perfringens* type A with $\beta 2$ toxin gene in aetiology of porcine enteric diseases. A case reports. *Bulletin- Veterinary Institute in Pulawy*, *51*, 509-513.
- Weaver, D. M., Tyler, J. W., Scott, M. A., Wallace, L. M., Marion, R. S., y Holle, J. M. (2000). Passive transfer of colostral immunoglobulin G in neonatal llamas and alpacas. *American Journal of Veterinary Research*, *61*(7), 738-741. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2000.61.738>
- Wernery, U. (2001). Camelid immunoglobulins and their importance for the new-born— A review. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, *48*(8), 561-568. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2001.00478.x>
- Williamson, E. D., y Titball, R. W. (1993). A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. *Vaccine*, *11*(12), 1253-1258. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(93\)90051-X](https://doi.org/10.1016/0264-410X(93)90051-X)
- Yaya L., K., y Rosadio A., R. (2005). Ensayo de tres programas de vacunación anticlostridial en alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, *16*(1), 49-55.

ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia

Interrogante	Hipótesis	Objetivos	Variable	Indicador	Método	Prueba
¿Cuál es el efecto de un anacultivo de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A sobre la producción de IgG en alpacas (<i>Vicugna pacos</i>) madres/crías y sobre la mortalidad de crías?	El uso de un anacultivo de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A incrementa la producción de IgG en madres/crías de alpacas (<i>Vicugna pacos</i>) y reduce la mortalidad.	Determinar el efecto de un anacultivo de <i>Clostridium perfringens</i> tipo A sobre la producción de IgG en madres/ crías de alpacas (<i>Vicugna pacos</i>) y reducir la mortalidad por enterotoxemia.	Independiente:			
			Anacultivo			
			Tiempo de gestación	Meses	Placas de inmunodifusión radial	t Student:
			Edad de Crías			
			Dependiente:			
			IgG en suero	Días	Fichas de registro de IgG de madres	Pareado e Independencia
			Mortalidad	mg/dL %	Fichas de registro de IgG de crías	Ji cuadrada

Anexo 2. Concentraciones de IgG de madres del grupo tratado con anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A

N° madre	Concentración de IgG (tratado) A	
	Concentración 9no mes gestación	Concentración 10mo mes gestación
1	2715.10	3868.72
2	2738.50	4234.17
3	2738.50	4227.57
4	2750.40	3834.12
5	2791.10	3273.44
6	2844.37	2610.46
7	2855.60	3336.04
8	2855.60	4011.74
9	2867.80	3847.92
10	2909.30	4248.77
11	3045.20	3882.42
12	3192.20	4291.18
13	3380.90	4134.96
14	3452.46	3875.32
15	3569.08	4276.98
16	3581.70	3882.42
17	3902.90	3483.67
18	4025.80	3741.30
19	4060.40	3608.48
20	4305.80	4248.77
Promedio	3229.14	3845.92

Anexo 3. Concentraciones de IgG de madres del grupo no tratado con anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A

N° madre	Concentración IgG (testigo) B	
	Concentración 9no mes gestación	Concentración 10mo mes gestación
1	4448.40	4375.59
2	3699.90	3821.11
3	3957.13	3984.33
4	3976.73	3887.82
5	2216.29	2275.89
6	3943.33	4025.80
7	2082.87	2151.08
8	3387.56	3273.44
9	4347.79	4234.17
10	2679.75	2750.40
11	3111.21	2754.86
12	4094.15	4163.76
13	2703.05	2807.97
14	3362.85	3387.56
15	3821.11	3821.11
16	2633.19	2662.55
17	3111.21	3186.02
18	3957.13	4060.40
19	2633.19	2691.84
20	2606.24	2633.19
Promedio	3338.65	3347.44

Anexo 4. Concentraciones de IgG de crías del grupo tratado con anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A

N° cría	Concentración de IgG (tratado) A	
	Concentración 5 días de nacida	Concentración 20 días de nacida
1	837.70	2093.87
2	419.70	1069.30
3	1069.30	1528.40
4	1786.22	2220.89
5	1327.30	1707.41
6	1239.00	1707.41
7	1887.84	2319.90
8	760.90	1344.20
9	1583.60	2307.60
10	1574.40	2210.68
11	760.90	1592.20
12	387.20	1119.20
13	1196.10	1968.55
14	1273.70	1707.41
15	1152.60	1958.65
16	1039.60	1707.41
17	1408.30	2264.29
18	794.90	1434.50
19	2082.87	2307.60
20	2622.59	2773.16
Promedio	1260.24	1867.13

Anexo 5. Concentraciones de IgG de crías del grupo no tratado con anacultivo de base de *Clostridium perfringens* tipo A

N° madre	Concentración IgG (testigo) B	
	Concentración 5 días de nacida	Concentración 20 días de nacida
1	1537.10	1690.20
2	987.50	560.20
3	1767.02	760.90
4	426.90	552.90
5	1425.90	837.70
6	994.40	626.00
7	1786.22	356.60
8	2082.87	1327.30
9	775.70	484.30
10	760.90	837.70
11	1444.70	1640.10
12	736.00	594.40
13	1223.00	915.10
14	872.30	439.60
15	1178.30	1335.80
16	970.20	701.70
17	979.10	484.30
18	814.80	539.70
19	1583.60	433.40
20	2622.06	1110.90
o Promedi	1248.43	811.44

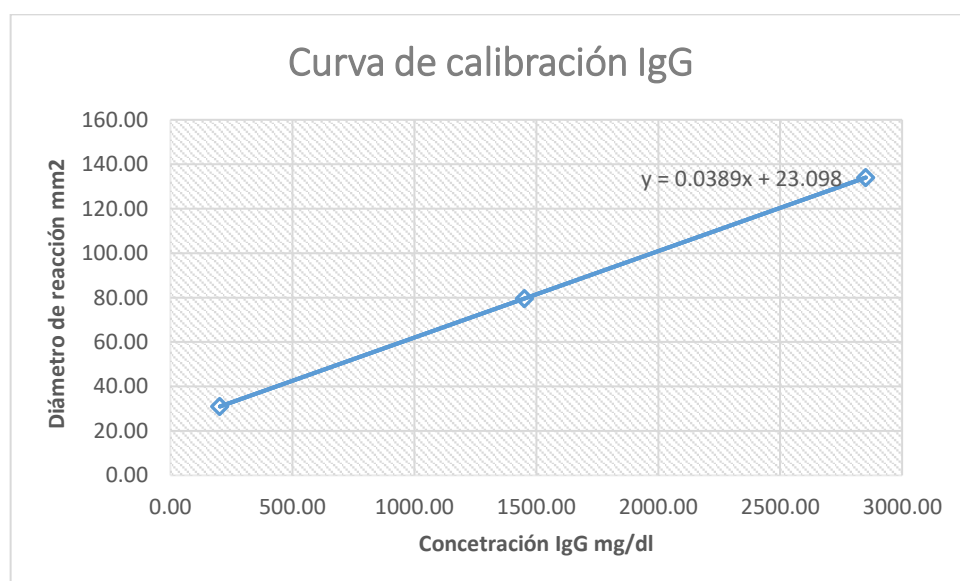
Anexo 6. Estadístico de mortalidad de crías Shi²

X ²	gl	α	Valor crítico
30.77	1	0.05	3.84

Anexo 7. Porcentaje de Crías que sobrevivieron y no sobrevivieron con anacultivo y sin anacultivo

Vacuna	Sobrevivió		
	Si	No	total
CT	97.33%	2.67%	100.00%
ST	75.33%	24.67%	100.00%
Total	86.33%	13.67%	100.00%

Anexo 8. Curva de calibración de concentraciones conocidas de IgG de 203 mg/dL, 1452 mg/dL y 2851 mg/dL.



Anexo 9. Selección de hembras preñadas de 9 meses de gestación



Anexo 10. Aislamiento de *Clostridium perfringens* tipo A



Anexo 11. Elaboración del anacultivo de *Clostridium perfringens* tipo A.



Anexo 12. Toma de muestras de alpacas preñadas



Anexo 13. Toma de muestras de crías de alpacas.



Anexo 14. Uso de la cadena de frío y vacunación de alpacas preñadas



Anexo 15. Vacunación de crías



Anexo 16. Materiales para determinación de la cuantificación de niveles de IgG mediante el Test inmunodifusión radial de Triple Farms Bellingham, WA.



Anexo 17. Crías de alpacas vacunadas (marca azul) y no vacunadas (marca roja)





Universidad Nacional
del Altiplano Puno



Vicerrectorado
de Investigación



Repositorio
Institucional

DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo Sergio Danilo Pezo Carreon _____,
identificado con DNI 24674530 en mi condición de egresado de:

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

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

“EFECTO DE UN ANACULTIVO DE *Clostridium perfringens* TIPO A SOBRE LOS NIVELES DE IgG EN MADRE/CRÍA Y LA MORTALIDAD NEONATAL EN ALPACAS (*Vicugna pacos*)”

Es un tema original.


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

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

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

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

Puno 5 de julio del 2024



FIRMA



Huella



Universidad Nacional
del Altiplano Puno



Vicerrectorado
de Investigación



Repositorio
Institucional

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

Por el presente documento, Yo Sergio Danilo Pezo Carreon _____,
identificado con DNI 24674530 en mi condición de egresado de:

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

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

“EFECTO DE UN ANACULTIVO DE *Clostridium perfringens* TIPO A SOBRE LOS NIVELES DE IgG
EN MADRE/CRÍA Y LA MORTALIDAD NEONATAL EN ALPACAS (*Vicugna pacos*)”

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

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

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

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


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

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

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

En señal de conformidad, suscribo el presente documento.

Puno 5 de julio del 2024


FIRMA



Huella