

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**CUANTIFICACIÓN DEL *Clostridium perfringens* Y SU RELACIÓN CON LA  
PRESENCIA DE *Eimeria spp.* EN CRÍAS DE ALPACAS SANAS Y  
MUERTAS CON SÍNDROME HEMORRÁGICO ENTEROTÓXICO EN EL CIP.  
LA RAYA**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**Bach. ANGELA MAYUMI CHIRINOS CANAHUIRE**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**PUNO – PERÚ**

**2017**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**TESIS**

**Cuantificación del *Clostridium perfringens* y su relación con la presencia de *Eimeria spp.* en crías de alpacas sanas y muertas con síndrome hemorrágico enterotoxico en el CIP. La Raya**

**PRESENTADA POR:**

Bach. ANGELA MAYUMI CHIRINOS CANAHUIRE

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA



**APROBADA POR:**


**PRESIDENTE**

:

  
Mg. Sc. José Luis MÁLAGA PUMARICA

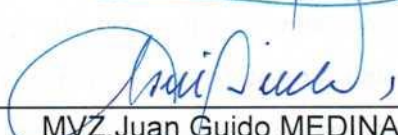
**PRIMER MIEMBRO**

:

  
Mg. Sc. Alberto SOTO QUISPE

**SEGUNDO MIEMBRO**

:

  
MVZ. Juan Guido MEDINA SUCA


**DIRECTOR**

:

  
Mg. Sc. Oscar Henry ESPEZUA FLORES

**ASESOR**

:

  
Mg. Sc. Oscar David OROS BUTRON

**Área** : Salud animal

**Tema** : Enfermedad infecciosa

## DEDICATORIA

### **A Dios:**

*Por haberme acompañado siempre en todo momento y permitirme llegar con salud y bienestar hasta este punto de mi vida, por ello y mucho más le dedico este trabajo al gran Padre Celestial.*

### **A mis Padres:**

*Justina Canahuire y Timoteo Chirinos, por haberme brindado siempre su apoyo incondicional, comprensión y amor en cada etapa de mi vida, permitiéndome así cumplir mis anhelos y metas.*

### **A mis Hermanos:**

*Nelly y Henry, por el apoyo emocional e incondicional que siempre me han brindado, en especial a mi hermana Nelly por los consejos y apoyo desinteresado que siempre me ha brindado en todo momento.*

### **Al Amor de mi Vida:**

*My little heart (A.F.), por motivarme y apoyarme en todo momento, por brindarme su amor puro y sincero, por ser mi fuente de felicidad y fuerza en los momentos que tal vez quise desfallecer y también por brindarme su valioso tiempo para que yo pueda seguir adelante con mis sueños, metas y anhelos.*

*Angela...*

## AGRADECIMIENTOS

- ✓ A mi madre Justina, por inculcarme buenos valores los cuales me ayudaron a llegar hasta esta etapa de mi vida y me fortalecieron para ser un buen eje en la sociedad.
- ✓ A mi padre Timoteo, por creer y confiar ciegamente en mí, en mis sueños, metas y anhelos.
- ✓ A mis hermanos, gracias por estar en todo momento para mí, por los consejos y apoyo incondicional.
- ✓ A my little heart (A.F.), gracias por acompañarme y apoyarme en todo momento.
- ✓ A la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, en especial a mi gloriosa Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por su plana docente que me inculcaron buenos conocimientos y saberes, para ser un buen profesional.
- ✓ Al Centro de Investigación y Producción La Raya, en especial al Director Dr. Guido Medina Suca por permitirme realizar esta investigación, por el apoyo de su personal administrativo y trabajadores.
- ✓ A mi Director de tesis Dr. Oscar Henry Espezu Flores por su amistad y apoyo durante la ejecución de este trabajo.
- ✓ A mi Asesor de tesis Dr. Oscar David Oros Butron por su amistad, consejos y apoyo durante la ejecución de este trabajo.
- ✓ A los miembros del Jurado por su acertada colaboración y exigencias para que este trabajo se culmine de la mejor forma.
- ✓ A mi amiga y hermana del alma Lizeth Escalante, por la maravillosa amistad, por el apoyo incondicional y por todo por cuanto hemos pasado, vivido y superado juntas, por todo eso y más, gracias.
- ✓ A todas aquellas personas que directa o indirectamente aportaron para poder llegar hasta este punto de mi vida y poder culminar este trabajo de investigación.

*Angela...*

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS .....	9
ÍNDICE DE TABLAS .....	10
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS.....	11
RESUMEN .....	12
ABSTRACT .....	13
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>12</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1. <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> .....	15
2.1.1. Morfología.....	15
2.1.2. Fisiología .....	16
2.1.3. Identificación.....	17
2.1.4. Tipificación.....	18
2.1.5. Toxinas principales .....	20
2.1.5.1. Toxina alfa ( $\alpha$ ).....	20
2.1.5.2. Toxina beta ( $\beta$ ).....	21
2.1.5.3. Toxina épsilon ( $\epsilon$ ).....	22
2.1.5.4. Toxina iota ( $\iota$ ).....	23
2.1.5.5. Enterotoxina del <i>C. perfringens</i> : CPE .....	24
2.1.5.6. Toxina beta 2 ( $\beta_2$ ).....	27
2.2. <i>EIMERIA SPP.</i> .....	28
2.2.1. Características morfológicas.....	30
2.2.2. Ciclo biológico de la eimeria .....	32
2.2.3. Patogenia.....	34
2.2.4. Lesiones .....	37
2.2.5. Signos clínicos.....	38
2.2.6. Epidemiología .....	39
2.2.6.1. Factores relacionados al parásito .....	39

2.2.6.2.	Factores relacionados al hospedero .....	40
2.2.7.	Prevalencia .....	43
2.3.	ENTEROTOXEMIA DE LAS ALPACAS .....	45
2.3.1.	Etiología.....	45
2.3.2.	Epidemiología .....	45
2.3.3.	Patogenia.....	47
2.3.4.	Signos clínicos.....	49
2.3.5.	Lesiones anatomopatológicas .....	50
2.3.6.	Lesiones histopatológicas.....	52
2.3.7.	Diagnóstico .....	54
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
3.1.	MEDIO EXPERIMENTAL .....	55
3.1.1.	Localización .....	55
3.1.2.	Características de la zona del trabajo.....	55
3.2.	MATERIAL EXPERIMENTAL .....	56
3.2.1.	Material experimental.....	56
3.2.2.	Materiales y equipos de trabajo .....	56
3.3.	METODOLOGÍA.....	58
3.3.1.	Recolección de muestras.....	58
3.3.2.	Aislamiento del <i>Clostridium perfringens</i> .....	60
3.3.3.	Cuantificación del <i>Clostridium perfringens</i> .....	60
3.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	61
3.4.1.	Tamaño de muestra.....	61
3.4.2.	Definición de variables.....	63
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>64</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>72</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>73</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>74</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>90</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Lesiones histopatológicas en intestino delgado de alpacas muertas por enterotoxemia. A, severa enteritis hemorrágica difusa aguda. B, severa enteritis necrótica hemorrágica difusa aguda (10X-Tinción H.E.). Tomado de Pérez, 2006.....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Eimerias notificadas en camélidos sudamericanos. ....	29
<b>Tabla 2.</b> Características biométricas y morfológicas de ooquistes de Camélidos Sudamericanos. ....	31
<b>Tabla 3.</b> Período prepatente y patente reportados en <i>Eimeria spp.</i> de CSA. (Palacios 2004). ....	33
<b>Tabla 4.</b> Cuantificación de <i>Clostridium perfringens</i> en el intestino delgado de crías de alpacas sanas desde la primera hasta la novena semana de edad. ....	64
<b>Tabla 5.</b> UFC/ml muestra de intestino de crías de alpaca aparentemente sanas. ....	100
<b>Tabla 6.</b> UFC/ml muestra de intestino de crías de alpaca muertas con síndrome enterotóxico hemorrágico. ....	101



**ÍNDICE DE ACRÓNIMOS**

- %** : Porcentaje
- μL** : Micro litros
- Km** : Kilómetro
- m.s.n.m.:** Metros sobre el nivel del mar
- mL** : Mililitros
- mm** : Milímetros
- s** : Segundos
- TSC** : Triptosa Sulfito Cicloserina
- UFC** : Unidades formadoras de colonias

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación y Producción “La Raya” de la Universidad Nacional Del Altiplano – Puno, con la finalidad de cuantificar el *Clostridium perfringens* y su relación con la presencia de *Eimeria spp.* en crías de alpacas aparentemente sanas desde la primera a novena semana de edad y crías muertas con síndrome enterotoxémico en el mismo periodo. Se utilizaron 45 animales de raza huacaya, distribuido en 9 grupos de 5 animales cada uno de diferente sexo, manejadas en condiciones similares. La toma de muestras del contenido intestinal de duodeno, yeyuno e íleon se realizó por laparotomía medial umbilico púbica y enterotomía. La cuantificación del *Clostridium perfringens* se hizo utilizando el medio de cultivo Triptosa Sulfito Cicloserina (TSC), la presencia de *Eimeria spp.* se determinó por medio de una biopsia de intestino de 4mm. La cantidad promedio del *Clostridium perfringens* desde la primera a novena semana de edad en duodeno fue 1.9 log UFC/ml, yeyuno 5.8 log UFC/ml e íleon log 8.4 UFC/ml, alcanzando niveles elevados a los 21 a 31 días de edad correspondientes a 4.2 log UFC/ml en duodeno, 6.2 log UFC/ml en yeyuno y 6.8 log UFC/ml en íleon ( $p=0.0014$ ), la colonización del *Clostridium perfringens* ocurrió a muy temprana edad desde la primera semana, variando durante las siguientes nueve semanas, encontrándose mayor presencia de *Clostridium perfringens* en íleon, yeyuno y finalizando en duodeno esto en crías aparentemente sanas; en el caso de crías muertas duodeno, íleon y finalmente yeyuno.

**Palabras Clave:** *Clostridium perfringens*, enterotoxemia, *Eimeria spp.*, duodeno, yeyuno, íleon.

**ABSTRACT**

The present work was carried out in the Research and Production Center "La Raya" of the National University of Altiplano - Puno, with the purpose of quantifying the *Clostridium perfringens* and its relation with the presence of *Eimeria spp.* in apparently healthy alpaca pups from the first to ninth week of age and dead pups with enterotoxémico syndrome in the same period. 45 animals of huacaya breed were used, distributed in 9 groups of 5 animals each of different sex, managed under similar conditions. Sampling of the intestinal contents of the duodenum, jejunum and ileum was performed by medial umbilical pubic laparotomy and enterotomy. The quantification of *Clostridium perfringens* was done using the culture medium Triptosa Sulfito Cicloserina (TSC), the presence of *Eimeria spp.* It was determined by means of a 4mm bowel biopsy. The average amount of *Clostridium perfringens* from the first to ninth week of age in the duodenum was 1.9 log CFU / ml, jejunum 5.8 log CFU / ml and ileum log 8.4 CFU / ml, reaching high levels at 21 to 31 days of age corresponding to 4.2 log CFU / ml in the duodenum, 6.2 log CFU / ml in the jejunum and 6.8 log CFU / ml in the ileum ( $p = 0.0014$ ), the colonization of the *Clostridium perfringens* occurred at an early age from the first week, varying during the following nine weeks , finding greater presence of Clostridium perfringes in the ileum, jejunum and ending in the duodenum in apparently healthy offspring; in the case of dead duodenum, ileum and finally jejunum.

**Key words:** *Clostridium perfringens*, enterotoxemia, *Eimeria spp.*, duodenum, jejunum, ileum.

## I. INTRODUCCIÓN

En el Perú la crianza de alpacas representa muchas veces el único medio de subsistencia económica para los pobladores altoandinos asociadas fundamentalmente a la producción de fibra. En tal sentido Perú, cuenta con el 90% de 2'900,900, calificándolo como el primer productor mundial de alpacas, y el departamento de Puno con el 58% (1'681,919) en la primera región productora de camélidos en nuestro país. (FAO, 2005).

En estos lugares, la explotación se lleva a cabo siguiendo sistemas productivos tradicionales, carentes de tecnologías adecuadas y repercutiendo en alta morbilidad y mortalidad, baja performance reproductiva y un pobre desarrollo productivo que inciden negativamente en la producción de carne y fibra, que en el caso de las enfermedades parasitarias se ha estimado en alpacas pérdidas en un millón y medio de dólares anuales. (Leguía y Casas, 1999).

La enterotoxemia es la enfermedad infecciosa más importante que afecta a las alpacas, debido a que ocasiona elevadas tasas de mortalidad neonatal de hasta 70% en centros de crianza alpaquera en el Perú (Ramírez et al., 1991); provocando la merma de su población e interferencia con los programas de mejoramiento genético. El agente causante de la enfermedad es el *Clostridium perfringens*, siendo el tipo A el principal involucrado. (Moro, 1987; Ramírez, 1991; Pérez, 2006).

El *C. perfringens* es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, móvil, formador de esporas y causante de una gran variedad de enfermedades en humanos y animales (Hatheway, 1990). La virulencia de este microorganismo está determinada por la presencia de sus cuatro potentes toxinas mayores: la

Cp-PLC (*C. perfringens* PhosphoLipase C) o toxina  $\alpha$ , la toxina  $\beta$ , la toxina  $\epsilon$  y la toxina  $\iota$ , las cuales son empleadas para la tipificación. (Petitet *al.*, 1999; Hatheway, 1990; Songer, 1996).

El *C. perfringens* tipo A, el cual solo posee la toxina mayor Cp-PLC, forma parte de la microbiota normal del intestino de animales y de los suelos, pero también se encuentra involucrado en diversas patologías (Songer, 1996; Hatheway, 1990). Dentro de ellas, la gangrena gaseosa ha sido la más estudiada, en donde la Cp-PLC es el factor de virulencia esencial e imprescindible para la patogénesis. (Stevens y Bryant, 2002; Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003 y Titball, 2005).

La Cp-PLC es una zinc-metalofosfolipasa que hidroliza exclusivamente la fosfatidilcolina y la esfingomielinina, responsable de la actividad letal, citotóxica, necrótica y hemorrágica (Titball et al., 1999). Posee un peso molecular de 43 kDa, un pI de 5.4 y para su actividad requiere la presencia de iones de  $Zn^{++}$  y  $Ca^{++}$  (Naylor et al., 1998 y Titball et al., 1999).

La Cp-PLC viene siendo postulada como el factor de virulencia clave en la patogénesis de muchas enteropatías causadas por *C. perfringens* tipo A no enterotoxigénico no  $\beta$ 2-toxigénico (subtipo cpe-cpb2-) como la enteritis necrótica en pollos (Engstrom et al., 2003 y Gholamiandekordi et al., 2006), en lechones (Kanakaraj et al., 1998), la enteritis hemorrágica en perros (Songer, 1996), la disentería hemorrágica en corderos (Gkiourtzidis et al., 2001), la enterotoxemia en corderos (Kalender et al., 2005), en venados (Embury-Hyatt et al., 2005) y en alpacas (Moro, 1987 y Pérez, 2006). Sin embargo, son pocos

los estudios realizados que demuestren su participación en los cuadros entéricos.

La eimeriosis o coccidiosis, afecta principalmente a crías de alpaca en formas subclínicas durante los primeros tres meses de vida con prevalencias fluctuantes entre 30 al 100% (Leguía y Casas, 1999). Sin embargo, el estudio de las Eimerias en alpacas en estos últimos años ha tomado cierta importancia pues participaría dentro del complejo diarreico neonatal y sería causante muchas veces de infecciones fatales particularmente en crías y registradas como muertas por “diarrea”, colibacilosis y aún asociadas a cuadros de enterotoxemia. (Ameghino y De Martini 1991, Rosadio *et al.*, 2010).

Por lo que, el objetivo del presente estudio fue conocer algunos factores de riesgo que influyen en la presentación de la enterotoxemia en crías de alpacas en el centro de investigación y producción (CIP-La Raya) de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, evaluando la presentación de *Clostridium perfringens* y la relación que pueda tener con la presencia de *Eimeria* spp. en crías de alpaca, considerando la edad, por ello se plantearon los siguientes objetivos:

Cuantificar el establecimiento del *Clostridium perfringens* en el intestino delgado de crías de alpacas sanas y muertas menores de dos meses.

Identificar la presencia de *Eimeria* spp en el intestino delgado de crías de alpacas sanas y muertas menores de dos meses por histopatología.

Determinar si existe una co-relación entre *Clostridium perfringens* y *Eimeria* spp.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

#### 2.1.1. Morfología

Microscópicamente *C. perfringens* se presenta como un bacilo Gram positivo grueso, recto, solitario o en pares, y rara vez en cadenas (Gillespie y Timoney, 1981). Las dimensiones de este microorganismo son de 0.8 – 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho por 4–8  $\mu\text{m}$  de largo (Gillespie y Timoney, 1981; Nicolet, 1986). La longitud varía de acuerdo con el estado de proliferación bacteriana, y a la composición iónica y nutricional del medio. Así, los cultivos jóvenes que proliferan con rapidez pueden tener forma casi cocoide o cúbica, mientras que los cultivos viejos evidencian células más elongadas. (Joclik y Willett, 1991).

Macroscópicamente desarrolla colonias de superficie larga, redonda, lisa, irregular y ligeramente opaca. Otros tipos de colonias observadas son aquellas con centro opaco, levantado y de borde plano transparente, que son radialmente estriadas. (Cruickshan, 1965).

A diferencia de otros clostridios patógenos, *C. perfringens* es inmóvil y puede presentar una cápsula en frotis directo de fluidos corporales y tejidos, pero no siempre son demostrables en cultivos (Cruickshan, 1965; Cowan, 1974). *C. perfringens* forma esporas, que pueden ser centrales o subterminales, de forma ovalada, y lo suficientemente pequeñas para no causar ensanchamiento del bacilo (Merchant y Packer, 1961; Dushesnes y Mainil, 2005). Además, algunas cepas de *C.*

*perfringens* varían en su habilidad para esporular, necesitando generalmente de medios especiales para hacerlo (Barach *et al.*, 1974).

### 2.1.2. Fisiología

El *C. perfringens* es un microorganismo anaerobio tolerante y puede sobrevivir, e incluso proliferar, con tensiones de oxígeno que son inhibitorios para otros clostridios, los cuales son anaerobios estrictos (Joclik y Willett, 1991). Los clostridios no producen catalasa y sólo sintetizan niveles bajos de superóxido dismutasa. Se cree que una de las causas que sean anaerobios es porque no tienen otra manera de liberarse de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup> que son tóxicos para ellos. (Madigan *et al.*, 2001).

El *C. perfringens* carece del sistema de citocromo y de un mecanismo para la fosforilación por transporte de electrones (ciclo del ácido tricarbóxico), obteniendo ATP sólo por fosforilación a nivel del sustrato (constituido básicamente por azúcares) (Madigan *et al.*, 2001). En las rutas de fermentación, el piruvato es convertido en acetyl-CoA por la piruvato ferredoxin oxidoreductasa, produciendo CO<sub>2</sub> y ferredoxina reducida. Los electrones de la ferredoxina reducida son transferidos a los protones por las hidrogenasas, resultando en la formación de moléculas de hidrógeno que son liberados de la célula junto con CO<sub>2</sub>. Esta típica producción de gases podría contribuir a la ventaja en el crecimiento y sobrevivencia en los tejidos del hospedador, generando un ambiente anaeróbico preferido. El piruvato, también, es convertido a lactato por la lactato deshidrogenasa, mientras la acetyl CoA es



convertida a etanol, acetato, y butirato a través de varias reacciones enzimáticas. (Madigan *et al*, 2001; Shimizu *et al.*, 2002).

El *C. perfringens* puede proliferar en un rango de pH de 5.5 a 8.0, una actividad acuosa mínima de 0.95, y un rango de temperatura entre 20 a 50° C, con un óptimo de 45° C, teniendo un tiempo de germinación tan corto como ocho minutos (Hatheway, 1990; Jocklik y Willett, 1991).

### 2.1.3. Identificación

El *C. perfringens* crece bajo condiciones de anaerobiosis, teniendo un óptimo desarrollo a 45°C. (Hatheway, 1990).

El crecimiento en caldo carne es rápido, con producción de ácido gas, teniendo el cultivo un olor hediondo y mostrando la carne sin digestión y enrojecida (Cruickshan, 1965). Las colonias de *C. perfringens* crecidas sobre medio agar sangre usualmente muestran una característica zona de doble hemolisis alrededor de la colonia: una zona interna clara (hemolisis completa o tipo P) debido a la toxina  $\delta$ ; y una zona externa nublosa (hemolisis incompleta o tipo A) debido a la toxina  $\alpha$ . En medio agar yema de huevo, las colonias son rodeadas por una ancha zona opaca circular, reconocida como la reacción de lecitinasa (reacción de Nagler) debido a la toxina  $\alpha$ . En los medios enriquecidos con leche, casi todas las cepas de *C. perfringens* producen una “Fermentación Tormentosa”, debido a la fermentación de la lactosa, producción de gas, y coagulación, pero no a la digestión de caseína. (Hatheway, 1990; Jocklik y Willett, 1991).

Las características bioquímicas complementarias son: motilidad negativa, licuefacción de gelatina, reducción de nitrato, producción de H<sub>2</sub>S, reducción de sulfito, indol negativo, lipasa negativo, ureasa negativo, catalasa y oxidasa negativo, y fermentación de una gran cantidad de azúcares (Merchant y Parker, 1961; Cruickshank, 1965; Cowan, 1974; Gillespie y Timone, 1981; Nicolet, 1986; Jockic y Willett, 1991).

#### 2.1.4. Tipificación

Las cepas de *C. perfringens* son clasificadas en cinco tipos (A, B, C, D y E) en base a la producción de sus cuatro toxinas letales (Cp-PLC,  $\beta$ ,  $\epsilon$  y  $\iota$ ) (Nicolet, 1986; Hatheway, 1990; Songer, 1996; Petit et al. 1999), todas las cuales son secretadas durante la fase de crecimiento exponencial (Petit et al., 1999). Así, las cepas tipo A producen Cp-PLC; las tipo B producen las toxinas Cp-PLC,  $\beta$  y  $\epsilon$ ; las cepas tipo C producen las toxinas Cp-PLC y  $\beta$ ; las cepas tipo D producen las toxinas Cp-PLC y  $\epsilon$ ; y las cepas tipo E producen las toxinas Cp-PLC y  $\iota$  (Nicolet, 1986; Hatheway, 1990; Songer, 1996; Petit et al. 1999).

El método de tipificación clásica se basa en las pruebas de neutralización toxina-antitoxina in vivo, empleando sobrenadantes de cultivos líquidos de *C. perfringens*, tratadas y no tratadas con tripsina. La tripsina es capaz de activar a las toxinas  $\epsilon$  y  $\iota$  e inactivar a la toxina  $\beta$ . Estos sobrenadantes son enfrentados con y sin antisuero de cada tipo, y después son inoculados vía intradérmica en cobayos o vía intraperitoneal en ratones para evidenciar la seroneutralización toxina-antitoxina (Cruickshank, 1965; Nicolet, 1986; Hatheway, 1990; Songer,

1996). La respuesta es notada después de 24 a 48 horas en cobayos (dermonecrosis) y a las 72 horas en ratones (letalidad) (Songer, 1996).

La correcta identificación de los tipos de *C. perfringens* es crítica para el desarrollo de estudios epidemiológicos y el establecimiento de efectivas medidas de prevención, incluyendo la vacunación (Petit *et al.*, 1999; Archambault *et al.*, 2002; Baums *et al.*, 2004). Por ello, las técnicas moleculares como PCR e hibridación de ADN han venido siendo desarrolladas para tipificar cepas de *C. perfringens* por ser mucho más confiables y rápidas en comparación con las clásicas pruebas de neutralización in vivo en ratones y cobayos (Petit *et al.*, 1999; Baums *et al.*, 2004). Entre ellos, principalmente protocolos de PCR Múltiple han sido elaborados para genotipificar (en base a la presencia de los genes *plc*, *cpb*, *etx* y *iap* [Cuadro 2.1]) y subtipificar (en base a la presencia de los genes *cpe* y *cpb2* [Cuadro 2.2]) cepas de *C. perfringens* (Songer y Meer, 1996; Yoo *et al.*, 1997; Kanakaraj *et al.*, 1998; Herholz *et al.*, 1999; Garmory *et al.*, 2000; Gkiourtzidis *et al.*, 2001; Stagnitta *et al.*, 2002; Bueschel *et al.*, 2003; Engstrom *et al.*, 2003; Waters *et al.*, 2003; Baums *et al.*, 2004; Gholamiandekhordi *et al.*, 2006). No obstante, otras técnicas moleculares como la ADN microarray (Al-Khaldi *et al.*, 2004a; Al-Khaldi *et al.*, 2004b), la ribotipificación (Schalch *et al.*, 2003), la electroforesis de gel en campo pulsado (Pulsed Field Gel Electroforesis; PFGE) (Nauerby *et al.*, 2003) y el análisis de repeticiones en tandem en número variable de múltiples locus (Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Análisis; MLVA) (Sawires y Songer, 2005) también han sido empleadas para estos fines.

Es importante mencionar que el genotipo sólo manifiesta el potencial de virulencia del microorganismo, puesto que el genotipo no siempre es expresado en fenotipo. (Petit *et al.*, 1999).

### 2.1.5. Toxinas principales

#### 2.1.5.1. Toxina alfa ( $\alpha$ )

La fosfolipasa C del *C. perfringens* (Cp-PLC) o la toxina  $\alpha$  fue la primera toxina bacteriana que mostró tener actividad enzimática. El gen codificante de la toxina  $\alpha$  (gen cpa) está presente en todos los tipos (A – E) de *C. perfringens*, y está situado cromosomalmente cerca al posible origen de replicación, entre dos perones rRNA. (Rood y Cole, 1991; Rood, 1998).

La toxina  $\alpha$  es una zinc-metalofosfolipasa que hidroliza exclusivamente fosfatidilcolina y esfingomielina, responsable de su actividad citotóxica, necrótica y hemorrágica (Songer, 1997; Rood, 1998; Titball *et al.*, 1999). Posee un peso molecular de 43 kDa y un pH isoelectrónico de 5.4 (Titball *et al.*, 1999), y para su actividad requiere la presencia de iones de  $Zn^{++}$  y  $Ca^{++}$  (Hatheway, 1990; Titball *et al.*, 1999).

La toxina  $\alpha$  está conformada por dos dominios: un dominio amino-terminal (dominio N) compuesto de hélices A y otro dominio carboxi-terminal (dominio C) compuesto de hojas P-plegadas. Estos dominios están unidos por una región común flexible (Rood, 1998; Titball *et al.*, 1999; Petit *et al.*, 1999; Dushesnes y Mainil, 2005). El dominio N contiene el sitio activo de fosfolipasa C esencial para todas las actividades;

mientras, el dominio C sugiere tener un rol clave en la interacción con la membrana fosfolipídica (Titball *et al.*, 1999).

La capa externa de la membrana eucariota es rica en fosfatidilcolina y esfingomielina, substratos preferidos de la toxina  $\alpha$ , que al ser hidrolizados generan diacilglicerol y ceramida, respectivamente (Titball *et al.*, 1999). El diacilglicerol es un importante segundo mensajero, activando proteinkinasa C (PKC), el cual activa fosfolipasas eucariotas, especialmente fosfolipasas A2, C y D. Los productos de fosfolipasa A2 proveen de substrato a la cascada de ácido araquidónico, resultando en la producción de tromboxanos, leucotrienos y prostaglandinas. La PKC también estimula la producción en las células endoteliales del factor activador plaquetario (PAF) y prostaciclina. Todo esto, resulta en constricción de vasos sanguíneos, incremento de la permeabilidad vascular, agregación plaquetaria y disfunción miocárdica, todos los cuales contribuyen a manifestaciones locales y sistémicas caracterizadas por un profundo shock y muerte (Songer, 1997; Titball *et al.*, 1999; Petit *et al.*, 1999; Stevens y Bryant, 2002).

#### **2.1.5.2. Toxina beta ( $\beta$ )**

La toxina  $\beta$  induce inflamación, necrosis de mucosa intestinal y letalidad en ratones (Songer, 1996). Posee un peso molecular entre 28 y 40 kDa (Hatheway, 1990; Rood y Cole, 1991; Smedley *et al.*, 2004; Dushesnes y Mainil, 2005) y un punto isoeléctrico (pI) de 5.6 (Hatheway, 1990). El gen codificante (gen *cpb*) se encuentra localizado en un plásmido (Smedley *et al.*, 2004; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999), el cual revela un ORF

codificante de un polipéptido de 336 aminoácidos que incluye una secuencia señal de 27 aminoácidos, la cual es cortada para producir una toxina activa (Smedley et al., 2004; Rood, 1998). La toxina  $\beta$  es secretada durante la última fase de crecimiento logarítmico (Smedley et al., 2004), es termolábil y sensible a las proteasas. (Songer, 1996; Rood y Cole, 1991; Smedley et al., 2004).

El mecanismo de acción de la toxina  $\beta$  es aún poco conocido. Posee una significativa homología a nivel de aminoácidos con la toxina  $\alpha$ , la toxina  $\gamma$  y la leucocidin de *Staphylococcus aureus*, las cuales oligomerizan y forman poros en las membranas celulares. Esto sugiere que la toxina  $\beta$  podría tener una actividad similar, resultando en la alteración de la permeabilidad de la membrana, y consecuente la muerte celular. (Rood y Cole, 1991; Petit et al., 1999; Smedley et al., 2004; Dushesnes y Mainil, 2005).

### **2.1.5.3. Toxina épsilon ( $\epsilon$ )**

La toxina  $\epsilon$  es una exotoxina con actividad letal, necrotizante y edematizante (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Rood, 1998; Petit et al., 1999; Smedley et al., 2004). El gen codificante de la toxina  $\epsilon$  (gen *etx*) es encontrado en un plásmido de gran tamaño (Songer, 1996; Rood y Cole, 1991; Rood, 1998; Petit et al., 1999; Smedley et al., 2004) y codifica una protoxina relativamente inactiva constituida de 311 aminoácidos y un peso molecular de 35.25 kDa (Hatheway, 1990). Esta protoxina es activada por la acción de las proteasas intestinales, tales como la tripsina y la quimiotripsina, y así como también por las proteasas propias

(toxina  $\lambda$ ) del *C. perfringens* (Rood y Cole, 1991; Rood, 1998; Smedley *et al.*, 2004), mediante la remoción proteolítica en los residuos 13 aminoterminal y 22 carboxiterminal (Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004) formando así una toxina activa de 283 aminoácidos. (Rood, 1998).

La toxina  $\epsilon$  activada interactúa con receptores (probablemente proteínas glicosiladas) en la membrana celular (Smedley *et al.*, 2004), uniéndose fuertemente (Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004) y formando un largo complejo de membrana (155 kDa) con una sola clase de proteínas de membrana (Petit *et al.*, 1999). Este largo complejo es un heptámero que actúa como un poro no selectivo, alterando la permeabilidad de la membrana celular. (Smedley *et al.*, 2004).

#### **2.1.5.4. Toxina iota (i)**

La toxina **i** posee actividad dermonecrótica, causa alteración de la permeabilidad y es letal en ratones (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Rood y Cole, 1991). Esta toxina está compuesta por dos componentes inmunológico y biológicamente distintos: un componente enzimático (Ia) y un componente de unión (Ib), siendo necesaria la presencia de ambos para la actividad citotóxica (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Duchesnes y Mainil, 2005).

La toxina **i** es codificada por dos genes ubicados en un plásmido (Petit *et al.*, 1999), agrupados y organizados en un operon (Duchesnes y Mainil, 2005). El componente Ia codificado por el gen *iap* (Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999), posee un peso molecular de 47.5 kDa (Hatheway, 1990; Rood, 1998), un pI de 5.2 (Hatheway, 1990) y tiene actividad ADP-

ribosiltransferasaactina específica (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Rood, 1998; Petit et al., 1999; Dushesnes y Mainil, 2005). El componente Ib, codificado por el gen *ibp* (Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999) posee un peso molecular de 100 kDa (Dushesnes y Mainil, 2005), un pI de 4.2 (Hatheway, 1990) y reconoce un receptor de superficie celular necesaria para la internalización de ambos componentes por endocitosis mediada por receptor y la translocación del componente la dentro del citoplasma (Petit *et al.*, 1999; Dushesnes y Mainil, 2005). Ambos componentes (Ia y Ib) son sintetizados durante la fase de crecimiento exponencial y secretados como protoxinas; que son proteolíticamente activados por remoción de un péptido N-terminal de 20 kDa en el componente Ib (80 kDa) y un residuo N-terminal de 9 a 11 aminoácidos en el componente Ia (Dushesnes y Mainil, 2005). El componente Ia actúa intracelularmente catalizando la ADP-ribosa, la cual unida al sitio de actina previene la nucleación y la polimerización de los monómeros de actina ADP-ribosiladas. El resultado es la despolimerización de los filamentos de actina y acumulación de actina en forma de polímeros. (Petit *et al.*, 1999; Dushesnes y Mainil, 2005).

#### **2.1.5.5 Enterotoxina del *C. perfringens*: CPE**

La enterotoxina del *C. perfringens* (*C. perfringens* enterotoxin; CPE) es una endotoxina sintetizada sólo durante la fase de esporulación, desencadena una significativa secreción de agua e iones en los enterocitos provocando descamación y acortamiento de las microvellosidades intestinales (Rood y Cole, 1991; Rood, 1998; Petit et al., 1999; McClane, 2000; Smedley et al., 2004), mas no posee actividad



necrotizante (Niilo, 1986). La CPE es producida por menos del 5% de la población de *C. perfringens* (Rood, 1998; Petit et al., 1999; Smedley et al., 2004), principalmente por cepas tipo A (Hatheway, 1990; Rood y Cole, 1991; Rood, 1998; Petit et al., 1999; Smedley et al., 2004), algunas cepas tipo C y D (Hatheway, 1990; Rood, 1998; Petit et al., 1999) y sólo pocas cepas tipo B y E (Hatheway, 1990; Petit et al., 1999).

El gen que codifica la CPE (gen *cpe*) puede ser encontrado o en una región variable del cromosoma (cepas asociadas a intoxicación de origen alimentario) o en un largo plásmido (cepas asociadas a gastroenteritis humana no asociadas a intoxicación de origen alimentario y enteritis en animales) (Songer, 1996; Rood, 1998; Petit et al., 1999; Miyamoto et al., 2002; Smedley et al., 2004). El gen *cpe* localizado cromosomalmente, es un transposon de 6.3 kb que comprende dos copias flanqueantes de secuencias de inserción IS1470 y una copia de IS1469 (Brynstad et al., 1997; Rood, 1998; Petit et al., 1999; Miyamoto et al., 2002); mientras que el localizado extracromosomalmente es encontrado en un gran plásmido de 100 a 120 kb, flanqueado por la secuencia de inserción IS1469 y, en algunas cepas, por otra secuencia de inserción, IS1151 (Rood, 1998; Petit et al., 1999; Miyamoto et al., 2002). El gen *cpe* plasmídico ha demostrado ser transferido por mecanismos conjugativos (Brynstad et al., 2001; Smedley et al., 2004).

La CPE consiste de un péptido de 309 aminoácidos con un peso molecular de 35 kDa (Hatheway, 1990; Rood y Cole, 1991; Rood, 1998; Smedley et al., 2004), un pI de 4.3 (Hatheway, 1990) y una solubilidad de 3.44 mg/ml (Rood y Cole, 1991). La CPE posee un dominio N-

terminal con actividad citotóxica y un dominio C-terminal con actividad de receptor (Rood y Cole, 1991; Songer, 1996; Takahashi et al., 2005). La tripsina y la quimiotripsina provocan la remoción proteolítica de 10 a 44 aminoácidos Nterminales, incrementando, en dos a tres veces, la actividad citotóxica. (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Rood, 1998).

La biosíntesis de CPE ocurre después de la activación del gen *cpe* por factores transcripcionales (SigE y SigK), los cuales también controlan los genes de esporulación (Rood y Cole, 1991; Zhao y Melville, 1998), acumulándose la CPE en grandes cantidades y formando cuerpos de inclusión en el compartimiento de la célula madre de la espora de *C. perfringens*, y siendo liberado al lumen intestinal sólo cuando la célula madre se lisa y libera su espora (Rood y Cole, 1991; Smedley et al., 2004).

La CPE se une a un receptor proteínaceo (posiblemente un claudin-4) presente en la membrana citoplasmática del borde en ribete del enterocito (McClane, 2000; Smedley et al., 2004). Después de la unión de la CPE con su receptor forman el “complejo pequeño” de 90 kDa, que se inserta en la membrana celular (Rood y Cole, 1991; Smedley et al., 2004). Este complejo per se no es suficiente para inducir citotoxicidad. Inmediatamente el “complejo pequeño” se une a otra proteína de membrana (70 kDa) para formar el “gran complejo”, complejo hidrofóbico de 160 kDa. El “gran complejo” aparentemente tiene propiedades tipo poro permitiendo el libre pasaje de pequeñas moléculas a través de la membrana, y conduciendo a la alteración de su permeabilidad. Finalmente, causa un colapso coloidosmótico y la muerte celular (Rood y

Cole, 1991; Songer, 1996; Petit et al., 1999; McClane, 2002; Smedley et al., 2004).

#### **2.1.5.6. Toxina beta 2 ( $\beta$ 2)**

La toxina  $\beta$ 2 ha sido recientemente descrita (Gibert *et al.*, 1997) y su gen *cpb2* ha sido asociado a la presentación de enfermedades entéricas en animales (Herholz *et al.*, 1999; Garmory *et al.*, 2000; Gkiourtzidis *et al.*, 2001; Bueschel *et al.*, 2003; Waters *et al.*, 2003; Engstrom *et al.*, 2003; Dray, 2004; Smedley *et al.*, 2004; Embury-Hyatt et al., 2005; Jost *et al.*, 2005; Boujon *et al.*, 2005).

El gen *cpb2* es localizado en un plásmido de 59 a 100 kb (Gibert et al., 1997; Rood, 1998; Petit et al., 1999; Smedley et al., 2004; Schotte et al., 2004) y su expresión es positivamente regulada por el sistema regulatorio transcripcional VirR/VirS (Schotte et al., 2004), alcanzando su máximo nivel durante la fase logarítmica tardía (Smedley et al., 2004). La presencia de este gen ha sido reportado en varios tipos de *C. perfringens* (Smedley et al., 2004; Schotte et al., 2004; Jost et al., 2005), mas su expresión no ha sido demostrado en todas. (Schotte *et al.*, 2004; Jost *et al.*, 2005).

El gen *cpb2* codifica un péptido de 31 kDa, el cual es procesado transcripcional a una toxina biológicamente activa de 28 kDa y un pl de 5.01 (Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004). La toxina  $\beta$ 2 posee actividad letal para ratones (dosis de 3  $\mu$ g) (Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004), actividad citotóxica para algunas líneas celulares (Gibert *et al.*, 1997; Smedley *et al.*, 2004) y también provoca necrosis

hemorrágica en mucosa intestinal en las pruebas de intestino ligado (Petit *et al.*, 1999; Schotte *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2004). Esta toxina es altamente susceptible a la acción proteolítica, así tratamientos con tripsina escinden a la toxina en dos péptidos (13 y 15 kDa), resultando en una completa pérdida de la citotoxicidad (Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004). La actividad específica de la toxina  $\beta 2$  aún no está totalmente clara, pero posiblemente sea la formación de un poro u otro mecanismo que conduzca a una disrupción de la membrana celular (Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004).

A pesar de su denominación, la toxina  $\beta 2$  no tiene significativa homología con la toxina  $\beta$  (15% de similitud de aminoácidos) (Gibert *et al.*, 1997; Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004) sólo existiendo una baja reacción inmunológica cruzada entre estas (Petit *et al.*, 1999; Schotte *et al.*, 2004).

## 2.2. ***EIMERIA SPP.***

El término coccidiosis es conocido para todos los miembros de la subclase Coccidia, es decir Eimeria, Isospora, Cryptosporidium, Toxoplasma, Sarcocystis, Neospora, Hammondia, Besnoitia y Frenkelia, es por eso que siguiendo los nombres de las nomenclaturas y para evitar confusiones en nombres, a esta parasitosis se le debe llamar eimeriosis. Guerrero en 1967a, reporta tres especies de Eimerias: E. lamae, E. alpaca y E. punoensis. Luego, ese mismo año, Guerrero *et al.*, 1967b, observó que de estas tres especies, E. lamae, se encuentra con mayor frecuencia en animales jóvenes y las otras dos en animales adultos. En

el mismo año, en un estudio parasitológico y anatomopatológico del intestino de una cría de alpaca de 5 meses de edad, se encontró en la mucosa regular cantidad de *Eimerias* spp., que podría tratarse de una nueva especie y cuyas dimensiones del ooquiste fueron de 80 a 90 micras de largo por 55 a 66 micras de ancho y presentaron micrópilo bastante notorio. (Guerrero *et al.*, 1967c).

En camélidos sudamericanos se han reportado hasta 6 especies de eimeria: *E. lamae*, *E. alpaca*, *E. punoensis* y *E. peruviana* que parasitan las células epiteliales del intestino delgado, mientras que *E. macusaniensis* se localiza en las glándulas cripticas, es decir, en las capas más profundas de la mucosa (Leguía y Casas, 1999, Rosadio y Ameghino, 1994).

**Tabla 1.** *Eimerias* notificadas en camélidos sudamericanos.

<b>Especie</b>	<b>Alpacas</b>	<b>Llamas</b>	<b>Guanacos</b>	<b>Vicuñas</b>
<i>E. alpaca</i>	+	+	+	+
<i>E. lamae</i>	+	+	+	+
<i>E. macusaniensis</i>	+	+	+	+
<i>E. peruviana</i>	-	+	-	-
<i>E. punoensis</i>	+	+	+	+
<i>E. ivitaensis</i>	+	-	-	-

Leguía, 1999; Castillo, 2006.

### 2.2.1. Características morfológicas

#### **Ooquiste.**

Las formas más comunes de los ooquistes son las esféricas, subesféricas y ovoides o elipsoidales y varían de tamaño según la forma y la especie. La pared de los ooquistes está formada por dos capas y generalmente es clara y transparente, con un contorno doble bien definido. Ciertas especies presentan un micrópilo en un extremo, que frecuentemente es puntiagudo. Este micrópilo puede estar recubierto por un casquete y en ocasiones puede proyectarse de la pared quística hacia el exterior una estructura cupiliforme que es el casquete polar. (Soulsby, 1987).

En el ooquiste esporulado presenta 4 esporocistos o esporoquistes conteniendo cada uno 2 esporozoitos. Los esporozoitos tienen un citoplasma granular y un núcleo central. (Soulsby, 1987).

**Tabla 2.** Características biométricas y morfológicas de ooquistes de Camélidos Sudamericanos.

Especie	Dimensiones (µm)	Forma	Características
<i>E. punoensis</i>	19.9 x 16.4 (17-22x14-18)	Elipsoidal a ovoide	Pared con dos membranas. Micrópilocon capsula micropilar aplanada. Presencia de granulo(s) polar(es). Cuerpo de Stieda apenas perceptible. Residuo de esporoquiste con pocos gránulos en forma compacta en el centro.
<i>E. alpaca</i>	24.1x19.6 (22-26x18-21)	Elipsoidal	Pared con dos membranas. Micrópilo con capsula micropilar aplanada. Presencia de granulo(s) polar (es). Cuerpo de Stieda apenas perceptible. Residuo de esporoquiste con pocos gránulos en forma compacta en el centro.
<i>E. peruviana</i>	31.8x19.3 (27.9- 37.5x18-22.5)	Ovoide	Pared con dos membranas. Sin micrópilo. Residuo de ooquiste en forma de una masa redondeada y compacta. Cuerpo de Stieda bien perceptible. Presencia de algunos gránulos en los esporozoitos.
<i>E. lamae</i>	35.6x24.5 (30-40x21-30)	Elipsoidal a ovoide	Pared con dos membranas. Micrópilo con capsula micropilar prominente. Presencia de granulo(s) polar (es). Cuerpo de Stieda bien perceptible. Residuo del esporoquiste con pocos gránulos en forma compacta en el centro.
<i>E. ivitaensis</i>	88.8x51.86 (88-98x49-59)	Elipsoidal truncado en forma de micrópilo	Pared con tres membranas. Membrana media gruesa, naturaleza granular y de color marrón oscuro. Ausencia de granulo polar. Esporoquistes con cuerpo de Stieda apenas perceptible y concentrado en la parte anterior. Residuo de esporoquiste irregularmente distribuido.
<i>E. macusaniensis</i>	93.6x67.4 (81-107x61- 80)	Ovoide piriforme	Pared con tres membranas. Membrana gruesa y granular de color marrón oscuro. Esporoquistes con cuerpo de Stieda apenas perceptible y distribuidos homogéneamente. Residuo del esporoquiste en forma de masa regular en el centro.

Leguia, 1999.

### 2.2.2.Ciclo biológico de la eimeria

El ciclo de vida de las eimerias es similar en todas las especies, con excepción de la duración de la misma y algunas particularidades. Se describen tres fases: esporogonia, esquizogonia y gametogonia (Fowler, 1998). Es de ciclo directo y altamente específico para cada especie animal así por ejemplo las eimerias de los camélidos no pueden infectar a los ovinos u otra especie animal. (Hidalgo y Cordero, 1999).

Se ha estudiado parcialmente el ciclo de *E. lamae* y *E. macusaniensis*. Los camélidos sudamericanos (CSA) se infectan al ingerir pasto o agua contaminados con ooquistes esporulados conteniendo ocho (8) esporozoitos, los cuales, luego de liberados en el estómago, penetran las células epiteliales o las glándulas cripticas del intestino (Leguía y Casas 1999), ya sea en cualquiera de las 2 localizaciones el esporozoíto comienza a redondearse lo que da inicio a la reproducción asexual o esquizogonia. En muchas especies, el desarrollo tiene lugar por encima del núcleo de la célula epitelial; en unas pocas por debajo de él y en algunas especies de bovinos (*E. alabanensis*) y ovinos (*E. ashata* y *E. intricata*) la localización es intranuclear. (Soulsby, 1987).

En el caso de las eimerias de la alpaca los períodos patentes, como se mencionó anteriormente es variable de acuerdo a la especie (Cuadro 3).

Existe, sin embargo, pruebas de que el ciclo de ciertas especies de *Eimeria* es más complicado, algunos merozoítos pueden abandonar las células epiteliales y penetrar en otras células del intestino o tejidos adyacentes. En el caso de la *Eimerias* de bovinos, *E. bovis* se han



hallado esquizontes en capilares linfáticos de las vellosidades intestinales, gamontes de *E. aurburnesis* en células subepiteliales y esquizontes de *E. zuernii* en la lámina propia, en ovinos se han encontrado estadíos extraintestinales de esquizontes en ganglios mesentéricos de *E. bakuensis* (Hidalgo y Cordero, 1999). En el caso de *E. macusaniensis*, también posee localización extraepitelial: quilíferos y lámina propia en el intestino delgado y en algunos casos los microgamontes también se localizan en quilíferos y lámina propia del ciego y colon. (Palacios, 2004).

Estas localizaciones tendrían la finalidad de evadir la respuesta inmune local o la acción de la quimioterapia y actuar como reservorios que puedan reanudar el desarrollo cuando, por ejemplo, el sistema inmune del hospedador se debilita, lo cual podría explicar la presencia de brotes repentinos de coccidiosis en hospedadores inmunodeprimidos o estresados, que se encuentran en alojamientos relativamente higiénicos (Hidalgo y Cordero, 1999; Leguía y Casas, 1999).

**Tabla 3.** Período prepatente y patente reportados en *Eimeria* spp. de CSA. (Palacios 2004).

ESPECIE	PERIODO PREPATE	PERIODO PATE	REFERENCIA
<i>E. punoensis</i>	9 días	7 días	Yrei, 1974
	10 días	24 días	Foreyt y Longerquist, 1992
<i>E. alpaca</i>	11 días	9 días	Guillermo, 1975
	16 - 18 días	9 días	Foreyt y Longerquist, 1992
<i>E. lamae</i>	15 - 16 días	10 días	Guerrero et al., 1970
<i>E. macusaniensis</i>	33 días	48 días	Guerrero et al., 1972
	32 - 36 días	48 días	Rohbeck et al., 2003
	37 - 40 días	20 - 23 días	

### 2.2.3. Patogenia

En otras especies de *Eimeria* spp. se ha realizado la descripción de la patogenia, la cual es originada por la destrucción de las células epiteliales en diferentes partes del intestino, al generar una acción traumática, tal es el caso de *E. necatrix* que afecta a los pollos, van Doorninck y Becker (1957) han visto que inicialmente, los esporozoitos invaden el epitelio intestinal en la punta de las microvellosidades, y de allí son ingeridos por macrófagos y transportados por ellos a través de la lámina propia de las vellosidades, hasta alcanzar el epitelio de las profundidades de las glándulas de Lieberkühn, lo cual podría suceder en las eimerias reportadas en alpacas que se localizan en esta zona. A este nivel, abandonan a los macrófagos y entran en las células epiteliales, para experimentar su desarrollo posterior. Hidalgo y Cordero, 1999 mencionan que dicha alteración o destrucción va a depender del número de ooquistes ingeridos, potencial de reproducción de las especies implicadas, efecto de la sobrepoblación o multitudinario (crowding factor) y la localización exacta del parásito además agregan que las eimerias que se desarrollan subepitelialmente provocan lesiones más graves de tipo hemorrágica que las que parasitan las células epiteliales. Además, los esporozoitos apenas generan acción traumática, sin embargo; trofozoitos, esquizontes y gametos se alimentan del citoplasma de la célula y ocasionan ruptura de las células invadidas. Los esquizontes destruyen el revestimiento epitelial, a veces en amplios tramos entéricos, dejando al descubierto la propia de la mucosa, en eimerias que afectan a ovinos se ha calculado que la infección a partir de un solo ooquiste

puede originar 107 gametocitos y esto representa la destrucción de unos 2mm de intestino delgado. (Hidalgo y Cordero, 1999).

Las eimerias pueden atacar las células epiteliales de la vellosidad o de las criptas y en algunos casos una sola especie de eimeria, dependiendo de la fase de su desarrollo, puede afectar ambas poblaciones celulares (Hidalgo y Cordero, 1999). En alpacas, la *E. lamae*, *E. alpaca*, *E. punoensis*, parasitan las células epiteliales de la vellosidad intestinal, siendo la más patógena *E. lamae* (Guerrero *et al.*, 1970b) donde el número de generaciones de merontes y gamontes provocan lesiones necróticas en el ápice de las vellosidades (Guerrero *et al.*, 1970a), *E. macusaniensis* parasita las criptas de Lieberkuhn causando lisis y necrosis de la misma (Guerrero *et al.*, 1967; Rosadio y Ameghino, 1990), *E. ivitaensis*, también se ubica en las criptas y sus formas endógenas causan necrosis y regeneración celular (Palacios, 2004) y es muy probable que a medida que las células se van desprendiendo del extremo apical de las vellosidades, estas no serán sustituidas por nuevas células procedentes de la cripta debido a la afección parasitaria a la que están siendo sujetas. (Palacios, 2004).

La continua pérdida celular determina una hiperplasia del epitelio de la cripta de Lieberkuhn las cuales en cuestión de días reconstruirán la vellosidad dañada (Jubb *et al.*, 1990). Algunas lesiones peculiares de ciertas eimerias como es el caso de *E. bakuensis* en ovinos, ejerce acción mitógena sobre el epitelio de las criptas, lo que explica la formación de estructuras papiloides, sin causar destrucción importante de las células de las criptas y sin consecuencias clínicas notables, lo que

sugiere una buena adaptación de la especie a su hospedador. (Hidalgo y Cordero, 1999).

Las infecciones por una sola especie de eimeria son muy raras, por lo que todas las alteraciones son consecuencia de la presencia de dos o más especies (Guerrero *et al.*, 1970b, Hidalgo y Cordero, 1999). Se ha observado bajo condiciones de campo, que la asociación más patógena la constituye E. lamae y E. macusaniensis, en donde la primera parasita y destruye los enterocitos de las vellosidades las cuales no podrán ser reemplazadas por nuevas células procedentes de la cripta debido a la necrosis y atrofia producida por las formas endógenas de E. macusaniensis (Guerrero *et al.* 1970b). Todas estas alteraciones conllevan a que se genere la malabsorción, debido a que la capacidad digestiva y de absorción de la de la mucosa está reducida a causa de la disminución de la superficie de las vellosidades y del número de células absorbentes, así como la menor capacidad de las células restantes, cuya diferenciación es incompleta. El contenido digestivo y las secreciones digestivas normales no serán absorbidas y sufren degradación bacteriana y fermentación en el intestino. Esta degradación determinará en un aumento de la osmolaridad del contenido intestinal, con lo que el líquido es atraído hacia la luz intestinal por el gradiente osmótico resultante, así como pérdidas significativas de Na, K, Cl, HCO<sub>3</sub> lo que conduce al final en una acidosis (Hidalgo y Cordero, 1999). Debido a las alteraciones descritas en el intestino delgado, el contenido que pasa por el intestino grueso es cualitativamente anormal y su volumen sobrepasaría la capacidad de absorción de este tramo

intestinal; de tal manera que gran parte del contenido digestivo fermentado y los líquidos producidos por este son eliminados en forma de heces acuosas características de la enfermedad (Hidalgo y Cordero, 1999).

Todo el cuadro mencionado anteriormente se puede complicar cuando existen infecciones bacterianas que aprovechan el daño causado en la mucosa intestinal dejando puertas de entrada abiertas en las lesiones, como sucede en el caso de la enterotoxemia, lo cual ha sido observado por diversos investigadores (Londoño et al., 2006; Palacios, 2006; Pérez, 2006), quienes han reportado la asociación patológica de la presencia de estadios (sexuales, asexuales y esporogónicos) de eimerias en casos fatales de enterotoxemia.

#### **2.2.4.Lesiones**

Las lesiones macroscópicas se concentran en el intestino delgado, principalmente en el íleon para el caso de *E. lamae*, con formaciones hemorrágicas de aspecto nodular en la serosa, pero en el extremo distal las hemorragias se tornan petequiales. La mucosa se muestra severamente congestionada y engrosada en la región del íleon (Guerrero et al.1970b). En el caso de *E. macusaniensis* las aéreas de congestión y hemorragia circunscritas se concentran en el yeyuno e íleon, llegando a observarse micronodulaciones blanquecinas que se proyectan hacia la válvula íleocecal. (Rosadio y Ameghino, 1989, 1990, 1994).

Las lesiones microscópicas descritas para *E. macusaniensis* consisten en el acortamiento y fusión multifocal de vellosidades, presencia masiva de diferentes estadios protozoales, observándose destrucción del epitelio de revestimiento de la cripta, con lesiones necróticas moderadas a severas (Rosadio y Ameghino, 1989, 1990, 1994). Se caracterizan por edema, infiltración eosinofílica y mononuclear y necrosis epitelial tanto en vellosidades como de criptas (dependiendo de la especie). En el caso de *E. macusaniensis* las lesiones más severas se localizan en yeyuno medio y yeyuno final e íleon, parasita el ciego y parte del colon ascendente, además para *E. ivitaensis* en el yeyuno final e íleon. (Palacios, 2004).

Se ha identificado estadios (sexuales y asexuales) pertenecientes a *E. macusaniensis*, ubicados profundamente en la mucosa intestinal, asociada a *Clostridium perfringens*, observándose cambios patológicos caracterizados por severa enteritis necrótica difusa aguda 42.9% (3/7), severa enteritis necrótica supurativa difusa aguda en 28.5%(2/7), severa enteritis no supurativa difusa aguda en 14.3% (1/7)y severa enteritis hemorrágica difusa aguda 14.3% (1/7). (Pérez, 2006).

#### **2.2.5. Signos clínicos**

Al infectar experimentalmente a una cría de alpaca con cien (100) y otra con cien mil (1000,000) ooquistes esporulados de *E. lamae*, en el primer caso no se observó presencia de signos clínicos y en el segundo el animal murió el mismo día que el parásito se hizo patente después de haber presentado signos como diarrea, deshidratación, anorexia y

anemia (Guerrero et al.1970b). Sin embargo, en la infección natural por *Eimeria* existe desde muy temprana edad, a los 15 días de nacidos (Melo y Hurtado, 1985). Los signos observados son diarrea, que algunas veces puede faltar sobre todo al inicio de la infección, fibra quebradiza, caquexia, deshidratación, cólico. (Guerrero y Leguía, 1987).

Se ha observado, bajo condiciones de campo y en forma experimental, que la *E. lamae* y *E. macusaniensis* constituyen una asociación altamente patógena, ya que la primera destruye el epitelio intestinal y la segunda causa atrofia y necrosis de las glándulas cripticas. De acuerdo a la intensidad de la infección puede producirse retardo en la capacidad regenerativa y/o curativa del epitelio, o la pérdida completa de su capacidad funcional, predisponiendo al animal a morir por deshidratación, acidosis o invasión bacteriana secundaria. El raspado de áreas lesionadas, examinado al microscopio, permite detectar abundantes estadios endógenos del parásito. La coccidiosis se presenta, generalmente, en forma subclínica, con o sin diarreas ligeras. En casos clínicos, el signo más característico es una diarrea ligeramente sanguinolenta y fétida, deshidratación, disminución del apetito, abundante sed, cólicos, pérdida de peso, debilidad, postración y muerte. (Leguía, 1999).

## **2.2.6.Epidemiología**

### **2.2.6.1. Factores relacionados al parásito**

Los CSA comparten la misma fauna parasitaria pudiendo cualquier especie de *Eimeria* spp. afecta tanto a la alpaca, llama, guanaco o

vicuña (Guerrero, et al., 1970). Sin embargo, solamente *E. peruviana* que afecta a llamas ha demostrado tener especificidad por su hospedero como se vio en varios estudios de prevalencia llevados a cabo en crianzas asociadas entre llamas y alpacas (Pelayo, 1973). En alpacas se ha observado en infecciones naturales, que la asociación entre *E. lamae* y *E. macusaniensis* constituye la mayor patogenicidad.

#### **2.2.6.2. Factores relacionados al hospedero**

Las crías de alpacas son muy susceptibles a la eimeriosis clínica, se ha observado que pueden infectarse a partir de la segunda semana incrementando significativamente la eliminación de ooquistes en las ocho semanas siguientes (Melo y Hurtado, 1985; Rojas, 1990). Los adultos son considerados como portadores asintomáticos que van a ir eliminando los ooquistes junto con las heces para infestar pasturas (Guerrero y Leguía, 1987). La gravedad de la infección dependerá de los ooquistes ingeridos. Si son pocos no presentan signos clínicos y las infecciones reiteradas originan infección sin enfermedad. La ingestión de gran cantidad de ooquistes puede causar enfermedad y muerte incluso en adultos (Hidalgo y Cordero, 1990). Los animales que logran recuperarse de la infección desarrollan inmunidad contra las mismas especies infectantes, pero no una inmunidad absoluta y los animales adultos recuperados se reinfectan continuamente, aunque en menor grado y adquieren una infección leve. La inmunidad puede bajar en condiciones de estrés y provocar la enfermedad (Guerrero y Leguía, 1987).



Si bien la coccidiosis es generalmente un problema de animales jóvenes criados en confinamiento, en el caso particular de los CSA explotados en forma extensiva, la enfermedad puede presentarse por los siguientes factores:

- **Introducción de crías altamente susceptibles a ambientes contaminados.**

La parición y empadre se realiza todos los años en los mismos pastizales; esto produce una acumulación gradual de ooquistes, a lo que se adiciona la presencia de letrinas que proporcionan un microclima favorable para el desarrollo y viabilidad de ooquistes. Por otro lado, el estrés continuo de la parición, lactación y empadre ocasionan una pérdida temporal de la inmunidad de las madres, que se traduce en un incremento en la eliminación de ooquistes y una mayor susceptibilidad del animal a las reinfecciones.

Si consideramos que la parición abarca un periodo variable de tiempo (enero a marzo en explotaciones organizadas y diciembre a abril en pequeños criadores) el riesgo de infecciones masivas será mayor en los animales que nacen en los últimos meses de la parición. Se ha observado que las crías pueden infectarse a partir de la segunda semana de edad, incrementándose significativamente la eliminación de ooquistes en las 8 semanas siguientes. (Melo y Hurtado, 1985; Rojas, 1990). Resulta evidente que las crías, que, durante las seis primeras semanas, adquieran infecciones subclínicas, pero actúan como multiplicadoras, eliminando millones de ooquistes, que incrementan

peligrosamente el potencial de infección de las pasturas, pudiéndose producir brotes clínicos en las crías que nacen a mediados o al final de la parición.

- **Estrés del destete** que se realiza al final de la época seca, en la cual los pastos son deficientes en cantidad y calidad, presentándose la enfermedad por estrés nutricional.
- **Concentración de animales en espacios reducidos** durante ciertas faenas como esquila, dosificación, baños, etc., que producen no solo un estrés social, sino que favorecen una mayor contaminación de pastizales (Leguía y Casas, 1999). Animales infectados en forma subclínica o clínica desarrollan una inmunidad relativa, la cual es específica para cada especie de coccidia. (Leguía, 1999).

### Diagnóstico

Se puede tomar como base:

- Signos clínicos.
- Antecedentes epidemiológicos.
- Examen parasitológicos de heces. Hallazgo de abundante cantidad de ooquistes no esporulados, los cuales, pueden estar ausentes al inicio de la enfermedad, es decir durante la fase asexual.

- Examen post mortem. Observación y evaluación de las lesiones anatomopatológicas.

Es importante realizar un diagnóstico diferencial con la enterotoxemia que puede producir hasta el 50% de mortalidad en crías, generalmente en buenas condiciones de carnes, entre la primera y segunda semana post nacimiento, a diferencia de la coccidiosis que se presenta gradualmente entre las 4 a 8 semanas de edad y los animales que mueren muestran síntomas de deshidratación y desnutrición (Leguía, 1999).

### **2.2.7 Prevalencia**

Aun cuando se han notificado altas tasas de prevalencia (30% al 100%) en alpacas (Guerrero et al., 1970a), llamas (Pelayo, 1973), guanacos (Hurtado et al., 1985) y vicuñas (Chávez *et al.*, 1982) y con cierta frecuencia se informa brotes clínicos (Leguía y Casas, 1999), se desconoce la real importancia de la coccidiosis en el complejo entérico neonatal y mortalidad de crías.

Guerrero et al., en 1970c evaluó 160 muestras fecales de alpacas provenientes de Puno y Cuzco, hallando un 58% de animales positivos a coccidias, encontrándose las siguientes especies: *E. macusaniensis* 25%, *E. punoensis* 20%, *E. alpaca* 16.9% y *E. lamae* 15.6%. La mayor prevalencia de coccidias correspondió a crías menores de 2 meses de edad (90%) y con carga de 1 016 ooquistes por gramos de heces; considerándose las especies más importantes *E. lamae* y *E. macusaniensis*.

Melo y Hurtado (1985), al evaluar 78 crías de alpacas para determinar la infección parasitaria desde el nacimiento hasta el destete, hallaron que la infección parasitaria ocurre a partir de los 16 días de edad aproximadamente y la mayor infestación se observó entre los 40 y 91 días de edad. Las primeras coccidias halladas fueron *E. lamae* y *E. alpaca* seguido luego por *E. punoensis* y *E. macusaniensis*. La coccidia que ocasionó mayor carga parasitaria fueron *E. lamae* seguido de *E. alpaca*, *E. punoensis* y *E. macusaniensis* los mismos que disminuyeron conforme avanzaba la edad.

De la evaluación de 391 crías de alpacas procedentes de 15 comunidades de Puno, se obtuvo una prevalencia de 19.43% para *E. punoensis*, 14.26 % para *E. alpaca* y 12.65% de *E. macusaniensis* (Martínez, 1992).

De un estudio realizado a 84 crías de alpacas, en el departamento de Junín, se halló que el 90% de animales resultaron positivos a una o más especies de Eimerias. La prevalencia por especies fue: 82% para *E. punoensis*, 73% *E. alpaca*, 65% *E. lamae* y 11% *E. macusaniensis*. Se encontraron infecciones mixtas hasta 4 especies de Eimerias, siendo la más frecuente formada por 3 especies *E. punoensis* – *E. alpaca* - *E. lamae* (42%) y finalmente la *E. lamae* fue la especie que obtuvo la mayor carga parasitaria con 6 629 ooquistes, seguida de *E. alpaca* 1 141, *E. punoensis* 1 045 y *E. macusaniensis* 7. (Romero, 1992).

## 2.3. ENTEROTOXEMIA DE LAS ALPACAS

### 2.3.1. Etiología

La enterotoxemia de las alpacas también conocida como diarrea bacilar o enfermedad de Moro es causada por las toxinas de *C. perfringens* (Moro, 1971; Moro, 1987), siendo mayormente el tipo A el más involucrado (Moro, 1971; Ramírez et al., 1985; Ramírez, 1987; Moro, 1987; Ramírez, 1988; Ramírez y Ellis, 1988; Ramírez, 1989a; Ramírez, 1989b), aunque se reporta también el tipo C (Moro, 1971; Moro, 1987) en la sierra sur del Perú (Moro, 1971; Moro, 1987). Mientras que en Chile y en EEUU han sido reportados los tipos A y B, (Prehn et al., 1999) y los tipos A (Fowler, 1998), C (Fowler, 1998; Whitehead y Anderson, 2005) y, posiblemente, el D (Fowler, 1998), respectivamente, en casos de enterotoxemia en alpacas.

### 2.3.2. Epidemiología

La enterotoxemia de las alpacas se presenta en forma de brotes epizooticos durante la época de parición, y está relacionada a factores climáticos (principalmente abundantes lluvias) y deficiencias en el manejo e higiene del hato (Moro, 1987; Ramírez et al., 1985; Ramírez, 1991; Ameghino y De Martini, 1991; Bustinza, 2000).

La enfermedad ocasiona elevadas tasas de mortalidad neonatal en alpacas. En pequeños (comunidades alpaqueras) y grandes (centros experimentales y grandes empresas alpaqueras) hatos alpaqueros, reportándose tasas anuales de mortalidad neonatal por la enfermedad de 0.6 a 48.9% en la estación experimental “La Raya” en Puno durante

1973-1979 (Ramírez et al., 1985), de 5.1 a 25.8% en doce fundos alpaqueros de Puno en 1974 (Bustinza, 2000), y un estimado de 70% en medianos criadores alpaqueros en Cusco en 1980 (Ramírez *et al.*, 1985).

La enterotoxemia afecta principalmente a las crías de alpacas entre los 3 a 80 días de edad, siendo más vulnerables entre las 2 a 3 semanas de edad (Moro, 1987; Ramírez et al., 1985; Ameghino y De Martini, 1991; Fowler, 1998; Bustinza, 2000). Este periodo coincide con el dramático 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 (Ramírez et al., 1985). Asimismo, se ha observado que las crías en buena condición corporal son más susceptibles a desarrollar la enfermedad (Ramírez et al., 1985; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Bustinza, 2000). Esto presumiblemente debido a su ingesta prematura de forraje contaminado del entorno.

Por otro lado, la época de parición en los camélidos sudamericanos dada durante los meses de Enero a Marzo, periodo de intensa precipitación fluvial, sumada al hacinamiento de los animales favorecerían a la presentación de epizootias de enterotoxemia, debido a que la alta humedad del suelo propician la presencia, multiplicación y modificación biológica de esporas a células vegetativas de *C. perfringens*. Asimismo, la extrema variación entre temperaturas máxima (14° C) y mínima (3° C) durante el día que soportan las crías de alpacas en el altiplano generan un gran estrés en ellos (Ramírez *et al.*, 1985).

### 2.3.3. Patogenia

La principal vía de ingreso del *C. perfringens* es la oral. Es probable que las crías ingieran una masiva cantidad de esporas y/o células vegetativas de clostridios (Ramírez *et al.*, 1985). Posteriormente, en el lumen intestinal un ligero pH alcalino y el incremento de carbohidratos en la dieta (cambio de dieta, inicio de consumo de forraje) (Ramírez y Ellis, 1988) o una excesiva ingestión de leche (Ameghino y De Martini, 1991) generarían un ambiente óptimo para la multiplicación y/o esporulación del *C. perfringens* y la síntesis de la(s) toxina(s) responsable(s) del cuadro fatal (Ramírez y Ellis, 1988; Ameghino y De Martini, 1991; Pérez, 2006). Hasta el momento, no se conoce cuál(es) es(son) el(los) factor(es) de virulencia de *C. perfringens* responsable(s) de la enfermedad.

Inicialmente, la Cp-PLC fue considerada como el principal factor de virulencia involucrado en cuadros enterotoxémicos por *C. perfringens* tipo A (Moro, 1987). Sin embargo, estudios realizados por Ramírez (1987) mostraron la producción de CPE por algunas cepas de *C. perfringens* tipo A aislados de casos de enterotoxemia en alpacas, dichas cepas mostraron escasa capacidad de producción de Cp-PLC *in vitro*. Asimismo, ensayos en intestino ligado en llamas inoculadas con cepas enterotoxigénicas esporuladas provocaron la acumulación de fluidos y la formación de gas, así como la aparición de algunos signos clínicos (postración, ligera lagrimación y congestión de mucosas), consiguiendo ser evidenciada serológicamente la CPE en el contenido intestinal. Todo esto llevó a concluir al autor que la CPE es el principal

factor de virulencia involucrado en el desarrollo de la enfermedad (Ramírez, 1987; Ramírez, 1988; Ramírez y Ellis, 1988).

No obstante, recientes estudios moleculares de cepas aisladas de casos de enterotoxemia de alpacas muestran la escasa presencia del gen *cpe*, poniendo en cuestión la participación de la CPE como el factor de virulencia esencial para la enfermedad (Pérez, 2006). Además, la actividad biológica de la CPE se encuentra asociada con diarreas profusas, esporádicas y autolimitantes en individuos inmunocompetentes, y no con enteritis necróticas y/o hemorrágicas que cursan sin diarreas como los típicos cuadros descritos de enterotoxemia en alpacas (Moro, 1987; Ameghino y DeMartíni, 1991; Palacios, 2004). Con todo lo mencionado anteriormente, la participación de la CPE ha sido descartada y han empezado a buscar nuevos factores de virulencia de *C. perfringens*.

Así, se ha reportado la presencia de *C. perfringens* genotipo A subtipo  $\beta$ 2toxigénico en casos de enterotoxemia de alpacas (Pérez, 2006). Este subtipo además de tener el gen *cpa* posee el gen *cpb2*, evidenciando una posible participación de la toxina  $\beta$ 2 en la etiopatogénesis de la enfermedad. Similares hallazgos han sido reportados por investigadores estadounidenses, quienes detectaron la presencia del gen *cpb2* en 18.6% (8/43) de los *C. perfringens* aislados de alpacas con problemas entéricos (Bueschel et al., 2003; Ellis, 2006). La presencia de la toxina  $\beta$ 2 viene siendo asociada con problemas entéricos en diferentes animales, principalmente en enteritis necrótica en cerdos y tiflocolitis en caballos (Bueschel et al., 2003, Garmory et al., 2000; Herholz et al.,



1999), así como con cuadros de enterotoxemia en terneros, cabras y venados (Manteca et al, 2002; Embury-Hyatt et al., 2005; Dray, 2004) y disentería hemorrágica en corderos (Gkiourtzidis *et al.*, 2001).

Por otro lado, Luna (2009) ha aislado cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) y enteropatógena (EPEC) en el 21% (5/24) y 25% (6/24) de casos enterotoxemia de alpacas, sugiriendo la participación de la shigatoxina e íntima de *E. coli* en la patogenia de la enfermedad. Asimismo, Rosadio et al. (2009) han reportado una asociación de la enfermedad con *Eimeria macusaniensis*, encontrándose la presencia del parásito en 31% (33/108) de los casos. Probablemente, el daño producido por la coccidia en la mucosa intestinal facilitaría la proliferación de *C. perfringens* y sus toxinas.

#### **2.3.4. Signos clínicos**

La muerte súbita puede ser muchas veces el único signo encontrado. Los signos clínicos y su intensidad dependerán de la cantidad de toxinas presentes en el organismo. Las crías afectadas muestran depresión, anorexia, permanecen postradas y alejadas de su madre con las orejas dirigidas hacia atrás, los ojos cerrados y los miembros estirados. El cuadro progresa y las crías aparecen con los miembros anteriores estirados, la cabeza apoyada sobre el suelo, el abdomen distendido y la emisión de quejidos, posiblemente debido al dolor abdominal. Algunas ingieren abundante cantidad de agua (polidipsia) y otras desarrollan apetito depravado (polifagia) que se manifiesta por la ingestión de arena, piedrecillas, etc. del suelo. La temperatura tiende a ser normal, pero a

veces sobrepasa los 40° C, y suelen echarse ventralmente en los arroyos y charcos de agua. La temperatura disminuye notablemente (hipotermia) en el estado agónico. El cuadro toxémico en su etapa final, se acompaña de alteraciones nerviosas tales como convulsiones y opistótonos. Finalmente, el animal entra en coma y muere (Ramírez et al., 1985; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez, 1991; Fowler, 1998; Bustinza, 2000).

### **2.3.5. Lesiones anatomopatológicas**

Frecuentemente el animal externamente muestra una carcasa en buena condición muscular y con el abdomen distendido por la presencia de gas en intestinos. El tejido subcutáneo puede estar congestionado y presentar hemorragias petequiales (Ramírez., 1991; Fowler, 1998). En cavidad torácica, la tráquea y los bronquios con contenido espumoso, algunas veces acompañado de ingesta. Los pulmones aparecen congestionados y edematosos (Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez, 1991; Fowler, 1998). Los nódulos linfáticos torácicos de tamaño incrementado y hemorrágicos (Ramírez, 1991; Fowler, 1998). El timo se presenta congestionado y con hemorragias petequiales en su superficie (Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994; Fowler, 1998). En cavidad torácica y en saco pericárdico frecuentemente existe presencia de abundante exudado seroso claro y ligeramente viscoso (Ramírez, 1991; Fowler, 1998). En corazón, las arterias coronarias se encuentran dilatadas y las aurículas presentan petequias en su superficie (Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994; Ramírez, 1991; Fowler, 1998).

Al explorar la cavidad abdominal, es perceptible un olor desagradable y característico a la enfermedad (Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez, 1991). Los intestinos están distendidos con fluido acuoso, cuyo color varía de acuerdo al tipo de ingesta, pudiendo ser blanquecino, amarillento, verdoso y plomizo (Moro, 1987; Ramírez, 1991). El intestino delgado, particularmente yeyuno e ileon, se encuentra congestionado (Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Fowler, 1998) y hemorrágico (Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994).

En el intestino grueso se presentan hemorragias focales con zonas de impacción conteniendo heces duras (Oha, 1994). Las placas de Peyer se encuentran inflamadas, siendo más notorias en el intestino grueso (Ameghino y De Martini, 1991; Fowler, 1998). Los ganglios linfáticos mesentéricos, aparecen incrementados de tamaño, congestionados y/o hemorrágicos (Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994; Ramírez, 1991; Fowler, 1998). En el estómago glandular, la mucosa puede estar congestionada o hemorrágica (Ameghino y De Martini, 1991; Fowler, 1998).

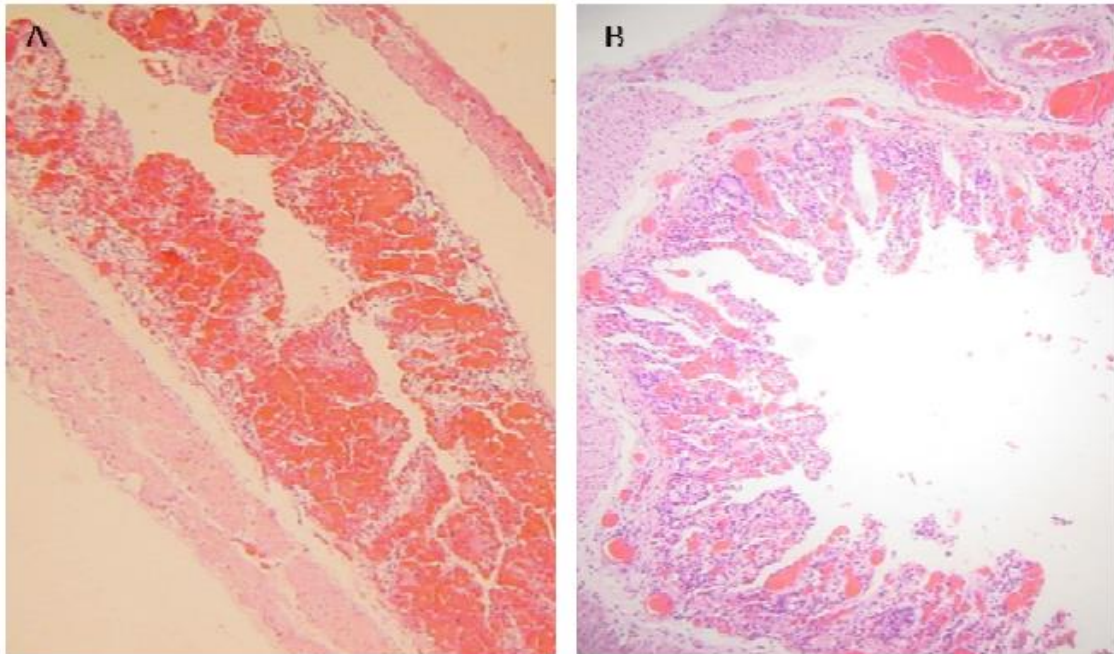
El bazo, a veces, aumentado de tamaño (Moro, 1971; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991). El hígado aparentemente normal, pero algunas veces congestionado (Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994; Ramírez, 1991). En los riñones es posible observar congestión de la corteza renal (Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994; Fowler, 1998) y, a veces, hemorragias petequiales en su superficie (Oha, 1994). La vejiga generalmente se encuentra distendida debido a la acumulación de orina como consecuencia de su parálisis. El encéfalo se presenta

severamente congestionado y es notorio el acúmulo de líquido cefalorraquídeo entre las meninges (Ramírez, 1991; Fowler, 1998).

Palacios (2004) caracterizó las lesiones entéricas de cuadros clínicos compatibles con la enfermedad describiendo las siguientes lesiones anatomopatológicas: enteritis catarral (100%) en duodeno; enteritis hemorrágica (46.7%), panenteritis hemorrágica (26.7%) y enteritis necrótica (16.6%) en yeyuno; enteritis necrótica (56.6%), enteritis hemorrágica (20%) y enteritis fibrinosa (13.3%) en íleon; tiflitis catarral (40%), tiflitis necrótica (26.7%) y tiflitis fibrinosa (13.3%) en ciego; y colitis catarral (63.3%), colitis necrótica (30%), colitis hemorrágica (10%) y colitis fibrinosa (16.7%) en colon.

### **2.3.6. Lesiones histopatológicas**

Palacios (2004), describe las siguientes lesiones histopatológicas: enteritis necrótica (90%) y enteritis catarral (10%) en duodeno; enteritis necrótica (60%), panenteritis necrótica hemorrágica (20%), enteritis necrótica hemorrágica (13.3%) (Figura 1 B) y panenteritis necrótica supurativa (6.7%) en yeyuno; enteritis necrótica (70%), enteritis fibrinonecrótica (13.3%), panenteritis necrótica hemorrágica (Figura 1 A) (6.7%), enteritis necrótica supurativa (6.7%) y panenteritis necrótica supurativa (3.3%) en íleon; tiflitis necrótica (46.7%), tiflitis muconecrótica (20%), tiflitis fibrinonecrótica (13.3%), tiflitis catarral (10%), tiflitis mucocatarral (6.7%) y tiflitis necrótica hemorrágica (3.3%) en ciego; colitis necrótica (46.6%), colitis muconecrótica (20%), colitis catarral (16.7%) y colitis necrótico hemorrágico (6.7%) en colon.



**Figura 1.** Lesiones histopatológicas en intestino delgado de alpacas muertas por enterotoxemia. A, severa enteritis hemorrágica difusa aguda. B, severa enteritis necrótica hemorrágica difusa aguda (10X-Tinción H.E.). Tomado de Pérez, 2006.

Oha (1994), describe lesiones histopatológicas en diferentes órganos, encontrando congestión pericárdica aguda (86.67%) y pericarditis aguda (13.33%); congestión miocárdica (53.33%), miocarditis hemorrágica (40%) y miocarditis aguda (6.67%); tinitis hemorrágica (46.47%), congestión tímica (33.33%) y tinitis fibrinosa (20%); ileítis regional hemorrágica (100%); colitis catarral aguda (53.33%) y colitis hemorrágica (47.67%); congestión hepática aguda (40%) y colangitis supurativa (13.33%); hipoplasia nodular mesentérica (40%) y linfadenitis mesentérica hemorrágica (60%); nefritis tubular degenerativa (56.67%), nefritis hemorrágica (36.67%), pielonefritis supurativa (3.33%) y degeneración grasa (3.33%); congestión vesical (53.33%) y cistitis catarral aguda (46.67%).

### 2.3.7. Diagnóstico

Para el diagnóstico de la enterotoxemia de las alpacas se deben tomar en cuenta los siguientes criterios: i) identificar la magnitud del problema en el campo mediante la identificación de las características epidemiológicas de la mortalidad de las crías enfermas y muertas, ii) los signos clínicos y iii) las lesiones anatomo-histológicas; iv) efectuar el reconocimiento de esporas y/o bacilos en fróntices directos del contenido intestinal (ileon y yeyuno) teñidos con coloraciones específicas (Ramírez, 1988; Ramírez y Ellis, 1988; Ramírez, 1989a; Ramírez, 1990); v) el aislamiento de *C. perfringens* y su caracterización toxigénica (genotipificación) y vi) la identificación de otros agentes infecciosos, como *E. coli* y *E. macusaniensis*, que pudieran estar agravando la presentación de la enfermedad (Pérez, 2006, Rosadio *et al.*, 2009, Luna 2009).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MEDIO EXPERIMENTAL

##### 3.1.1. Localización

El trabajo de investigación fue ejecutado en el Centro de Investigación y Producción “La Raya” de la Universidad Nacional del Altiplano, ubicado en el distrito de Santa Rosa, provincia de Melgar y Región de Puno, situado entre 4,200 a 5,500 m, corresponde al ámbito ecológico de puna húmeda, durante el año presenta 2 épocas bien definidas, noviembre a abril corresponde a la época de lluvias y los meses de mayo a octubre a la época seca, con temperatura máxima de 14.13°C, mínima de -10.18°C, temperatura promedio de 5.56°C, la precipitación pluvial anual con 725 mm y una humedad relativa de 61.83% (SENAMI, 2012).

##### 3.1.2. Características de la zona del trabajo

El laboratorio del Centro de Investigación y Producción “LA RAYA”; fue acondicionado adecuadamente para llevar a cabo la investigación experimental, con la instalación de un ambiente para el quirófano, otro para análisis microbiológico, un ambiente para el aislamiento del *Clostridium perfringens*, así mismo otros ambientes para el estudio hematológico y bioquímico.

## **3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL**

### **3.2.1. Material experimental**

Se utilizaron 45 crías de alpacas aparentemente sanas de la raza huacaya entre machos y hembras, con pesos superiores a 7.0 Kg al nacimiento, y animales muertos con signos de enfermedad hemorrágica enterotóxica. Los animales fueron mantenidos en condiciones de alimentación y manejo similares. Las crías nacidas en la campaña de parición 2015, fueron divididas en 9 grupos de 5 animales, tomando en cuenta desde la primera a novena semana de edad.

### **3.2.2. Materiales y equipos de trabajo**

#### **Para la instalación del quirófano**

- Equipo de anestesia inhalatoria
- Monitor multiparámetro
- Electrocardiógrafo
- Bombas de infusión
- Mesa quirúrgica
- Bomba de aspiración
- Bandas de sujeción
- Campos operatorios
- Compresas quirúrgicas



- Suero fisiológico
- Solución dextrosa
- Iodopovidona
- Clorhexidina
- Instrumental quirúrgico
- Anestésicos
- Otros materiales quirúrgicos (hilos de sutura, etc.)

**Para el aislamiento del *Clostridium perfringens*.**

- Gradillas.
- Tips.
- Agua peptonada.
- Agar TSC.
- Peptona de carne.
- Polimixina B.
- Anaerocultivo.
- Autoclave.
- Balanza 1 – 100g.
- Estufa de incubación.
- Micropipetas 10 - 20 microlitros.

- Micropipetas 10 – 100 microlitros.
- Jarra de anaerobiosis x 2.5L.
- Vortex.
- Horno microondas.
- Placas Petri.
- Mechero bunsen.
- Anza de siembra.
- Tubos falcon de 45ml.
- Tubos x 15ml.
- Guantes estériles.
- Probeta.
- Otros.

### 3.3. METODOLOGÍA

#### 3.3.1. Recolección de muestras

##### **Procedimiento:**

Los animales fueron evaluados clínicamente a través de un examen físico mediante constantes clínicas como son: frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, pulso, temperatura, hemograma, perfil hepático y renal, uroanálisis y electrocardiografía para determinar la apariencia clínica normal (fig. 1 y 2 del anexo).

Se procedió a la preparación del paciente para la intervención quirúrgica que fueron divididas en 4 etapas, una de premeditación, inducción, mantenimiento y recuperación, seguida la inducción, se colocó al animal en posición de cubito dorsal, para realizar la desinfección y embrocación de la zona ventral, esto se realizó con soluciones de clorhexidina y iodopovidona (fig. 3 del anexo), seguidamente se pasó a realizar la colocación de los campos operatorios, con la ayuda de pinzas de campo a nivel ventral (fig. 4 del anexo), fueron anestesiados con midazolam, propofol, isoflurano y fentanilo (fig. 5 del anexo).

De los 45 animales; 25 fueron anestesiados mediante un equipo de anestesia inhalatoria y 20 mediante anestesia general, durante todo el tiempo de intervención quirúrgica se fue monitoreando las constantes clínicas cada 5 minutos (fig. 6 del anexo), para evitar complicaciones durante las intervenciones quirúrgicas. Las muestras fueron obtenidas a través de una laparotomía medial y una enterectomía por medio de un inciso puncionante mesentérica de cuatro a cinco mm de longitud en duodeno, yeyuno e íleon (fig. 7 del anexo). El contenido intestinal se extrajo por medio de una cánula estéril por aspiración con una jeringa de 10ml; utilizando el mismo procedimiento en los animales muertos (fig. 8 del anexo).

Luego se tomó una biopsia de 4mm de la mucosa del duodeno, yeyuno e íleon en animales aparentemente sanos y muertos por síndrome hemorrágico enterotóxico, para determinar la presencia de *Eimeria spp.* Mediante histopatología (fig. 9 del anexo). Después se suturo la herida quirúrgica del intestino con un patrón de Cushing y los

planos musculares y piel por medio de suturas de Ford, simple interrumpida e intradérmica. (fig. 10 del anexo).

### 3.3.2. Aislamiento del *Clostridium perfringens*

Una vez extraído el contenido intestinal, para el aislamiento del *Clostridium perfringens*, se procedió a realizar diluciones seriadas decimales;  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$  empleando como dilutor agua peptonada al 0.1% (fig. 11 del anexo), esto en tubos de falcon de 15 ml, usando a la vez un mechero bunsen, para mantener un áreaestéril durante la siembra (fig. 12 del anexo), a partir de las diluciones se sembró 1 ml de inóculo en agar triptosa sulfito cicloserina TSC y polimixina B, medio de cultivo selectivo y diferencial por el método de siembra por incorporación ( fig. 13 del anexo), con el respectivo rotulo del número de dilución, lugar anatómico y fecha de muestra. La incubación se realizó en una estufa de laboratorio a 37°C por 24 horas en jarras de anaerobiosis (fig. 14 y 15 del anexo).

### 3.3.3. Cuantificación del *Clostridium perfringens*

La cuantificación se realizó seleccionando aquellas placas cuyo crecimiento de colonias sulfito reductoras de color negro propias del *Clostridium perfringens*, se encuentren entre 30 y 300 colonias (fig. 16 del anexo). Los resultados se reportaron en log UFC/mL de muestra. Para obtener número total por mL de muestra, se usó la siguiente formula:

$$\frac{\log 10 UFC}{g} = \frac{Nro\ de\ colonias \times (dilución)^{-n}}{Inóculo}$$

### 3.3.4. Identificación de la presencia de *Eimeria spp*

Cada segmento de biopsia intestinal fue fijado en formalina al 15% para su evaluación histopatológica. Los cortes se realizaron de 4 a 5 micras de grosor coloreándose con Hematoxilina-Eosina, Azul de toluidina, Giemsa, Tricrómico de Shorr y Ziehl-Neelsen. Se evaluó para identificar la presencia de estructuras coccidiales inmaduras. Además, se evaluaron las alteraciones macroscópicas y microscópicas del intestino que fueron categorizadas en una escala de 0 a 3 (0: ningún cambio; 1: leve; 2: moderado; 3: severo). También se determinó la morfología de las vellosidades en relación con su largo y profundidad de las criptas como un parámetro de la salud intestinal.

## 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 3.4.1. Tamaño de muestra

Para cuantificar el *Clostridium perfringens* las muestras fueron extraídas del duodeno, yeyuno e íleon por aspirado a través de una laparotomía medial, y en los animales muertos al momento de realizar la necropsia. Para determinar la presencia de *Eimeria spp*. Se obtuvo una biopsia insicional de 4 mm de la mucosa de duodeno, yeyuno e íleon en animales aparentemente sanos y muertos por síndrome hemorrágico enterotóxico.

Se conformó un grupo de 45 animales plenamente identificados, a los cuales se aleatorizaron para luego ser distribuidos en 9 grupos que correspondieron a 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, y 56 días de nacidos.

Adicionalmente se consideraron aquellos animales muertos en el mismo periodo de tiempo (desde la primera a novena semana de vida).

El tamaño de la muestra para cada grupo se determinó a través de la siguiente formula:

$$n = (Z\alpha + Z\beta) \frac{2S^2}{d^2}$$

Dónde:

n: Número de animales en cada grupo

d: Diferencia esperada como verdadera entre grupos detectable como importante.

S: Desviación estándar del promedio de las observaciones asumiendo homogeneidad de varianzas y similar desviación estándar entre grupos.

( $Z\alpha + Z\beta$ ): Nivel de significancia  $\alpha=0.05$  y poder de la prueba del 80% y dos colas (7.85).

Se asume una desviación estándar de 4.4 (Si *et al.*, 2007) y un nivel más bajo de  $8\log_{10}$  UFC/ml de Clostridium intestinal encontrados en aves, ovejas y cabras (Si *et al.*, 2007; Songer y meer, 1996):

$$n = \frac{2(4.4)^2}{(8)^2} \times 7.85$$

$$n = 4.75$$

n = 5 animales por grupo o 45 animales aparentemente sanos.

### 3.4.2. Definición de variables

Para la cuantificación del *Clostridium perfringens* la escala de medición de la variable será cuantitativa de tipo continua cuya unidad de medida será  $\log_{10}$  de las Unidades Formadora de Colonia por g de muestra ( $\log_{10}$ UFC/g). Para la identificación de la presencia de *Eimeria spp.* Seconsideró una escala de variable cualitativa nominal dada por la presencia o ausencia de estructuras parasitarias tipo *Eimeria*. Las lesiones encontradas en la superficie intestinal se considerón como variables de tipo cualitativas ordinales (ningún cambio, leve, moderado y severo).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación del *Clostridium perfringens***Tabla 4.** Cuantificación de *Clostridium perfringens* en el intestino delgado de crías de alpacas sanas desde la primera hasta la novena semana de edad.

Grupo	n	Segmento intestinal (log UFC/ml)		
		Duodeno	Yeyuno	Íleon
		$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$	$\bar{X} \pm DS$
1	5	1.879 ± 3.342	5.811 ± 4.248	8.443 ± 4.837
2	5	1.973 ± 4.411	2.576 ± 3.899	3.159 ± 3.702
3	5	3.546 ± 4.037	6.158 ± 3.186	6.788 ± 2.522
4	5	4.231 ± 4.152	5.638 ± 5.749	5.408 ± 5.521
5	5	2.119 ± 2.101	2.799 ± 2.973	6.669 ± 3.875
6	5	1.601 ± 2.233	1.463 ± 2.011	5.626 ± 4.723
7	5	1.771 ± 2.428	2.640 ± 2.417	6.607 ± 2.922
8	5	1.381 ± 2.059	2.200 ± 2.197	4.979 ± 1.081
9	5	5.015 ± 1.578	2.358 ± 2.416	3.625 ± 2.958

De las 45 crías de alpaca muestreadas; se pudo observar un crecimiento bacteriano en alpacas a partir de la primera hasta la novena semana de edad de evaluación en los tres segmentos anatómicos, duodeno, yeyuno e íleon.

En el grupo correspondiente a la primera semana de edad, de los cinco animales pertenecientes a este grupo, se encontró establecimiento del *C. perfringens* a partir del tercer día en dos, cuatro, y cinco crías en el duodeno, yeyuno e íleon respectivamente, indicando que la colonización del *C. perfringens* ocurre a muy temprana edad. En la segunda semana de edad, se ha observado una ligera disminución en cuanto a la población microbiana



ubicada en los segmentos de yeyuno e íleon, por otra parte, desde la tercera, a la séptima semana se mantiene en cantidades similares, descendiendo durante la octava y novena semana en el íleon, caso contrario a lo que ocurre durante este periodo en yeyuno e íleon, muestran que a partir de la cuarta semana se mantiene en niveles más bajos, aumentando en duodeno durante la última semana.

Se ha encontrado una mayor cantidad de *C. perfringens* en el íleon disminuyendo conforme finaliza el intestino, siendo menor la cantidad de *C. perfringens* en el duodeno; a partir del duodeno (1.9 log UFC/mL), aumentando en yeyuno (5.8 log UFC/mL) y siendo completa la presencia bacteriana a nivel del íleon (log 8.4 UFC/mL).

En los tres segmentos intestinales las log UFC/mL aumentan claramente desde los 21 a 35 días, alcanzando sus promedios más altos en la cuarta semana en duodeno (4.2 log UFC/mL), tercera semana en yeyuno (6.2 log UFC/mL) y en el íleon (6.8 log UFC/mL durante la tercera semana).

Comparando estacolonización en cada segmento intestinal desde la primera a novena semana de vida, se encontró diferencias ( $p = 0.001352$ ), en consecuencia, el crecimiento del *C. perfringens* está relacionado a la coexistencia de eimeriosis en casos de enterotoxemia y diarreas fatales, reportándose que la enterotoxemia es la enfermedad más devastadora que afecta a la población de alpacas, provocando tasas de mortalidad de hasta 70% en crías alpacas (Ramírez, 1991). La principal lesión evidenciada es un proceso necrótico y/o hemorrágico a nivel de yeyuno e íleon, que desencadena un proceso toxémico seguido de una muerte súbita en la mayoría de los casos

(Moro, 1987; Ameghino y DeMartini, 1991). Recientes estudios moleculares del agente causal (*C. perfringens*) descartan la participación de la CPE, la toxina  $\beta$ , la toxina  $\epsilon$  y la toxina  $\iota$  en la patogénesis de la enterotoxemia en alpacas, pero si sugieren la participación de la Cp-PLC y, en algunos casos, la toxina  $\beta$ 2 (Pérez, 2006).

Sear y Kaper (1996), clasifican a las toxinas entéricas bacterianas en enterotoxinas, citotoxinas y toxinas con actividad neural. Así una enterotoxina es capaz de estimular un flujo de secreción intestinal en uno o más modelos intestinales sin necesidad de tener evidencia histológica de daño intestinal o evidencia de injuria a células no-eritrocíticas en pruebas in vitro. En base a esto, se evidencio que la Cp-PLC (Pp.Cp-PLC), además de sus actividades lecitinasa, hemolítica, citotóxica, de agregación plaquetaria y letal, se comporta como una enterotoxina.

La absorción de agua en el tracto digestivo ocurre como consecuencia de gradientes osmóticos generados por la absorción activa de iones y otros solutos y también por hidrostasis pasiva o fuerzas osmóticas (Ganong, 1989). La habilidad de una toxina para reducir la absorción activa de iones puede además reducir la absorción de agua, conduciendo a un flujo de secreción intestinal (Sear y Kaper, 1996). Experimentos empleando un sistema in vitro de actividad enterotóxica (Cámaras de Ussing Chamber) para medir la red de flujo de agua transepitelial en intestino de ovino revelan que la CpPLC provoca una inhibición significativa de la absorción intestinal de agua (Miyakawa y Uzal, 2005). Asimismo, otro estudio, indica que la Cp-PLC no solo provoca secreción electrogénica de aniones, probablemente debida a la estimulación de secreción de cloruros, sino que también disminuye el cotransporte electrogénico

Na<sup>+</sup>/glucosa de la mucosa hacia la serosa en intestino delgado de pollos (Rehman et al., 2006). Aunque estos parámetros no fueron evaluados en nuestro estudio esto también estaría sucediendo en el íleon de conejo.

Otros estudios, en íleon de ratas indican que la Cp-PLC deteriora la función de la barrera mucosa e incrementa la permeabilidad del intestino a indeseables moléculas o patógenos por activación de fosfolipasa A2 (Otamiri, 1989). Así, esta activación del metabolismo fosfolipídico también sería evidenciado por el incremento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> por Cp-PLC desencadenando contracciones del íleon. (Sakurai *et al.*, 1990).

La capacidad de producción de Cp-PLC fue establecido en base a sus niveles de actividad lecitinasa, pues el análisis de las secuencias del gen *plc* (Cp-PLC) muestra alta homología y similaridad entre los diferentes tipos (A-E) de *C. perfringens*, así como aislados de animales con o sin enfermedad, sugiriendo que la variación en la actividad fosfolipasa entre las diferentes cepas no es debida a una mutación en la región codificante de *plc* sino en una región extragénica (Katayama et al., 1993; Tsutsui et al., 1995; Sheedy et al., 2004; Effat, 2008). En todos los cinco tipos toxigenicos de *C. perfringens*, el gen *plc* es situado en el mismo locus, cerca al origen de replicación y entre dos operones de rRNA. Esta localización es importante pues no solo es el primero en ser replicado sino que también es el segmento mejor conservado del genoma. (Rood y Cole, 1991).

Hauschild *et al.* (1968). no pudo prevenir la acumulación de fluidos provocada por la inoculación de cultivo de *C. perfringens* tipo A *cpe-cpb2-* en las asas intestinales ligadas mediante la inyección con anti-Cp-PLC, poniendo en

cuestión la participación de la Cp-PLC en la producción de lesiones. Similarmente Timbermont et al. (2009) evaluarón la capacidad de producir lesiones entéricas en asa intestinal de pollos por cepas de *C. perfringens* con diferentes capacidades de producción de Cp-PLC y cepas aisladas de pollos enfermos y sanos encontrando que solo las cepas aisladas de pollos enfermos, independiente de la capacidad de producción de Cp-PLC, fueron capaces de generar lesiones entéricas, concluyendo que la Cp-PLC no jugaría un rol principal en la producción de lesiones entéricas por *C. perfringens* tipo A.

Timbermont *et al.* (2009). también inocularon sobrenadantes de cultivos de *C. perfringens* aislados de enterotoxemia de terneros, con alta capacidad de producción de Cp-PLC, en asas intestinales de pollo no encontrando lesiones entéricas en éstas. Solamente encontraron lesiones en asas intestinales desafiadas con cepas de *C. perfringens* aisladas de pollos enfermos. Sugiriendo la presencia de factores de virulencia específicas a huésped en cepas de *C. perfringens*. Estos hallazgos proporcionan una explicación a la ausencia de lesiones entéricas (características a enterotoxemia de alpacas) provocadas por los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas en el modelo de asa intestinal ligada en conejos.

Al parecer, después de todo lo mostrado, la Cp-PLC per se no sería el factor de virulencia responsable de las lesiones entéricas encontradas en casos de enterotoxemia de alpacas, ni su interacción con otros factores de virulencia. No obstante, no se descarta su participación a nivel sistémico, en donde su actividad tóxica es más compatible y sugerida con el cuadro descrito de desordenes multiorgánicos en enterotoxemia de alpacas. Asimismo, no se descarta la participación de la Cp-PLC en la exacerbación de las lesiones

entéricas posteriores a los daños iniciales provocados por *E. macusaniensis* (Rosadio y Ameghino, 1994, Palacios et al., 2006; Rosadio et al., 2009) o shigatoxinas de *E. coli* (Luna, 2009) reportados ya en alpacas con cuadros de enterotoxemia en alpacas.

### **Identificación de la presencia de *Eimeria spp.* en el intestino delgado de crías de alpacas por histopatología.**

En el estudio por histopatología no se reportó presencia de eimerias en el tracto intestinal de crías de alpaca, según literatura citada se puede encontrar eimerias mediante métodos coproparasitológicos.

Las infecciones tempranas sugieren exposiciones de las crías en los primeros días post nacimiento y tal vez durante lactaciones en condiciones insalubres y/o al inicio prematuro del consumo de pastos. Esta situación permitiría que las crías que nacen al inicio de la campaña de parición actúen como animales amplificadores eliminando grandes cantidades de ooquistes e incrementando el potencial de contaminaciones a las pasturas, así como las posibilidades de infecciones y reinfecciones sobre todo para las crías que nacen posteriormente y particularmente en los meses más húmedos y templados (febrero/marzo) en los andes. (Rosadio *et al.*, 2010).

El ciclo infectivo de las diferentes especies de coccidia persiste en el medio ambiente por innumerables factores, pero fundamentalmente por animales crónicamente infectados (Leguía y Casas, 1999) y el continuo uso de canchas contaminadas en pariciones pasadas. En este contexto, los animales portadores contribuirían a la permanente contaminación de la pastura aumentando la eliminación de ooquistes producto del continuo manejo

estresante que se encuentran sometidas sobre todo las alpacas gestantes. Las alpacas gestantes desde mediados de noviembre se exponen a actividades estresantes que se inician con la esquila, traslado posterior (inicios de diciembre), por varias horas, hasta la “canchas” de pariciones y terminar con el estrés de parición y empadre simultáneo a que son sometidos anualmente (Rojas 1990). Todas estas prácticas, deben llevar a la pérdida temporal de la inmunidad innata en estos animales que puede reflejarse en un incremento en la eliminación de ooquistes y consiguiente contaminación de pasturas. Esto ocasionaría infecciones tempranas en las nuevas poblaciones de crías que a su vez actuarían como replicadoras de ooquistes para toda la campaña de parición. El ciclo infectivo se completa con el microclima favorable para el desarrollo, viabilidad y maduración de los ooquistes propios de los meses más húmedos (diciembre a marzo) que coincide con la parición de las alpacas en los Andes peruanos. (Leguía y Casas 1999, Romero 1992).

#### **CO - RELACION ENTRE *Clostridium perfringens* y *Eimeria spp.***

Se pudo determinar que el *Clostridium perfringens* parecería no ser el agente predisponente a infecciones eimeriales, pues la destrucción de los enterocitos podría reducir la población celular necesaria para mantener una adecuada replicación coccidial. Sin embargo, los efectos citopáticos inherentes a la multiplicación coccidial, podría muy bien facilitar los nutrientes necesarios para iniciar la multiplicación bacteriana y subsecuente producción y absorción de toxinas potencialmente patogénicas.

No se ha encontrado información sobre la posible interacción entre *Eimeria spp.* y *Clostridium perfringens* en desordenes intestinales en alpacas; sin

embargo, infecciones coccidiales permiten el desarrollo clostridial para desencadenar enteritis necrótica en pollos (Hermans y Morgan, 2003). No se dispone de mucha información al respecto en alpacas, pero el pH en 51 muestras de intestinos afectados fue de 6.8 comparado con pH de 5.8 en tres muestras de intestinos de alpacas muertas por otras causas (Rosadio *et al.*, 2010).

Otros factores como la contaminación ambiental también pueden incrementar la población microbiana, aunque *Clostridium perfringens* es un habitante normal del intestino, cepas virulentas del entorno puede desplazar cepas resistentes de *Clostridium perfringens* en el intestino (Timbermont L, 2009), o plásmidos de transferencia que contiene un gen que codifica la toxina a las cepas *Clostridium perfringens* residente en las vías intestinales, convirtiendo estas cepas residentes en potenciales enteropatógenos (Brynestand *et al.*, 2009).

## V. CONCLUSIONES

- La cantidad promedio del *Clostridium perfringens* desde la primera a novena semana de edad en duodeno es 1.9log UFC/ml, en yeyuno 5.8log UFC/ml, e íleon log 8.4 UFC/ml alcanzando niveles elevados a los 21 a 31 días correspondientes a 4.2 log UFC/ml en duodeno, 6.2 log UFC/ml en yeyuno y 6.8 log/ml en íleon.
- Se ha podido establecer, que el lugar de mayor colonización del *Clostridium perfringens*, es el íleon, seguido del yeyuno y finalmente en el duodeno, durante las primeras semanas esto en el caso de las crías de alpacas aparentemente sanas. En el caso de las crías muertas con aparentes síntomas de enterotoxemia presentaron mayor colonización en el duodeno seguido de íleon y finalmente yeyuno.
- Se pudo establecer claramente que la presencia de eimerias no tiene ninguna posible interacción con la presencia de *Clostridium perfringens* en el tracto intestinal de las crías de alpacas.



## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar una réplica de este trabajo de investigación en distintos centros de producción de alpacas, puesto que se tiene poca o ninguna información en crías de alpacas.
- Realizar más estudios sobre las posibles interacciones y coexistencia entre la eimeriosis y el *Clostridium perfringens*; esto recomendable puesto que existe escasa información al respecto en alpacas.
- Generar el menos estrés posible en las alpacas durante su pastoreo, empadre, destete y demás faenas, para así tener un mejor manejo y baja mortandad por *clostridium perfringens* en el CIP. LA RAYA.

## VII. REFERENCIAS

- Al-Khaldi, S.F., Myers, K.M., Rasooly, A., Chizhikov, V. (2004b). *Genotyping of Clostridium perfringens toxins using multiple oligonucleotide microarray hybridization*. Mol Cell Probes; 18:359-367.
- Al-Khaldi, S.F., Villanueva, D., Chizhikov, V. (2004<sup>a</sup>). *Identification and characterization of Clostridium perfringens using single target DNA microarray chip*. Int J Food Microbiol; 91:289-296.
- Ameghino, E. y DeMartini, J. (1991). *Mortalidad de crías de alpacas*. Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA). UNMSM. Lima, Perú. p 71-80
- Archambault, M., Bell-Rogers, P., Cai, H. (2002). *Clostridium perfringens genotyping, a valuable component of the diagnosis*. AHL Newsletter; 6: 26-27.
- Barach, J. T., DM Adams, and M. L. Speck (1974). *Recovery of heat Clostridium perfringens type A spores on selective media*. Appl. Microbiol. 28:793-797
- Baums, C.G, Schotte, U., Amtsberg, G., Goethe, R. (2004). *Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of Clostridium perfringens isolates*. Vet Microbiol; 100:11-16.
- Boujon, P., Henzi, M., Penseyres, J.H., Belloy, L. (2005). *Enterotoxaemia involving  $\beta$ 2toxicogenic Clostridium perfringens in a white stork (Ciconia ciconia)*. Vet Record; 156:746-747.

- Brooks,G.F.,Butel,J.S. y Morse, S.A.(1998).*Microbiología médica de Jawetz, Melnick,yAldergerg*.16va ed. Editorial El Manual Moderno. México. p:230-231
- Brynestad, S., Sarker, M., McClane, B., Granum, P., Rood, J. (2001). *Enterotoxin plasmid from Clostridium perfringens is conjugative*. Infect Immun; 69:3483-3487.
- Brynestad, S., Sarker, M., McClane, B., Granum, P., Rood, J. (2009). *Enterotoxin plasmid from Clostridium perfringens is conjugative*. Infect Immun; 69:3483-3487.
- Brynestad, S., Synstad, B., Granum, P. (1997). *The Clostridium perfringens enterotoxin gene is on transposable element in type A human food poisoning strains*. Microbiology; 143:2109-2115.
- Bueschel, D.M., Jost, B.H., Billington, S.J., Trinh, H.T., Songer, J.G. (2003). *Prevalence of cpb2, encoding beta 2 toxin, in Clostridium perfringens field isolates: correlation of genotype with phenotype*. Vet Microbiol; 94:121-129.
- Bustinza,J.A.(2000).*Enfermedades de la alpaca*. 2da ed.Impreso Universidad Nacional del Altiplano.Arequipa.p30-4
- Campos, D. de F S., Baccaro, M.R., Moreno, A.M., Ferreira, A.J.P., Doto, D.S., Murakami, D.F., Shinya, L.T. (2004). *Clostridium perfringens tipo A portadores do gene cpb2 associados à lesões em íleo de coelhos*. Arq Inst Biol São Paulo; 71:287-292.

- Chávez, A., Bazalar, H., Guerrero, C. (1982). *Coccidias (Protozoa: Eimeridae) en vicuñas (Lama vicugna)*. Res VII Cong. Nac. Cienc. Vet. Ica-Perú.
- Cowan, S.T. (1974). *Manual for the identification of medical bacterial*. 2 ed. Cambridge: University Press.
- Cruickshan, R. (1965). *Medical microbiology*. 11 ed. Great Britain: E. & S. Livingstone Limited.
- Dray, T. (2004). *Clostridium perfringens type A and 2 toxin associated with enterotoxemia in a 5- week-old goat*. Can Vet J 45: 251-253.
- Duchesnes, C. y Mainil, J. (2005). *Genus Clostridium*. Scientific Booklets European Concerted Action QLK2-CT2001-01267. Disponible en: <http://www.genusclostridium.net>.
- Effat, M.M. (2008). *Restriction enzyme analysis and DNA sequencing comparison for toxin gene among different types of Clostridium perfringens*. Pak J Biol Sci; 11:380-385.
- Ellis, R.P. (2006). *Clostridium perfringens enteritis*. En: *The complete alpaca book*. 2 ed. California: Bonny Doun Press, : 464-467.
- Embury-Hyatt, C.K., Wobeser, G., Simko, E., Woodbury, M.R. (2005). *Investigation of a syndrome of sudden death, splenomegaly, and small intestinal hemorrhage in farmed deer*. Can Vet J; 46:702-708.
- Engström, B.E., Fermér, C., Lindberg, A., Saarinen, E., Baverud, V., and Gunnarsson, A. (2003). *Molecular typing of isolates of Clostridium perfringens from healthy and diseased poultry*. Vet. Microbiol. 94:225-235

FAO(2005). *Evaluacion de la sostenibilidad agraria de las regiones altoandinas del Peru*. Documento de trabajo 255. Roma, Italia.

Flores, D.M. y Alape,G.A. (2003). *Role of Clostridium perfringens phospholipase C in the pathogenesis of gas gangrene*.Toxicon; 42:979-86.

Fowler,M.E.(1998).*Medicine and surgery of South American camelids* .2da ed. .Iowa State University Press.Iowa..p166-169

Ganong, W.F. (1987). *Fisiología médica*. 11 ed. Mexico: Editorial Manual Moderno S.A.

Garmory, H.S., Chanter, N., French, N.P., Bueschel, D., Songer, J.G., Titball, R.W. (2000). *Ocurrence of Clostridium perfringens  $\beta$ 2-toxin amongst animals, determinated using genotyping and subtyping PCR assays*. Epidemiol Infect; 124:61-67.

Garrity,G.M.,Winter,M.a nd Searless, D.B.(2001).*Taxonomico utlineof the prokaryoticgenera.Bergey´sManualofSytematicBacteriology*.2daed.p1-41.

Gholamiandekhordi, A.R., Ducatelle, R., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F., Immerseel, F.V. (2006). *Molecular and phenotypical characterization of Clostridium perfringens isolates from poultry flocks with different disease status*. Vet Microbiol; 113:143-152.

Gibert, M., Jolivet-Reynaud, C., Popoff, M.R. (1997). *Beta2 toxin, a novel toxin produced by Clostridium perfringens*. Gene; 203:65-73.

- Gillespie, J., Timoney, J. (1981). *Hagan and Bruner's infectious diseases of domestic animals*. 7ma ed. International Standart. U.S.A. p207-21
- Gkiourtzidis, K., Frey, J., Bourtzi-Hatzopoulou, E., Iliadis, N., Sarris, K. (2001). PCR detection and prevalence of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\beta$ 2-,  $\epsilon$ -,  $\iota$ - and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery. *Vet. Microbiol*; 82:39-43.
- Guerrero, C., Alva, J., Bazalar, H., Tabacci, L. (1970b). *Infección experimental de alpacas con Eimeria lamae*. *Bol. Ext. I.V.I.T.A. Lima*. 4: 79-83
- Guerrero, C., Bazalar, H., Leguia, G. (1970<sup>a</sup>). *Coccidiosis en rumiantes*. *Bol. Ext IVITA*. 4:305-308.
- Guerrero, C. (1967). *Coccidia (Protozoa: Eimeriidae) of the alpacas Lama pacos*. *J. Protozool* 14: 613 – 616.
- Guerrero, C. (1971). *Coccidia (Protozoa: Eimeriidae) of the alpacas Lama pacos*. *J. Protozool* 14: 613 – 616.
- Guerrero, C. y Leguía, G. (1987). *Enfermedades infecciosas y parasitarias de alpacas*. *Rev. Cam. Sud. CISC-IVITA* 4: 34-38.
- Hatheway, C. (1990). *Toxigenic clostridia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3:66-98
- Hauschild, A.H.W., Niilo, L., Dorward, W.J. (1968). *Clostridium perfringens type A infection of ligated loops in lambs*. *Appl Microbiol*; 16:1235-1239.
- Herholz, C., Miserez, R., Nicolet, J., Frey, J., Popoff, M., Gubert, M., Gerber, H., Straub, R. (1999). *Prevalence of  $\beta$ -2-toxigenic Clostridium perfringens in horses with intestinal disorders*. *J. Clin. Microbiol.* 37:358-361.

- Hermans, P.G. y Morgan, K.L. (2003). *The epidemiology of necrotic enteritis in broiler chickens*. Res Vet Sci 74 (Supplemet A): 19.
- Hidalgo, (1999). *Coccidiosis*. En: *Parasitología veterinaria*. 1ª Ed. Editor M. Cordero del Campillo y M. Rojo. Ed. Mc. Graw Hill-Interamericana. Madrid. 958p
- Hurtado, E., Bustinza, J., Sánchez, C. (1985). *Parasitismo gastrointestinal por examen de heces en huanacos (Lama guanicoe)* Res V Conv Int Camelidos Sudamericanos. Cusco-Perú 17-24.
- Joclik, W.K. y Willett, H.P. (1991). *Zinsser Microbiología*. 20va ed. Ed. Médica Veterinaria. Buenos Aires. p861-871
- Jost, B.H., Billington, C.J., Trinh, H.T., Buesschel, D.M., Songer, J.G. (2005). *Atypical cpb2 genes, encoding beta2-toxin in Clostridium perfringens isolates of nonporcine origin*. Infect Immun; 73:652-656.
- Kanakaraj, R., Harris, D.L., Songer, J.G., Bosworth, B. (1998). *Multiplex PCR assay for detection of Clostridium perfringens in feces and intestinal contents of pigs and swine feed*. Vet Microbiol; 63: 29-38.
- Katayama, S., Matsushita, O., Minami, J., Mizobuchi, S., Okabe, A. (1993). *Comparison of the alpha-toxin genes of Clostridium perfringens type A and C strains: evidence for extragenic regulation of transcription*. Infect Immun; 61:457-463.
- Keyburn, A.L., Boyce, J.D., Vaz, P., Bannam, T.L., Ford, M.E., Parker, D., DiRubbo, A., Rood, J. and Moore, R.J. (2008). *NetB, a new toxin that is associated with*

*avian necrotic enteritis caused by Clostridium perfringens.* Plos Pathogens.4(2):e26

Leguía, G. (1999). *Enfermedades parasitarias de camélidos Sudamericanos.* Ed. De Mar. Lima-Perú. p. 189

Leguía, G. y Casas, (1999). *Enfermedades parasitarias y atlas parasitológico de camelidos sudamericanos.* Ed. De Mar. Lima.30p

Leguía, G. y Casas, E.(1998). *Eimeria ivitaensis (Protozoa: Eimeridae) en alpacas Lama pacos.* Rev. Per. Parasitol. 13: 59-61.

Londoño, P., Pérez, D., Castillo, H., Véliz, A., Llanco, L., Yaya, K., Maturrano, L., Rosadio, R. (2006). *Evidencia de coinfección de Eimeria macusaniensis y clostridium perfringens en enterotoxemia en alpacas.* IV Congreso Mundial sobre Camélidos Santa María, Provincia de Catamarca, Argentina, 11-15 de octubre.

Luna, L.R. (2009). *Genotipificación de cepas de Escherichia coli aislados de crías de alpacas con diarrea.* [Tesis para optar el título de Médico Veterinario]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Lima.

Madigan,M.T.,Martinko,J.M.yParker, J.(2001).*Biología de los microorganismos.* 8va ed. PrenticeHall.España.p725-727

Manteca, C., Daube, G., Jauniaux, T., Linden, A., Pirson, V., Detilleux, J., Ginter, A., Coppe, P., Kaeckenbeeck, A., Mainil, J.G. (2002). *A role for the Clostridium perfringens  $\beta$ 2 toxin in bovine enterotoxemia.*Vet. Microbiol; 86:191-202.



- Martinez, C. (1992). *Evaluación parasitaria de alpacas en comunidades del ambito de la microregion Chucuito-Yunguyo*. Tesis de Medico veterinario y zootecnista. Univ. Nac. Del Altiplano Puno. 76p.
- McClane, B.A. (2000). *Clostridium perfringens enterotoxin and intestinal tight junctions*. Trends Microbiol; 8:145-146.
- Melo, M. (1999). *Enfermedades Parasitarias*. UNA-Puno, Perú. Pgs.25- 37.
- Melo, M. y Hurtado, E. (1985). *Infestacion parasitaria en alpacas desde el nacimiento hasta el destete*. Rev. de inv. Camelidos Sudamericanos ALLPAK'A Univ. Nac. Del altiplano. Puno. 1(2):78-86.
- Merchant, I.A., Packer, R.A. (1961). *Veterinary bacteriology and virology*. 6ta ed. p 492-493, 505-509. Library of Congress Catalog Card. Iowa.
- Miyakawa, M.E.F. y Uzal, F.A. (2005). *Morphologic and physiologic changes induced by Clostridium perfringens type A toxin in the intestine of sheep*. Amer J Vet Reser; 66:251-255.
- Miyamoto, K., Chakrabarti, G., Morino, Y., McClane, B. (2002). *Organization of the plasmid cpe locus in Clostridium perfringens type A isolates*. Infect Immun; 70:4261-4272.
- Moro, M. (1971). *Enfermedades infecciosas de las alpacas. Diarrea bacilar o enterotoxemia de las crías de las alpacas*. Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Invetigaciones Tropicales y de Altura (IVITA) UNMSM. Lima, Perú. p9-14.

- Moro, M. (1987). *Enfermedades infecciosas de las alpacas. Diarrea bacilar o enterotoxemia de las crías de las alpacas*. Rev. Camélidos Sudamericanos, Lima 4:8-13.
- Nauerby, B., Pedersen, K., Madsen, M. (2003). *Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among Clostridium perfringens isolates from chickens*. Vet Microbiol; 94: 257-266.
- Naylor, C.E., Eaton, J.T., Howells, A., Justin, N., Moss, D.S., Titball R.W., Basak, A.K. (1998). *Structure of the key toxin in gas gangrene*. Nat Struct Biol; 5:738-46.
- Nicolet, J. (1986). *Compendio de bacteriología médica veterinaria*. 1 ed. España: Editorial Acribia S.A.
- Niilo, L. (1986). *Enterotoxemic Clostridium perfringens*. En: *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. P80-86. En: Gyles CI, Thoen CO. (ed) 1ra ed. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. Iowa.
- Oha, R. (1994). *Anatomía patológica de las diarreas infecciosas en crías de alpaca (Lamapacos) en la SAISAricoma Ltda*. 57. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Univ. Nacional del Altiplano, Puno. 79p
- Otamiri, T. (1989). *Phospholipase C-mediated intestinal mucosal damage is ameliorated by quinacrine*. Fd Chem Toxic; 27:399-409.
- Palacios, C. (2004). *Caracterización anatomopatológica de enteropatías causantes de mortalidad en crías de alpaca*. [Tesis para optar el título de

Médico Veterinario]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos,  
Facultad de Medicina Veterinaria, Lima

Palacios, C.A., Perales, R.A., Chavera, A.E., Lopez, M.T., Braga.W.U., Moro, M.  
(2006). *Eimeria macusaniensis and Eimeria ivitaensis co-infection in fatal cases of diarrhoea in young alpacas (Lama pacos) in Perú*. Vet Rec; 158:344-345.

Pelayo, A. (1973). *Prevalencia de coccidias. (Protozoa: Eimeridae) en llamas (Lama glama)*. Tesis de Bach. Med. Vet. U.N.M.S.M. Lima pag 52.

Pérez, D.R.(2006). *Genotipificación y subtipificación de Clostridium perfringens aisladas de crías de alpacas muertas por enterotoxemia*. [Tesis para optar el título de Médico Veterinario]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Lima.

Petit, L., Gibert, M., Popoff, M. (1999). *Clostridium perfringens: toxinotype and genotype*. Trends Microbiol; 7:104-110.

Petit, L. (1999). *Clostridium perfringens: toxinotype and genotype*. Trends Microbiol 7: 104-110.

Prehn,N.,Saez,S. y Arraigada, M.(1999).*Estudios microbiológicos y clínicos de enterotoxemia por Clostridium perfringens en camélidos sudamericanos. Res.IICong.Mun.Sobre Camélidos.Cusco, Perú.p140.*

Ramírez,A.,Franco,E.,Pezo,D. yGarcía, W.(1998).*Diagnóstico y control de enfermedades en CSA*.Pub.Tec.FMV34:9-14

- Ramírez,A.,Ellis, R. (1988).*Nuevos conceptos sobre la enterotoxemia y colibacilosis en alpacas*.Rev.Camélidos Sudamericanos,Lima6:9-17
- Ramírez, A. (1985). *Enterotoxemia de la alpaca*. Programa colaborativo de apoyo a la investigación en rumiantes menores. Serie Reporte Técnico. Lima 63:1-17.
- Ramirez,A.(1987).*Alpaca Clostridium perfringens type A enterotoxemia:Purification and assays of the enterotoxin*. In partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy.Colorado State University, Colorado.201
- Ramírez,A.(1988).*Avances de la Investigación sobre enteritis e inmunidad neonatal en la alpaca*.Cursotaller—Resultados de investigación del programa de rumiantes menores (1980-1989).Programa colaborativo de apoyo a la investigación en rumiantes menores.Arequipa.p153-163.
- Ramírez,A.(1989<sup>a</sup>).*Avances de la Investigación sobre enteritis e inmunidad neonatal en la alpaca*.Cursotaller—Resultados de investigación del programa de rumiantes menores (1980-1989).Programa colaborativo de apoyo a la investigación en rumiantes menores.Riobamba.p183-191
- Ramírez,A.(1989b).*Enfermedades infecciosas en camélidos sudamericanos*. XII Reunión Científica Anual APPA. Simposio de Producción de alpacas y llamas.FMV-UNMSM,Lima p85-10
- Ramírez, A. (1991). *Enfermedades infecciosas*. En: Fernández-Baca S (ed.). *Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos*. Santiago de Chile: FAO. p 263-324.

- Ramírez, A.; Huamán, D.; Ellis, R. P.(1991). *Enterotoxemia de la alpaca. Programa colaborativo de apoyo a la investigación en rumiantes menores*. Serie reporte técnico, Lima; 63:1-17.
- Rehman, H., Awad, W.A., Lindner, I., Hess, M., Zentek, J. (2006). *Clostridium perfringens alpha toxin affects electrophysiological properties of isolated jejuna mucosa of laying hens*. Poultry Science; 85:1298-1302.
- Rojas, M. (1990). *Parasitismo de los Rumiantes domesticos. Terapia, prevención y Modelo para su aprendizaje*. Ed. Maijosa. Lima. 383 p.
- Romero, M. (1992). *Prevalencia y carga parasitaria de Eimeria sp. en crías de alpacas*. Tesis de Bach. Med. Vet. U.N.M.S.M. Lima. 28p.
- Rood, J.( 1998). *Virulence genes of Clostridium perfringens*. Annu. Rev. Microbiol 52:333–360
- Rood, J. y Cole, S. (1991). *Molecular genetics and pathogenesis of Clostridium perfringens*. Microbiol Rev; 55:621-648.
- Rosadio, R., Maturrano, L., Pérez, D., Castillo, H., Véliz, A., Luna, L., Yaya, K. y Londoño, P. (2012). *Avances en el estudio de la patogénesis y prevención de la enterotoxemia de las alpacas*. Rev Inv Vet Perú. 23(3): 251-260
- Rosadio, R., Londone, P., Perez, D., Castillo, H., Veliz, A., Llanco, L., Yaya, K., Maturrano, L. (2010). *Eimeria macusaniensis associated lesions in neonate alpacas dying from enterotoxemia*. Veterinary Parasitology 168: 116-120.

- Rosadio, R., Londoño, P., Pérez, D., Castillo, H., Véliz, A., Llanco, L., Yaya, K., Maturrano, L. (2009). *Eimeria macusaniensis* associated lesions in neonate alpacas dying from enterotoxemia. *Vet Parasitol*; (En prensa). doi: 10.1016/j.vetpar.10.010.
- Rosadio, R., Londoño, P., Pérez, D., Castillo, H., Véliz, A., Llanco, L., Yaya, K. and Maturrano, L. (2010). *Eimeria macusaniensis* associated lesions in neonate alpacas dying from enterotoxemia. *Vet Parasitol*. 168 (1-2): 116–120
- Rosadio, R.H. y Ameghino, E.F. (1994). *Coccidial infection in neonatal peruvian alpacas*. *Vet Rec*; 135:459-460.
- Rosadio, R. y Ameghino, E. (1990). *Coccidiosis en alpacas neonatas*. Resúmenes XII Reunión Científica Anual APPA. Lima, Perú. p 100.
- Rosadio, R. y Ameghino, E. (1989). *Coccidiosis en alpacas*. En: *Avances sobre investigaciones de salud animal en camélidos sudamericanos*. Bol. Div. IVITA 20: 38-45.
- Sakurai, J., Fuji, Y., Shirotani, M. (1990). *Contraction induced by Clostridium perfringens alpha toxin in the isolated rat ileum*. *Toxicon*; 28:411-418.
- Sakurai, J., Nagahama, M., Oda, M. (2004). *Clostridium perfringens alpha-toxin: Characterization and mode of action*. *J Biochem*; 136:569-574.
- Sawires, S.Y., Songer, J.G. (2005). *Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain typing of Clostridium perfringens*. *Anaerobe*; 11:262-272.

- Schalch, B., Bader, L., Schau, H., Bergmann, R., Rometsch, A., Maydl, A., Kebler, S. (2003). *Molecular typing of Clostridium perfringens from a food-borne disease outbreak in a nursing home: ribotyping versus pulsed-field gel electrophoresis*. J Clin Microbiol; 41:892-895.
- Schotte, U., Truyen, U., Neubauer, H. (2004). *Significance of  $\beta$ 2-toxigenic Clostridium perfringens infections in animals and their predisposing factors*. J Vet Med; 51:423-426.
- Sear, C.L., Kaper, J.B. (1996). *Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion*. Microbiol Rev; 60:167-215.
- Sheedy, S.A., Ingham, A.B., Rood, J.I., Moore, R.J. (2004). *Highly conserved alpha-toxin sequences of avian isolates of Clostridium perfringens*. J Clin Microbiol; 42:1345-1347.
- Shimizu, T., Yamaguchi, H., Otan, K., Banu, S., Hayashi, H. (2002). *Clostridial VirR/VirS regulon involves a regulatory RNA molecule for expression of toxins*. Mol Microbiol; 43:257-265.
- Si, W., Gong, J., Ham, Y., Yu, H., Brennan, J., Zhou, H. y Chen, S. (2007). *Quantification of cell proliferation and alpha-toxin gene expression of clostridium perfringes in the development of necrotic enteritis in broiler chickens*. Applied and Environmental Microbiology. Vol 73, No. 21. P. 7110-7113.
- Smedley, J.G., Fisher, D.J., Sayeed, S., Chakrabarti, G. and Mc Clane, BA. (2004). *The enterictoxins of Clostridium perfringens*. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 152:183-204

- 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* 2:197-203.
- Songer, J.G. (1996). *Clostridial enteric diseases of domestic animals*. *Clin Microbiol Rev*; 9:216-234.
- Soulsby, (1987). *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7ed. Mexico. Interamericana. 823p.
- Stagnitta, P.V., Micalizzi, B., Stefanini de Guzmán, M.A. (2002). *Prevalence of enterotoxigenic Clostridium perfringens in meats in San Luis, Argentina*. *Anaerobe*; 8:253-258.
- Stevens, D.L. y Bryant, A.E. (2002). *The role of clostridial toxins in the pathogenesis of gas gangrene*. *CID*; 35:S93-100.
- Takahashi, A., Kondoh, M., Masuyama, A., Fujii, M., Mizuguchi, H., Horiguchi, Y., Watanabe, Y. (2005). *Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxina in its interaction with claudin-4*. *J Controlled Release*; 108:56-62.
- Timbermont, L., Lanckriet, A., Gholamiandehkordi, A.R., Pasmans, F., Martel, A., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F. (2009). *Origin of Clostridium perfringens isolates determines the ability to induce necrotic enteritis in broilers*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*; 32:503-512.
- Titball, R.W., Naylor, C.E., Basak, A.K. (1999). *The Clostridium perfringens alpha-toxin*. *Anaerobe*; 5:51-64.



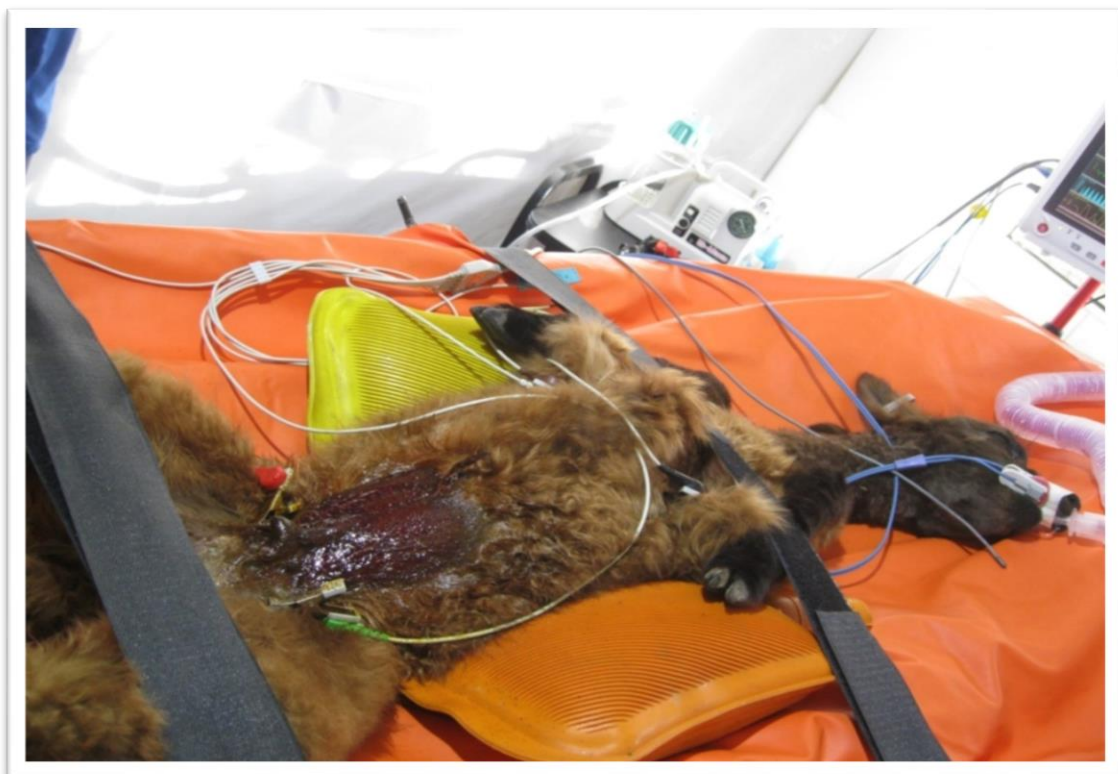
- Titball, R.W. Gas gangrene: an open and closed case. *Microbiology* 2005; 151: 2821- 8.
- Tsutsui, K., Minami, J., Matsushita, O., Katayama, S., Taniguchi, Y., Nakamura, S., Nishioka, M., Okabe, A. (1995). *Phylogenetic analysis of phospholipase C genes from Clostridium perfringens types A to E and Clostridium novyi*. *J Bacteriol*; 177:7164-7170
- Waters, M., Savoie, A., Garmory, H.S., Bueschel, D., Popoff, M.R., Songer, J.G., Titball, R.W., McClane, B.A. and Sarker, M.R. (2003). *Genotyping and phenotyping of beta2-toxigenic Clostridium perfringens fecal isolates associated with gastrointestinal disease in piglets*. *J. Clin. Microbiol.* 41:3584-3591
- Whitehead, C. y Anderson, D.E. (2005). *Neonatal diarrheain llamas and alpacas*. *Small Ruminant Research* 61:207-215
- Yaya, K. y Rosadio, R. (2005). *Ensayo de tres programas de vacunación anticlostridial en alpacas*. *Rev. Inv. Vet. Perú* 16:49-55
- Yoo, H.S., Lee, S.U., Park, K.Y., Park, Y.H. (1997). *Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of Clostridium perfringens types by multiplex PCR*. *J Clin Microbiol*; 35:228-232.
- Zhao, Y. y Melville, S.B. (1998). *Identification and characterization of sporulation-dependent promoters upstream of the enterotoxin gene (cpe) of Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*; 180:136-142.

# ANEXOS

**PANEL FOTOGRÁFICO**



**Figura 1.** Evaluación de constantes clínicas.



**Figura 2.** Evaluación de constantes clínicas.



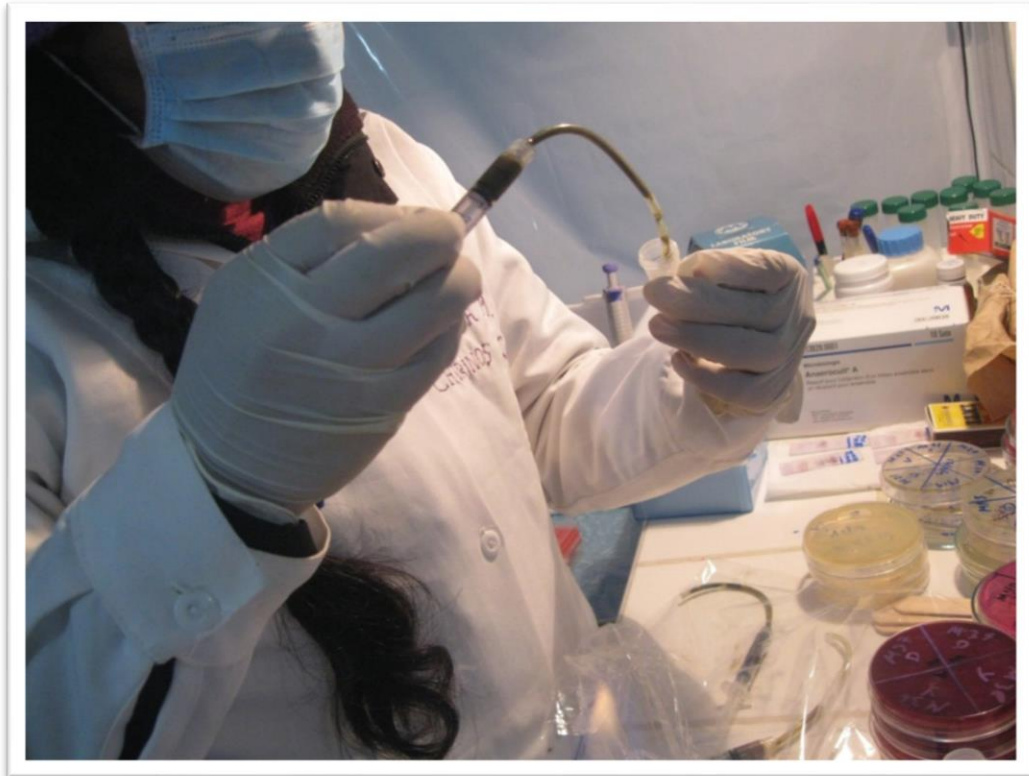
**Figura 3.** Premeditación para la intervención quirúrgica.



**Figura 4.** Procedimiento quirúrgico.



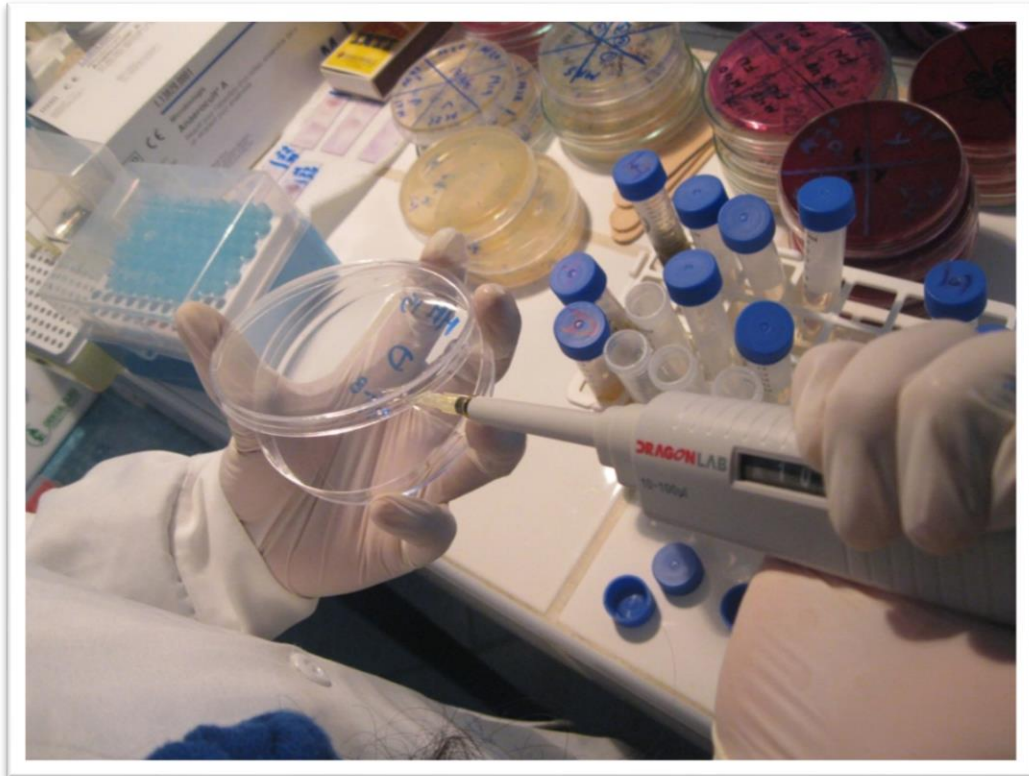
**Figura 5.** Extracción de contenido intestinal.



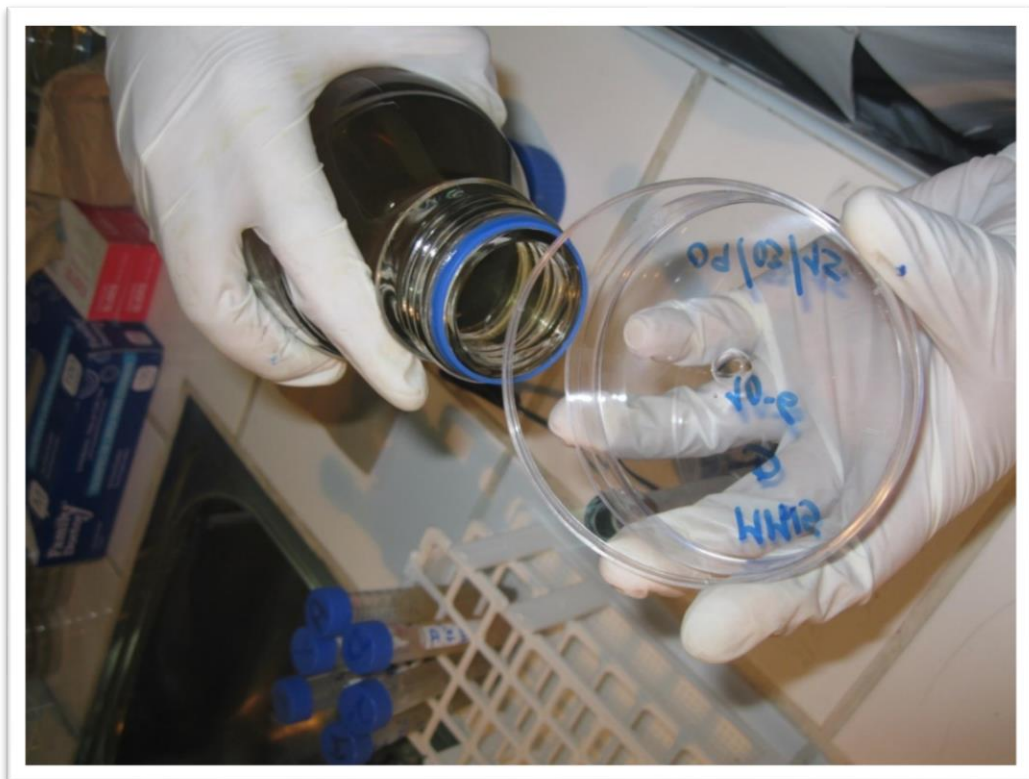
**Figura 6.** Diluciones de contenido intestinal.



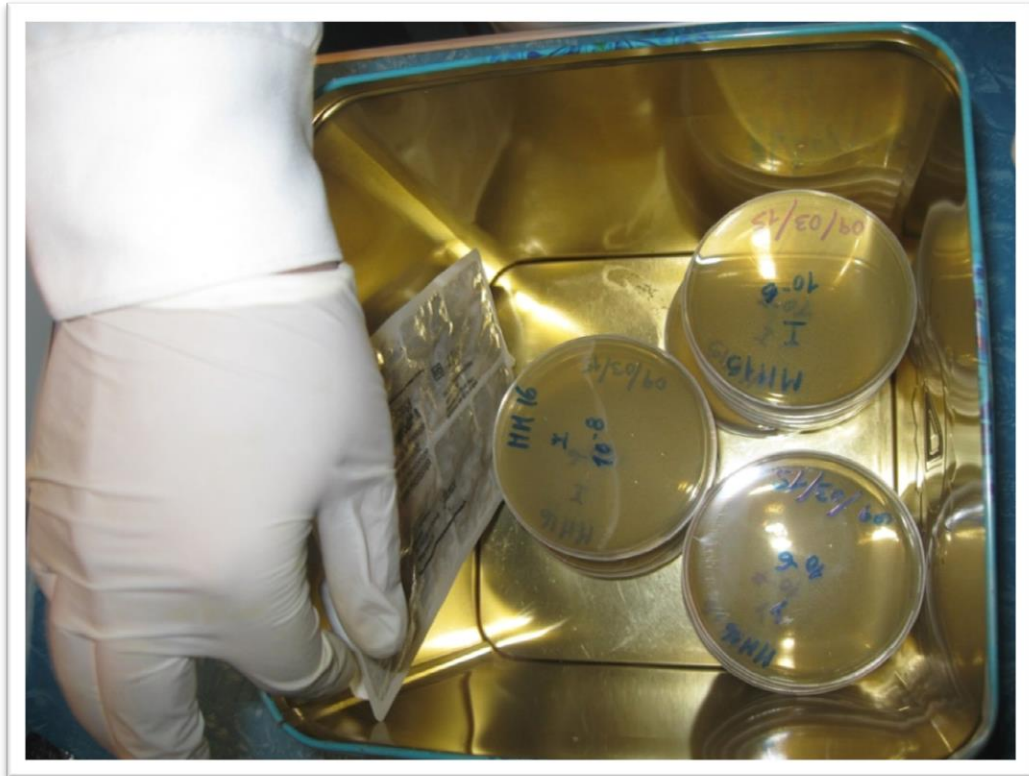
**Figura 7.** Diluciones de contenido intestinal.



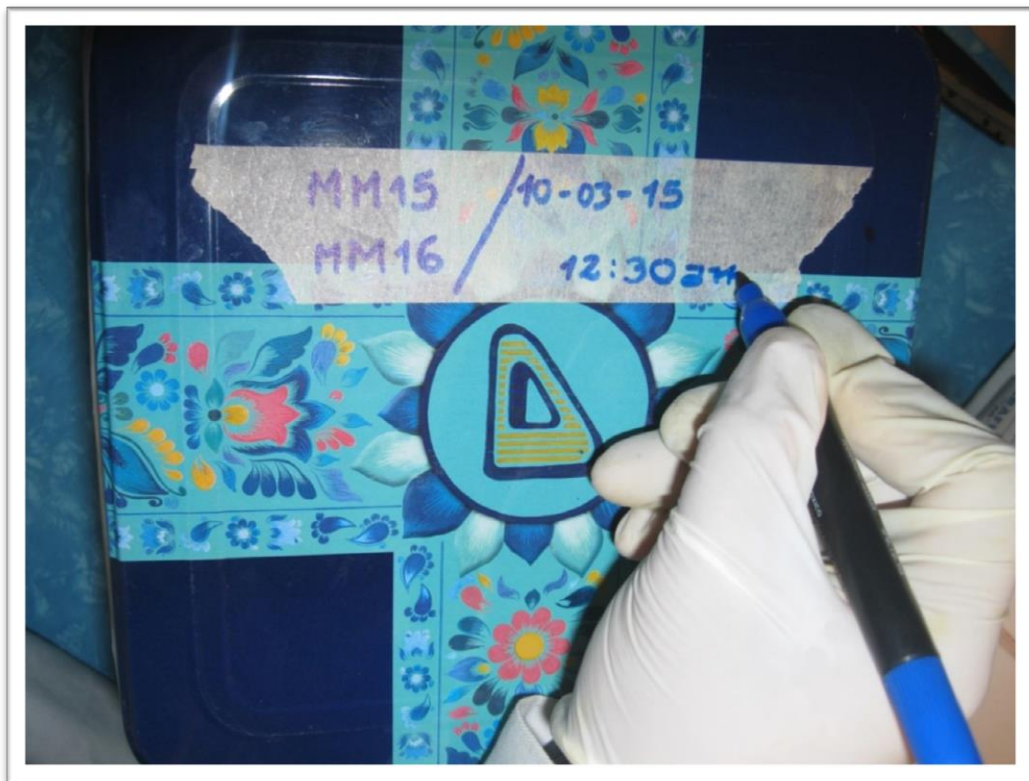
**Figura 8.** Siembra de contenido intestinal diluido.



**Figura 9.** Incorporación de TSC al inoculo.



**Figura 10.** Colocación en cámara de anaerobiosis.

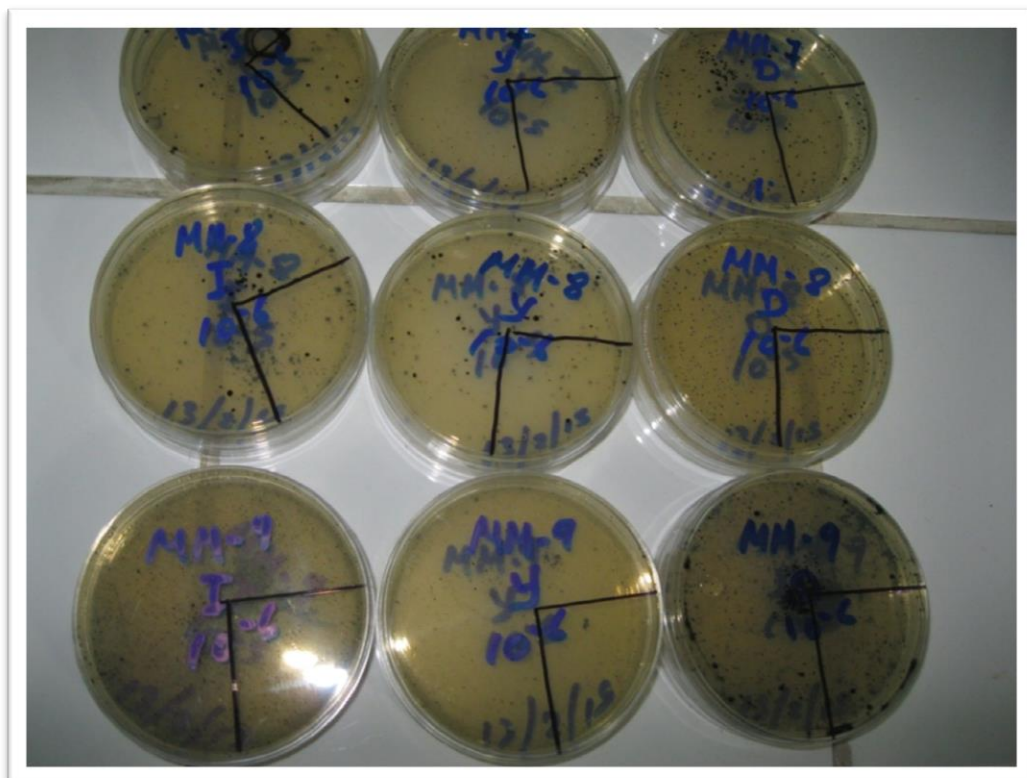


**Figura 11.** Rotulo.





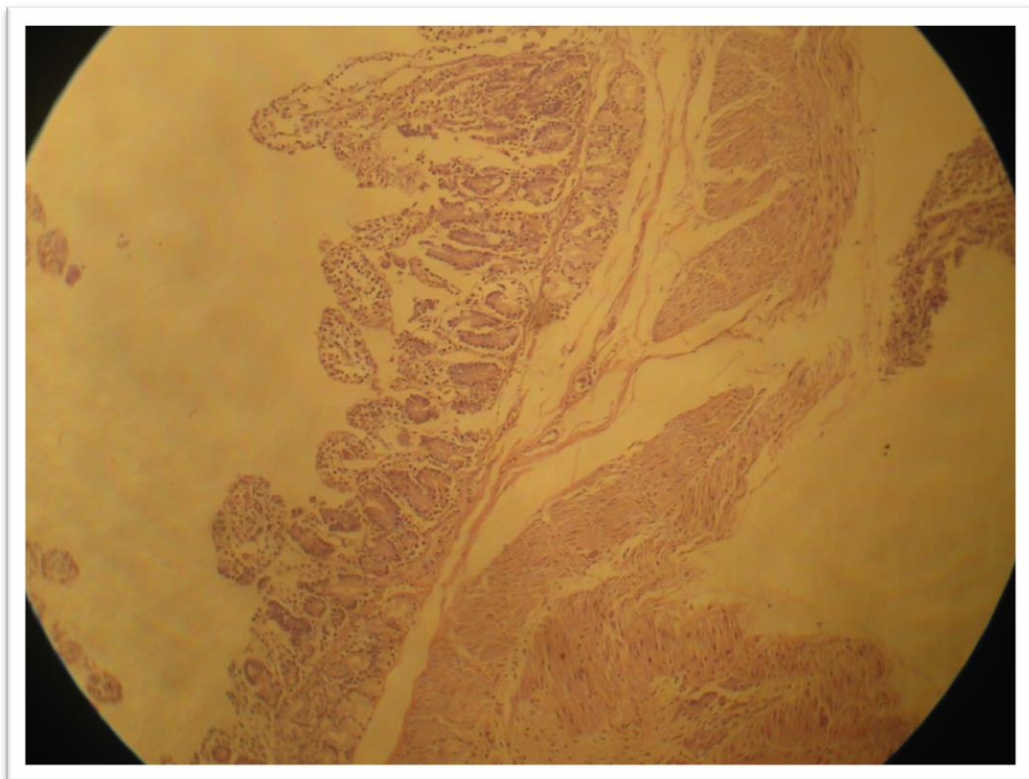
**Figura 12.** Incubación en estufa.



**Figura 13.** Cuantificación de colonias.



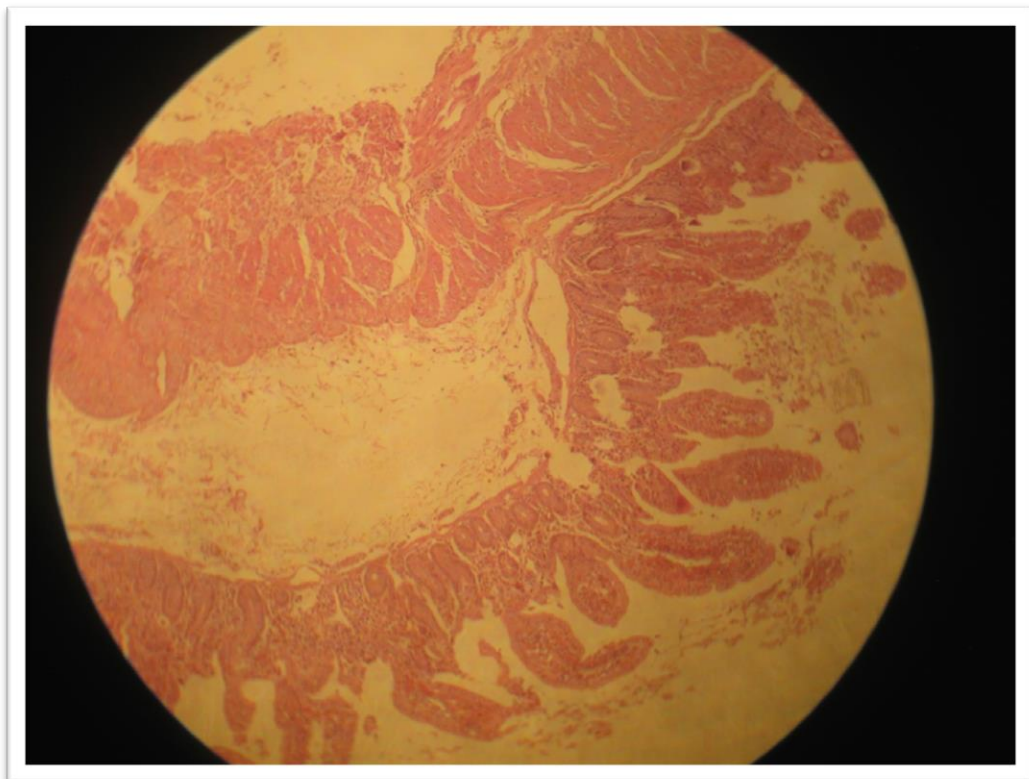
**Figura 14.** Identificación de eimerias por histopatología.



**Figura 15.** Identificación de eimerias por histopatología.



**Figura 16.** Identificación de eimerias por histopatología.



**Figura 17.** Identificación de eimerias por histopatología.

**Tabla 5.** UFC/ml muestra de intestino de crías de alpaca aparentemente sanas.

UFC/ml MUESTRA DE INTESTINO DE CRIAS DE ALPACA				
Nro.	Edad en Semanas	DUODENO	YEYUNO	ILEON
1	3	1200	18000	300000
2	3	0	100	20
3	3	10	2100	238000
4	3	0	0	290
5	3	0	1100	5200
6	7	0	60	110
7	7	0	0	0
8	7	0	0	10
9	7	19200	6560	0
10	7	0	0	6600
11	14	0	3800	31000
12	14	10	20	3100
13	14	8800	38800	40
14	14	0	40	510
15	14	570	200	280
16	21	530	240	6600
17	21	0	0	0
18	21	0	0	0
19	21	220	24000	280
20	21	13200	304000	300000
21	28	40	50	4600
22	28	0	0	100
23	28	100	0	110
24	28	0	1200	300000
25	28	10	20	20
26	35	0	0	0
27	35	0	0	10
28	35	30	50	860
29	35	100	30	920
30	35	0	0	208000
31	42	0	0	3800
32	42	0	60	50
33	42	70	90	11000
34	42	100	100	5310
35	42	0	0	20
36	49	0	0	430
37	49	0	50	30
38	49	0	10	160
39	49	10	0	350
40	49	100	120	90
41	56	90	10	10
42	56	540	220	0
43	56	20	0	80
44	56	80	60	30
45	56	1000	0	3100

**Tabla 6.** UFC/ml muestra de intestino de crías de alpaca muertas con síndrome enterotóxico hemorrágico.

UFC/ml MUESTRA DE INTESTINO DE CRIAS DE ALPACA				
Nro.	Edad en Semanas	DUODENO	YEYUNO	ILEON
1	3	500000	11000	13300
2	3	0	1000	10
3	7	50300	0	10020
4	7	0	0	290
5	14	0	0	5200
6	14	9000	1360	110
7	21	0	0	0
8	28	300	200	10
9	35	29200	70	700
10	56	0	0	2500